



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
MESTRADO EM FITOTECNIA

DARLIANE VERAS DOS SANTOS SOUZA

**EFEITO DE PROCESSAMENTOS DO SUCO INTEGRAL DE LARANJA SOBRE
SUAS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE**

MOSSORÓ

2019

DARLIANE VERAS DOS SANTOS SOUZA

**EFEITO DE PROCESSAMENTOS DO SUCO INTEGRAL DE LARANJA SOBRE
SUAS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Tecnologia Pós-colheita

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Ligia Dantas de Moraes

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

MOSSORÓ

2019

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionado os seus créditos bibliográficos.

S719e Souza, Darliane Veras dos Santos.
Efeito de processamentos do suco integral de
laranja sobre suas características de qualidade /
Darliane Veras dos Santos Souza. - 2019.
65 f. : il.

Orientadora: Patrícia Lígia Dantas de Moraes.
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz
Ambrósio.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia, 2019.

1. C. albicans. 2. compostos bioativos. 3.
cor. 4. E. coli. 5. tratamento não-térmico. I.
Moraes, Patrícia Lígia Dantas de , orient. II.
Ambrósio, Márcia Michelle de Queiroz, co-orient.
III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

DARLIANE VERAS DOS SANTOS SOUZA

**EFEITO DE PROCESSAMENTOS DO SUCO INTEGRAL DE LARANJA SOBRE
SUAS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

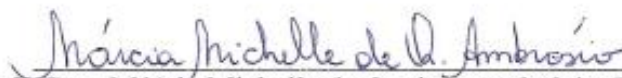
Linha de Pesquisa: Tecnologia Pós-colheita

Defendida em: 25 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA



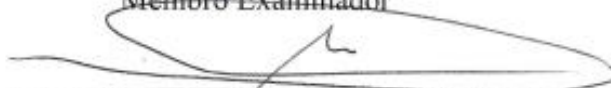
Prof. Dra. Patricia Ligia Dantas de Moraes (UFERSA)
Presidente



Prof. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dra. Mayara Salgado Silva (IFCE)
Membro Examinador



Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior (UFERSA)
Membro Examinador

Aos meus pais e ao meu esposo, por todo o bem que me fazem.

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pela vida e por tudo que ele me concede;

Aos meus pais, Alexandre e Maria da Luz, por todo o apoio e incentivo que me fornecem;

Ao meu esposo, Eudênio Eduardo, por tudo de bom que me proporciona, inclusive: amor, carinho, companheirismo, paz, forças e encorajamento;

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido e ao Programa de Fitotecnia, pela oportunidade que me deram de cursar este mestrado;

À minha orientadora, Dra. Patrícia Ligia Dantas de Moraes, por toda a orientação ao longo desse mestrado;

Aos meus co-orientadores, Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio e Dr. Clodomiro Alves Junior, que me passaram valiosas orientações para o desenvolvimento deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em nome do aluno Fabio Macêdo, que me disponibilizou uma cepa de bactéria para desenvolvimento deste trabalho;

Ao Laboratório Integrado de Biomoléculas da Universidade Federal do Ceará (UFC), em nome do Professor Mayron Vasconcelos, que me disponibilizou uma cepa de levedura, também para desenvolvimento deste trabalho;

À Banca Examinadora, pelas valiosas correções deste trabalho;

Aos técnicos de laboratório da UFERSA, Naama, Kaio, Luise e Jussier, que sempre se dispuseram a me ajudar nos procedimentos e equipamentos laboratoriais;

Aos meus amigos(as) do laboratório de Pós-colheita, Mayra, Luiza, Carla, Eleneide, Marlenildo, Rydley e Fernando, que foram sempre presentes e companheiros durante todo esse mestrado, me ajudando em tudo que era preciso e/ou possível;

À minha família residente em Mossoró, Karla, Elaine, Kívia e Janduí, que me abrigaram durante esse mestrado;

Enfim, a todos os familiares e amigos, que me ajudaram de uma forma ou de outra a cursar este mestrado, meu muito obrigado a todos.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”.

Eclesiastes, 3:1.

RESUMO

Na indústria de suco de laranja, é empregado tratamento térmico nos produtos a fim de neutralizar a ação de microrganismos patogênicos. Contudo, tal ação pode ocasionar perdas nutricionais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança microbiológica, a qualidade físico-química e o potencial antioxidante do suco integral de laranja 'Lima' processado pelo método térmico convencional e compará-lo com o processamento a plasma. Para avaliação microbiológica do suco, foi instalado um experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições, onde foram inoculados a bactéria *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans* no suco estéril, sendo aplicados em seguida os tratamentos: plasma, gerado numa voltagem de 14 kV e frequência de 400 Hz, aplicado em 5 mL de suco por 1 min; tratamento térmico aplicado em 50 mL de suco à temperatura de 87 °C por 1 min (controle positivo); um suco contaminado com microrganismo que não passou por tratamento (controle negativo) e um suco autoclavado (controle absoluto). Após este processo, o suco contaminado com a *E. coli* foi plaqueado em meio de cultura ágar VRB (Violet Red Bile) e o suco contaminado com a *C. albicans* foi plaqueado em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar), ambos incubados à temperatura controlada de 36 °C por 24 h em Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D), para contagem das unidades formadoras de colônia. Para avaliação das análises físico-químicas e compostos bioativos, foi instalado um segundo experimento em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3 x 5 (tecnologias de tratamentos x dias de avaliações) com cinco repetições. Neste experimento, o suco não foi autoclavado, nem inoculado com microrganismos, porém passou pelos mesmos tratamentos (plasma e térmico), e um suco não tratado (controle absoluto). Os sucos foram avaliados quanto às seguintes variáveis: cor, pH, acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), relação SS/AT, açúcares totais e redutores, vitamina C, carotenoides, flavonoides amarelos, polifenóis e atividade antioxidante ao longo de 16 dias, com avaliações a cada 4 dias. Os sucos foram armazenados por 16 dias em geladeira à temperatura de 2 ± 1 °C e umidade relativa de $53 \pm 3\%$. As aplicações do plasma e do tratamento térmico reduziram a quantidade da bactéria *Escherichia coli* no suco, com inativação de 16,72 e 100%, respectivamente. O plasma não inativou *Candida albicans* em suco de laranja integral. O tratamento térmico inativou 100% da *C. albicans*. O plasma e o tratamento térmico alteraram a cor, com aumento nos valores de luminosidade e ângulo Hue. A aplicação do plasma reduziu os teores de vitamina C, carotenoides e polifenóis; os flavonoides amarelos aumentaram. O suco que

passou pelo tratamento térmico, logo após o processo, reduziu o teor de carotenoides. Contudo, o tratamento térmico e o plasma não prejudicaram a atividade antioxidante.

Palavras-chave: *C. albicans*; compostos bioativos; cor; *E. coli*; tratamento não-térmico.

ABSTRACT

In the orange juice industry, heat treatment is used to neutralize the action of pathogenic microorganisms. However, such action can cause nutritional losses in the juice. In this way, the objective of this work was to evaluate the microbiological safety, the physico-chemical quality and the antioxidant potential of whole juice of 'Lima' orange processed by conventional thermal method and to compare it with the plasma processing. For microbiological evaluation, a completely randomized experiment, with 5 replicates, was conducted. *Escherichia coli* and *Candida albicans* were inoculated in the sterile juice, then, the following treatments were applied: atmospheric plasma (14 kV voltage, 400 Hz frequency) in 5 mL juice for 1 min; and heat treatment (87 °C) in 50 mL juice for 1 min; a sample of juice contaminated with microorganism not treated (negative control) and autoclaved juice sample (absolute control). After this process, the infected juice sample with *E. coli* was plated in culture medium agar VRB (Violet Red Bile) and the juice infected with *C. albicans* was plated in culture medium BDA (Potatoe dextrose agar), both inoculated under 36° C during 24 h in Biological Demand Oxygen (B.O.D.), for counting of colony forming units. Moreover, to evaluate the physical-chemical and bioactive compounds, a second experiment was conducted in a completely randomized design, in a 3 x 5 factorial scheme (technologies of treatment x days of evaluations), with five replicates. In this experiment, juice samples were neither autoclaved nor inoculated with microorganisms, but, similarly, they were submitted to plasma and heat treatments, and a not treated sample juice was used as control. The juice samples were assessed with respect to: color, pH, titratable acidity (AT), soluble solids (SS), SS / AT ratio, total and reducing sugars, vitamin C, carotenoids, yellow flavonoids, polyphenols and antioxidant activity throughout 16 days, with evaluations each four days. Then, the juice samples were stored during 16 days under 2 ± 1 °C and $53 \pm 3\%$ R. H. The application of plasma and heat treatment reduced the amount of the bacterium *E. coli* in juice, inactivation of 16.72 and 100%, respectively. The plasma did not inactivate *C. albicans* in whole orange juice. The thermal treatment inactivated 100% *C. albicans*. The plasma and heat treatment changed the color, with an increase in the values of brightness and hue angle. The application of plasma reduced levels of vitamin C, carotenoids and polyphenols; yellow flavonoids have increased. The juice that passed through heat treatment, soon after the process, reduced the content of carotenoids. However, the heat treatment and the plasma did not have undermine the antioxidant activity.

Keywords: Bioactive compounds; *Candida albicans*; color; *Escherichia coli*; no-heat treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – *Escherichia coli* ATCC 25922 crescidas em meio de cultura ágar VRB 28
- Figura 2 – *Candida albicans* SC 5314 crescidas em meio de cultura BDA (A) e observadas entre lâmina e lamínula por meio de microscópio óptico na lente objetiva de 40 vezes..... 29
- Figura 3 – Limpeza dos frutos (A) e processamento para obtenção do suco integral (B).30
- Figura 4 – Ilustração do protótipo experimental com modelo de aplicação de plasma DBD, tensão de 14 kV e frequência de 400 Hz 30
- Figura 5 – Aplicação de plasma DBD utilizando ar atmosférico, 14 kV e 400 Hz (A) e tratamento térmico a 87 °C/1 min (B), ambos em suco de laranja ‘Lima’..... 32
- Figura 6 - Frasco utilizado no armazenamento do suco de laranja ‘Lima’..... 33
- Figura 7 - Valor médio de cor em luminosidade (L), croma (C) e ângulo Hue (H) em suco de laranja 'Lima' submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019 41
- Figura 8 - Valor médio de acidez e pH em suco de laranja 'Lima' submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019 43
- Figura 9 - Valor médio de sólidos solúveis e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019..... 44
- Figura 10 - Valor médio de açúcares totais e açúcares redutores em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019 45
- Figura 11 - Valor médio de carotenoides totais em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019 47
- Figura 12 - Valor médio de flavonoides amarelos em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019 48
- Figura 13 - Valor médio de polifenóis extraíveis totais em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 dias.

	UFERSA. Mossoró-RN, 2019.....	49
Figura 14	- Valor médio de vitamina C em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenados a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019	51
Figura 15	- Valor médio de atividade antioxidante pela captura do radical ABTS ⁺ em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenados a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Tratamentos empregados no suco de laranja ‘Lima’ para análises microbiológicas. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.....	31
Tabela 2	–	Tratamentos empregados no suco de laranja ‘Lima’ para análises físico-químicas e compostos bioativos. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.....	33
Tabela 3	–	Número médio de UFC de <i>E. coli</i> ATCC 25922 em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.....	37
Tabela 4	–	Número médio de UFC de <i>C. albicans</i> ATCC SC 5314 em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Suco de Laranja	19
2.1.1	Qualidade físico-química e compostos bioativos	19
2.1.2	Legislação para produção de sucos	22
2.2	Microrganismos patogênicos	23
2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	24
2.2.2	<i>Candida albicans</i>	25
2.3	Inativação microbiológica dos alimentos	25
2.3.1	Tecnologia do Plasma	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Preparo da análise microbiológica do suco de laranja	28
3.1.1	Obtenção dos microrganismos e preparo do inóculo	28
3.1.2	Preparação do suco integral de laranja	29
3.1.3	Geração do plasma atmosférico	30
3.1.4	Aplicação dos tratamentos	31
3.1.5	Análises microbiológicas	32
3.1.6	Análises estatísticas	32
3.2	Preparação do suco integral de laranja para as análises físico-químicas e compostos bioativos	32
3.2.1	Aplicação dos tratamentos	33
3.2.2	Análises físico-químicas	33
3.2.2.1	Cor	34
3.2.2.2	pH	34
3.2.2.3	Sólidos solúveis	34
3.2.2.4	Acidez titulável	34
3.2.2.5	Relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT)	34
3.2.2.6	Açúcares totais	34
3.2.2.7	Açúcares redutores	35
3.2.3.	Compostos bioativos	35

3.2.3.1	Carotenoides totais	35
3.2.3.2	Flavonoides amarelos	35
3.2.3.3	Polifenóis extraíveis totais	35
3.2.3.4	Vitamina C	36
3.2.3.5	Atividade Antioxidante pela captura do radical ABTS ^{·+}	36
3.2.4	Análises estatísticas.....	36
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Análises microbiológicas do suco de laranja	37
4.1.1	<i>Escherichia coli</i>	37
4.1.2	<i>Candida albicans</i>	38
4.2	Análises físico-químicas	40
4.2.1	Cor	40
4.2.2	Acidez e pH	43
4.2.3	Sólidos solúveis e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT)	44
4.2.4	Açúcares totais e açúcares redutores	45
4.3	Compostos bioativos	46
4.3.1	Carotenoides totais	46
4.3.2	Flavonoides amarelos	47
4.3.3	Polifenóis extraíveis totais	48
4.3.4	Vitamina C	50
4.3.5	Atividade antioxidante pela captura do radical ABTS ^{·+}	51
5	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE	

1 INTRODUÇÃO

A laranja é a fruta mais produzida no Brasil. Em 2017, foram produzidas 17,5 bilhões t, o que rendeu aumento de 2%, em relação ao ano anterior, nos valores de produção na fruticultura, sendo o estado de São Paulo o principal produtor (IBGE, 2017). O Brasil apresenta grande influência no mercado mundial da laranja e do seu suco, pois 34% da laranja e 76% do suco de laranja que são comercializados no mundo são originados do Brasil (NEVES; TROMBIN, 2017).

O suco de laranja é um produto de grande aceitação no mundo, principalmente devido aos benefícios à saúde (CITRUSBR, 2017; OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, este produto é uma importante fonte de vitamina C, polifenóis, carotenoides, flavonoides, açúcares, dentre outros compostos (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; ALMEIDA et al., 2015; ALEGRE, 2015).

A produção de suco no Brasil é regida pela Lei nº 8.918, de julho de 1994, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, tratando da padronização dos diferentes tipos de suco.

Os sucos precisam ser confeccionados de modo a manterem suas características físico-químicas e compostos bioativos e, conseqüentemente, qualidades nutricionais do produto para o consumidor. Além das características nutricionais, é necessário verificar a segurança microbiológica do produto, sendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o órgão responsável pela fiscalização.

Os sucos, assim como os demais alimentos, são substratos onde se desenvolvem diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias. Alguns microrganismos encontrados em sucos de laranja são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, e diversas espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. pelliculosa* e *C. tropicalis*) (OLIVEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2011; YAMADA et al., 2014). Estes microrganismos, principalmente *E. coli* e *C. albicans*, podem causar sérias doenças nos seres humanos, o que torna indispensável à indústria de sucos realizar tratamentos eficientes na inativação destes seres vivos.

Para garantir a qualidade dos alimentos, a indústria geralmente realiza processos como pasteurização e esterilização (POLYDERA et al., 2003). A pasteurização é o processo térmico mais utilizado para o tratamento de suco na indústria. Geralmente, a pasteurização de sucos utiliza uma temperatura entre 60 e 100 °C durante poucos segundos de tratamento (EVANGELISTA, 2008). Apesar de esse processo ser o mais usual e apresentar eficácia na

inativação de microrganismos patogênicos e enzimas indesejáveis, são comprovadas as perdas de alguns nutrientes e mudanças na qualidade dos sucos (SUCUPIRA et al., 2012). Badolato (2000), quando avaliou suco de laranja pasteurizado em temperaturas de 82,5 85,0 e 87,0 °C com tempos de retenção variando de 11 a 59 s, observou valores de contagem de microrganismos do grupo de bolores e leveduras abaixo do valor máximo estabelecido pela legislação da época, diferentemente do suco não pasteurizado, onde a quantidade de microrganismos foi superior ao máximo permitido. Os teores de sólidos solúveis e de polpa diminuíram quando o suco de laranja foi pasteurizado. Dutra et al. (2012) também avaliaram a influência de diferentes temperaturas (88 a 100 °C) e tempos (16 a 44 s) na pasteurização de sucos de tangerina, observando que o teor de ácido ascórbico foi reduzido somente quando o suco foi tratado a 100 °C, comparado ao suco *in natura*, diferentemente dos carotenoides totais e da capacidade antioxidante, que reduziram em temperaturas menores, 88 e 90 °C, respectivamente.

Diante disso, pesquisadores vêm buscando novas alternativas para tratar os produtos processados de modo a manter a qualidade e a segurança alimentar do produto. Entre as tecnologias que vêm demonstrando bons resultados nas pesquisas, destacam-se as que usam alta pressão hidrostática, campo elétrico e plasma (WAN et al., 2009). O processamento por alta pressão hidrostática consiste na aplicação de altas pressões (100-1000 Mpa) transmitidas pela água durante um pequeno tempo, que pode ser de até 20 minutos (AGANOVIC et al., 2015). Por sua vez, o processamento por campo elétrico utiliza pulsos de alta densidade em temperaturas baixas ou moderadas (<60 °C). Esse método é utilizado principalmente em alimentos líquidos e tem demonstrado conservação do sabor fresco, cor e compostos sensíveis ao calor (WAN et al., 2009). O plasma é outra tecnologia que vem sendo estudada no processamento de alimentos. O plasma é formado por descargas elétricas produzidas pela aplicação de campos elétricos e/ou magnéticos numa atmosfera gasosa ou líquida. Ele é composto de elétrons, íons, partículas neutras energéticas e não-energéticas. Para isso, é utilizado um plasma em que a energia dos elétrons é muito superior à energia das demais espécies. Uma vez que o caráter desse plasma é mais químico e obtido na pressão atmosférica, ele é denominado de plasma frio atmosférico (WAN et al., 2009).

Pesquisas com aplicação do plasma têm mostrado bons resultados tanto na inativação de microrganismos quanto na manutenção das características físico-químicas de diversos produtos alimentícios, porém ainda são necessários muitos estudos para aperfeiçoamento do uso da tecnologia do plasma em alimentos (LAROUSSE; LEIPOLD, 2004; YU et al., 2005; SHI et al., 2011; MELO, 2015; ALMEIDA et al., 2016; AMINI; GHORANNEVISS, 2016).

Assim, este trabalho objetivou avaliar a segurança microbiológica, a qualidade físico-química e o potencial antioxidante do suco integral de laranja 'Lima' processado pelo método térmico convencional, utilizado na indústria, e compará-lo com o processamento a plasma em condições bem-sucedidas em nossa instituição, quando aplicadas para inativação de esporos de fungos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suco de Laranja

A laranja é a fruta mais produzida no Brasil. De acordo com os dados da Produção Agropecuária Municipal realizada pelo IBGE, em 2017 a produção de laranja chegou aos 17,5 bilhões t. O Brasil não é apenas um grande produtor de laranja, como também um grande exportador de suco de laranja. Em 2016, a exportação brasileira deste suco congelado não fermentado, incluindo o suco de laranja concentrado, o néctar de fruta e outros sucos, atingiu 2,3 milhões de toneladas, com uma receita bruta de US\$ 1,9 milhão, tendo como maiores importadores países como os Estados Unidos, Bélgica e Holanda (CONAB, 2017).

O suco é um produto de grande aceitação em todo o mundo, consumido preferencialmente durante os lanches no Japão e na Rússia, em refeições principais no Brasil, e como bebida esportiva na China. É consumido em casa, na escola, no trabalho, nos pontos de venda de alimentos e nos mais diversos ambientes (CITRUSBR, 2017).

O Brasil apresenta o maior percentual de pessoas que consomem suco diariamente, 51%, seguido dos Estados Unidos (45%), Reino Unido (42%) e Japão (29%). Dentre os sucos, o de laranja é o preferido pelos consumidores: em 2015, foram vendidos 6,9 bilhões de litros, o que corresponde a 46% do mercado de suco integral (CITRUSBR, 2017).

O suco de laranja proporciona aos consumidores alguns benefícios, por isso é bastante consumido, alguns estudos com testes *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado eficiência na imunização contra alergias, doenças cardiovasculares e câncer (OLIVEIRA et al., 2006).

2.1.1 Qualidade físico-química e compostos bioativos

As características de qualidade mais avaliadas em sucos de laranja são: cor, pH, sólidos solúveis, acidez titulável, relação sólidos solúveis/acidez titulável, açúcares e compostos antioxidantes como vitamina C, polifenóis, carotenoides e flavonoides (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; SHI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2015; TRIVELATO et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017).

A cor é um atributo de qualidade bastante estudado para avaliar a aparência de sucos, pois muitas vezes os tratamentos empregados nos mesmos podem alterá-la (ALMEIDA et al., 2015; MELO, 2015; KOVACEVIC et al., 2016; XIANG et al., 2018). Uma das formas de avaliar a cor é uso do colorímetro, equipamento que libera um *flash* sobre a amostra estudada,

permitindo avaliar luminosidade, croma e ângulo Hue, ou seja, permite avaliar se o produto está mais claro ou escuro, se apresenta maior ou menor saturação, bem como a cor ao olho humano; respectivamente (MINOLTA, 2007). A cor do suco de laranja depende da variedade da fruta e geralmente varia de laranja a amarelo (ALMEIDA et al., 2015).

O potencial hidrogeniônico (pH), outra variável sempre avaliada, indica o inverso da concentração de íons de hidrogênio em um produto. Os ácidos orgânicos e os ácidos fracos presentes na célula contribuem na medida do pH. Quando associados com os sais de potássio presentes nas células, estes ácidos realizam efeito tampão, importante na atividade enzimática e na estabilidade do pH. Os sucos, quando produzidos, apresentam células das frutas de origem e continuam desenvolvendo a capacidade tampão, permitindo, portanto, grande variação na acidez porém pouca variação no pH (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O suco de laranja ‘Lima’ apresenta pH mais alto do que sucos de outras variedades, conferindo-lhe baixa acidez (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

Quanto aos sólidos solúveis em alimentos, estes compreendem todos os sólidos dissolvidos no meio aquoso, tendo o açúcar como um dos principais constituintes. Os sólidos solúveis variam conforme a espécie, a cultivar, o estágio de maturação e o clima do local de produção dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Por sua vez, a relação entre os sólidos solúveis e a acidez titulável, também chamada de *ratio*, determina o balanço do sabor doce ou ácido. O suco de laranja ‘Lima’, diferentemente dos sucos de laranja de outras variedades, apresenta *ratio* mais elevado, o que está diretamente relacionado à sua baixa acidez, pois a quantidade de sólidos solúveis é bem próxima aos de outras variedades de laranja, como a ‘Pera’, ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Bahia’ (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

Os açúcares totais, redutores e não-redutores são parâmetros de qualidade utilizados com frequência para avaliar produtos hortícolas. Eles são constituídos por sacarose (não-redutor), glicose e frutose (redutores), podendo ser quantificados por métodos indiretos, como o refratométrico, que expressa a quantidade de sólidos solúveis, ou por métodos diretos, representados por espectrofotometria, cromatografia e polarimetria (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Diversos trabalhos apresentam avaliação dos açúcares em sucos de laranja, em virtude da sua importância para o consumidor, e esse atributo pode diminuir ou aumentar de acordo com o tratamento aplicado no suco (KLIMCZAK et al., 2007; ALMEIDA et al., 2015; TRIVELATO et al., 2016).

Com relação aos compostos bioativos, a vitamina C é um dos principais para o organismo humano, atuando como antioxidante, ativador do sistema imunológico e preventivo de inflamações. Os alimentos de origem vegetal são fontes de vitamina C, que

deve ser consumida diariamente, já que não é sintetizada pelo corpo humano. As frutas cítricas são as principais fontes de vitamina C, pois apresentam alto consumo na comparação com as demais frutas (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O suco de laranja ‘Lima’ apresenta em média 41,30 mg/100 g de vitamina C, quantidade inferior a sucos de outras variedades de laranja, como da Terra 44,3 mg/100 g; Pera 73,3 mg/100 g; e Baía 94, 5 mg/100 g (TACO, 2011).

Quanto à estabilidade, há diminuição durante o armazenamento em muitos produtos. Um dos motivos é a ação de enzimas como ácido ascórbico oxidase ou enzimas oxidantes. A vitamina C pode ser encontrada em vegetais como ácido ascórbico ou ácido deidroascórbico, podendo se transformar em ácido 2,3-dicetogulônico, sem exercer função biológica como vitamina (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os carotenoides também são compostos bioativos dos frutos encontrados nos sucos de laranja. São biossintetizados na rota dos metabólicos secundários, derivando do ácido mevalônico. A rota de síntese dos carotenoides pode ser afetada por diversos fatores, tais como disponibilidade de nutrientes, tipo de solo, falta de água, temperatura, luz solar, época de cultivo, período de colheita e maturação dos frutos (DUTRA et al., 2012). A degradação dos carotenoides pode acontecer por isomerização e/ou oxidação; alguns fatores responsáveis são: luz, calor, ação enzimática e oxidação promovida por peróxido proveniente da oxidação lipídica (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Os carotenoides desempenham importante papel nos parâmetros de qualidade de frutas e vegetais, pois são pigmentos de alta frequência nesses organismos. Além disso, os carotenoides propiciam grandes benefícios à saúde, apresentando alta capacidade antioxidante, agentes anticancerígenos e pró vitamina A (PALIYATH et al., 2008).

A maior parte da cor amarela dos alimentos é atribuída aos carotenoides, porém, em alguns alimentos, o amarelo se deve à presença de flavonoides, com exclusão das antocianinas. Os flavonoides amarelos conferem cor branca e amarela aos alimentos (DAMODARAN et al., 2010). Além da influência na cor dos alimentos, os flavonoides, juntamente com a vitamina C, são os principais antioxidantes dos citros (KLIMCZAK et al., 2007). Os flavonoides pertencem à classe dos compostos fenólicos, estes são caracterizados pela presença de um anel aromático (C6) e um ou mais grupos hidroxila. Nas plantas, os polifenóis são responsáveis pela adaptação à mudança do meio biótico e abiótico; pela defesa ao ataque de herbívoros e patógenos, bem como pela interação com moléculas-sinal para interagir com o ambiente (PALIYATH et al., 2008). Em frutos, os polifenóis contribuem para

expressão do *flavor*, coloração, vida de prateleira e atividade antioxidante (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Conforme mencionado, o suco de laranja apresenta alguns compostos bioativos responsáveis por desenvolver atividade antioxidante, com a função de retardar ou evitar a oxidação de alguns compostos, seja no próprio vegetal ou no organismo humano. O organismo humano sintetiza alguns compostos antioxidantes, porém ainda se faz necessária a ingestão adicional por meio dos alimentos. Com base na importância dos compostos antioxidantes, sua atividade tem sido frequentemente estudada (KLIMCZAK et al., 2007; COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; ALMEIDA et al., 2015).

2.1.2 Legislação para produção de sucos

De acordo com a Lei nº 8.918, de julho de 1994, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que dispõe sobre a padronização de bebidas, o suco é uma bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da parte comestível da fruta por meio de processo tecnológico adequado. De acordo com a mesma lei, existem algumas classificações e ressalvas para sucos, devendo ser informados ao consumidor por meio do rótulo do produto o tipo de suco e suas respectivas características:

- O suco não pode conter substâncias estranhas no produto de origem;
- Não é permitida adição de aromas e corantes artificiais;
- Poderá conter açúcar, conforme regulamento para cada tipo de suco;
- Poderá ser adicionado de dióxido de carbono;
- Poderá ser desidratado ou concentrado;
- O suco integral é aquele sem adição de açúcar e na sua concentração natural;
- O suco misto compreende a mistura das partes comestíveis de frutas e ou vegetais na composição do suco;
- Suco reconstituído é aquele concentrado ou desidratado diluído até a concentração do suco integral;
- Suco tropical é aquele obtido por meio da dissolução da fruta polposa de origem tropical em água potável ou em suco clarificado de fruta tropical por meio de processo tecnológico adequado;

- Suco tropical misto é obtido semelhantemente ao suco anterior, porém pode ser utilizada a mistura de várias polpas de frutas tropicais.

Além de todos os cuidados que devem ser tomados quanto às características físicas e físico-químicas no processamento do suco, alguns tratamentos ainda precisam ser aplicados nos sucos para que apresentem segurança microbiológica aos consumidores e maior vida de prateleira, sendo os mais comuns a pasteurização e a esterilização (POLYDERA et al., 2003).

2.2 Microrganismos patogênicos

Os alimentos são substratos onde se desenvolvem diversas espécies de microrganismos. A contaminação microbiana do alimento pode acontecer na matéria prima ainda no campo (frutos, hortaliças, cereais etc.) ou durante o processamento, devido às formas precárias de higiene dos equipamentos ou ainda dos operários. A contaminação microbiológica dos alimentos pode ser de natureza bacteriana, parasitária ou fúngica, e as patologias decorrentes são classificadas como infecções ou intoxicações (MALFEITO et al., 2000).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária na Resolução-RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001, estabelece para sucos pasteurizados e refrigerados padrões de qualidade apenas para os microrganismos Coliformes a 45 °C, com tolerância em uma amostra indicativa de 10 UFC/mL e *Salmonella* spp., ausente em 25 mL de amostra.

Na maioria dos estabelecimentos que vendem suco natural, não há fiscalização intensa, o que resulta na venda destes produtos em desacordo com a legislação. Analisando sucos de laranja *in natura* comercializados na cidade do Rio de Janeiro, Oliveira et al. (2006) isolaram 55 cepas de coliformes termotolerantes, sendo uma identificada como *Escherichia coli* e 54 como *Klebsiella pneumoniae*, além de verificarem que algumas amostras estavam impróprias para consumo, devido às altas concentrações de coliformes fecais. Yamada et al. (2014) também avaliaram sucos de laranja *in natura* de alguns pontos de venda, verificando que todas as amostras apresentavam contaminação com *E. coli*, além de estarem em desacordo com a legislação devido à grande quantidade de microrganismo.

Além da fiscalização da Anvisa (2001) sobre determinados microrganismos, como mencionado anteriormente, é importante se preocupar com outros microrganismos que podem ser encontrados em frutas, polpas e sucos, pois alguns deles podem causar sérios problemas de saúde (MALFEITO et al., 2000).

Fazio (2006), avaliando a qualidade microbiológica de 62 amostras de polpas de frutas de pontos comerciais, isolou e identificou 136 leveduras, sendo uma destas do gênero *Candida*. Da mesma forma, Soares et al. (2011), com o intuito de avaliar a qualidade microbiológica de sucos de laranja *in natura* comercializados em alguns estabelecimentos, observaram que todas as amostras apresentaram leveduras, 82% do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. pelliculosa* e *C. tropicalis*), 9% do gênero *Rhodotorula* (*R. glutinis*) e 9% pelo gênero *Geotrichum* (*G. candidum*). Segundo estes autores, as espécies *C. albicans* e *C. krusei* foram as mais encontradas e estes microrganismos são importantes agentes de infecções, principalmente em indivíduos imunodeficientes, também consumidores de suco de laranja. Diante da frequência de microrganismos encontrados em sucos, torna necessária a aquisição de tecnologias de tratamento eficientes, a fim de produzir um alimento seguro para o consumidor. Dentre os microrganismos contaminantes de sucos, a bactéria *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans* merecem destaque, pois são importantes causadores de doenças nos seres humanos.

2.2.1 *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885)

Escherichia coli é uma bactéria que habita no trato intestinal dos animais de sangue quente. Pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes (resistência a 45 °C), grupo de microrganismos fiscalizados pela legislação de alimentos. *E. coli*, assim como outras bactérias termotolerantes, apresenta a forma de bastonete, com tamanho de aproximadamente 1 µm, é do tipo Gram negativa, não forma esporos, é anaeróbio facultativo, fermenta lactose e produz gás quando incubada por um período de 24 a 48 horas em temperatura de 32 a 37 °C (SIQUEIRA, 1995; LEVINSON, 2016).

Normalmente, a *E. coli* é inofensiva, porém algumas linhagens são patogênicas. Essas bactérias podem se ligar às células epiteliais do intestino e liberar toxinas, causando distúrbios no sistema gástrico, denominado gastroenterite por *E. coli* (TORTORA et al., 2012). As cepas *E. coli* produtoras de toxina de Shiga são as patogênicas mais estudadas, pois são responsáveis por causar desde uma simples diarreia a uma diarreia sanguinolenta, podendo se tornar uma síndrome hemolítica urêmica e púrpura trombótica trombocitopênica, evoluindo ainda a danos crônicos, como falência renal (LUCATELLI, 2009) .

A contaminação desta bactéria nos alimentos é considerada de grande interesse na saúde pública, e os sucos de frutas constituem um dos principais meios de contaminação para o ser humano. *E. coli* pode vir a contaminar os sucos por meio da parte externa dos frutos, má

higiene dos equipamentos e, principalmente, da água utilizada no preparo (ADAM et al., 2015). Pequenos níveis de contaminação desta bactéria podem ocasionar infecção alimentar (BRITO; ROSSI, 2005), motivo pelo qual a Anvisa (2001) estabelece limite máximo de 10 UFC/mL em uma amostra de suco pasteurizado.

2.2.2 *Candida albicans* (Berkhout, 1923)

Candida albicans é um microrganismo unicelular classificado como levedura (fungo não filamentosos), apresenta estrutura oval e tamanho médio de 5 µm, maiores que as bactérias (TORTORA et al., 2012; LEVINSON, 2016). Algumas leveduras são benéficas, sendo utilizadas na indústria alimentícia, outras podem deteriorar alimentos e provocar doenças em vegetais e animais (SIQUEIRA, 1995).

Altos índices de fungos filamentosos e de leveduras em alimentos podem indicar condições de má higiene na cadeia de industrialização, seja causada por limpeza inadequada dos equipamentos, falha no processamento e/ou na estocagem ou matéria-prima altamente contaminada (SIQUEIRA, 1995).

A levedura *C. albicans* é um importante patógeno humano, podendo contaminar os produtos alimentícios por várias vias, entre elas as mãos, a boca, os cabelos e o nariz. Os manipuladores de alimentos precisam fazer uso das boas práticas de fabricação para garantir a qualidade e a segurança microbiológica dos produtos (SOARES et al., 2011).

É um patógeno presente em várias partes do corpo humano, incluindo a cavidade oral, partes do trato respiratório e gastrointestinal, além do sistema genital. Em algumas condições, principalmente em pessoas com baixa imunidade, este fungo pode causar sérias doenças e a cura dificilmente é alcançada, pois esse microrganismo possui alta e recorrente taxa de infestação (XIONG et al., 2010).

Apesar destes problemas, a quantificação da *Candida* em alimentos não é exigida pela legislação, diferentemente da bactéria *E. coli*, a qual pertence ao grupo dos coliformes e sua análise é obrigatória de acordo com a Resolução Nº 12, que trata da segurança microbiológica de alimentos diversos (ANVISA, 2001).

2.3 Inativação dos microrganismos

Para assegurar a qualidade microbiológica dos alimentos, os processos térmicos são os mais tradicionais (WAN et al., 2009), porém, apesar de causar benefícios ao consumidor por

destruir patógenos e inativar enzimas indesejáveis nos produtos, também causa perdas de alguns nutrientes, como vitaminas, principalmente da vitamina C e tiamina (SUCUPIRA et al., 2012).

Diante disso, novas tecnologias estão sendo estudadas com intuito de melhorar a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos, sem alterar as características nutricionais, funcionais e sensoriais. Estas tecnologias são dependentes de processos físicos, tais como alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado e plasma frio, que inativam microrganismos a temperaturas ambiente ou moderadamente elevadas em curto tempo (WAN et al., 2009).

2.3.1 Tecnologia do Plasma

O plasma é constituído por gás parcialmente ionizado cuja carga no volume total é zero. Alguns autores afirmam que ele pode ser considerado o quarto estado da matéria porque possui propriedades que não são de gases nem de líquidos. Quando o plasma é utilizado em baixa temperatura, ou seja, a energia dos elétrons é muito maior que a energia média das demais espécies, sua aplicação se faz principalmente em materiais biológicos e outros termos sensíveis ou de alta pressão de vapor. Plasma térmico é utilizado principalmente em processos industriais, incluindo microeletrônicos e indústria automotiva. Atualmente, a aplicação de plasmas tem ocorrido a baixas temperaturas e pressões atmosféricas principalmente para produtos sensíveis ao calor (WAN et al., 2009).

Para se converter um gás neutro em plasma, é necessária a aplicação de energia, seja na forma de campos térmicos, elétricos ou magnéticos, bem como frequências de rádio ou micro-ondas, que aumenta a energia cinética dos elétrons livres presentes no gás. A colisão desses elétrons com átomos/moléculas e demais espécies resulta na formação de produtos de plasma, como elétrons, íons, radicais e radiações variáveis (WAN et al., 2009).

Alguns íons são formados no plasma pela mistura do nitrogênio, oxigênio e dióxido de carbono, entre eles O , O^2 , N^+ , N^{2+} , N^{2-} , O^+ , O^{2+} , NO^+ , CO^{2+} , radicais livres e espécies intermediárias altamente reativas (KOGELSCHATZ, 2007). Além destes íons, na presença de água são formadas espécies reativas, como H_2O^+ , H , OH , HO^2 , além de íons de *cluster* contendo H_2O , com geração da radiação UV nos intervalos de 10 a 290 nm de comprimento de onda (LAROUSSE, 2005).

O contato dessas diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com os microrganismos resulta em morte ou lesão deles. Estas espécies reativas reagem com

macromoléculas microbianas, entre elas lipídeos de membrana, proteína e ácido nucleico, afetando a estrutura externa e/ou interna desses seres vivos (LAROUCSI; LEIPOLD, 2004; YU et al., 2005; SHI et al., 2011).

Bons resultados têm sido obtidos por vários autores com a aplicação do plasma em diversos alimentos. Shi et al. (2011) – utilizando protótipo que gera plasma frio por meio DBD em ar atmosférico, a uma tensão de 30 kV e frequência de 60 kHz; em estudos com suco de laranja recém-espremido e inoculado com os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, após 12, 8 e 25 segundos de tratamento, respectivamente – verificaram redução de mais de cinco ciclos logarítmicos (logs) no número de contagem de cada microrganismo, além da manutenção da qualidade do suco.

Estudando a aplicação de plasma frio gerado em modelo DBD a 70 kV e 50 Hz em ar atmosférico, com distância entre eletrodos de 22 mm, Almeida et al. (2015) verificaram em suco prebiótico de laranja que o processamento por plasma não degradou o fruto-oligossacarídeo utilizado e preservou a cor e atividade antioxidante do suco, resultados relevantes para os sucos prebióticos.

Melo (2015), também trabalhando com suco tratado com jato de plasma frio gerado por meio DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio com 2 L/min de vazão, verificou em suco de uva ‘Isabel’ que a qualidade físico-química e microbiológica foi mantida, não apresentando, no tratamento com 2 minutos de exposição ao plasma com distância de 1 cm entre a ponta do bocal do plasma e a amostra, nenhuma colônia da bactéria, segundo o método empregado para *E. coli*, coliformes, mesófilos aeróbios, bolores e leveduras. Além disso, houve aumento significativo na concentração de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante.

Estudos com aplicação de jato de plasma frio, gerado com potência de 15 kV e frequência de 12 kHz utilizando gás argônio com 1 L/min de vazão, em nozes frescas, mostraram que 11 minutos de tratamento, com uma distância de 1,5 cm da amostra para o bico de injeção do plasma, causaram a eliminação completa de *Aspergillus flavus* que haviam sido inoculados. Após 15 e 30 dias de armazenamento a 4 °C, os autores afirmaram que o número de *A. flavus* foi insignificante nas amostras tratadas. Quanto ao conteúdo de fenólico total e atividade antioxidante, não houve diferença significativa, tanto para nozes secas quanto frescas (AMINI; GHORANNEVISS, 2016).

As pesquisas citadas têm sido encorajadoras para os estudos com a aplicação do plasma em suco de laranja ‘Lima’ realizados durante este trabalho.

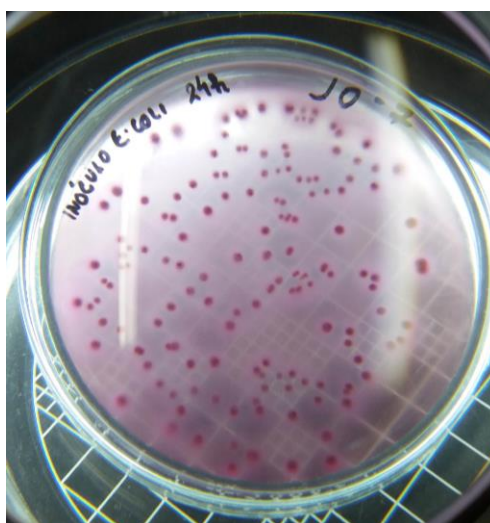
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo da análise microbiológica do suco de laranja

3.1.1 Obtenção dos microrganismos e preparo do inóculo

A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 foi obtida do Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O inóculo bacteriano foi preparado em meio de cultura caldo soja tripticaseína com incubação na incubadora da marca Marconi modelo MA-420, sob agitação e temperatura controlada a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia presentes no inóculo por meio do método padrão de contagem em placas contendo meio bÍlis vermelho-violeta (VRB) (TORTORA et al., 2012). A concentração do inóculo foi de $1,71 \times 10^{10}$ UFC/mL (Figura 1).

Figura 1 – *Escherichia coli* ATCC 25922 crescidas em meio de cultura ágar VRB.

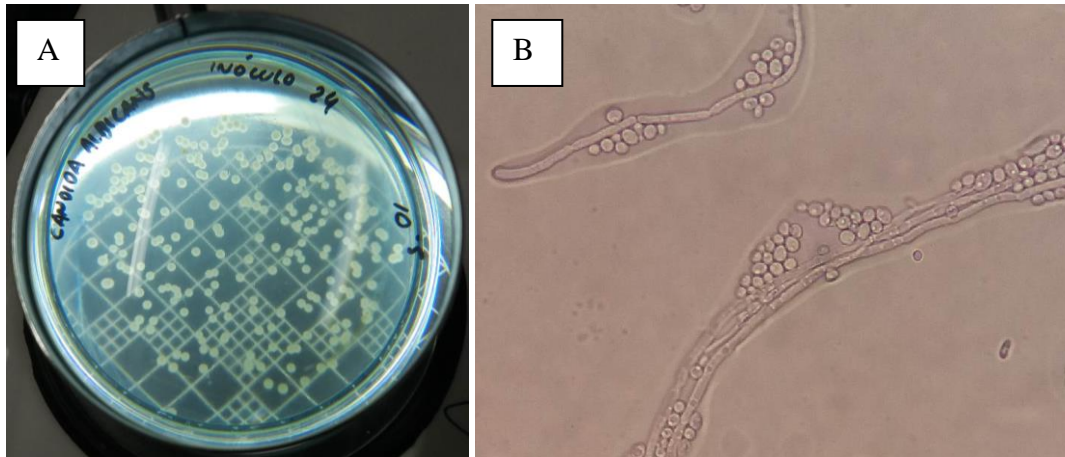


Fonte: Elaborado pelo autor.

A levedura *C. albicans* SC 5314 foi obtida do Laboratório Integrado de Biomoléculas da Universidade Federal do Ceará. O inóculo foi preparado em meio de cultura caldo de batata dextrose e incubado na incubadora da marca Marconi modelo MA-420, sob agitação e temperatura controlada a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Passado o período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia presentes no inóculo por meio do

método padrão de contagem em meio ágar batata dextrose (BDA) (TORTORA et al., 2012). A concentração do inóculo foi de $3,05 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 2).

Figura 2 - *Candida albicans* SC 5314 crescidas em meio de cultura BDA (A) e observadas entre lâmina e lamínula por meio de microscópio óptico na lente objetiva de 40 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2 Preparação do suco integral de laranja

As laranjas da variedade Lima foram adquiridas em supermercado na cidade de Mossoró. Foram lavadas com água e detergente, cortadas, espremidas e o suco foi passado em peneira para eliminar grânulos grandes (Figura 3). O suco foi autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Após o resfriamento do suco, foram realizadas a inoculação e ajuste das concentrações de microrganismos nos sucos utilizando os inóculos preparados anteriormente (item 3.1.1), seguindo a metodologia de Montenegro et al. (2002). As concentrações dos sucos foram ajustadas para $5,86 \times 10^3$ UFC/mL e $1,74 \times 10^4$ UFC/mL com *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente, realizou-se posteriormente a aplicação dos tratamentos.

Figura 3 – Limpeza dos frutos (A) e processamento para obtenção do suco integral (B).

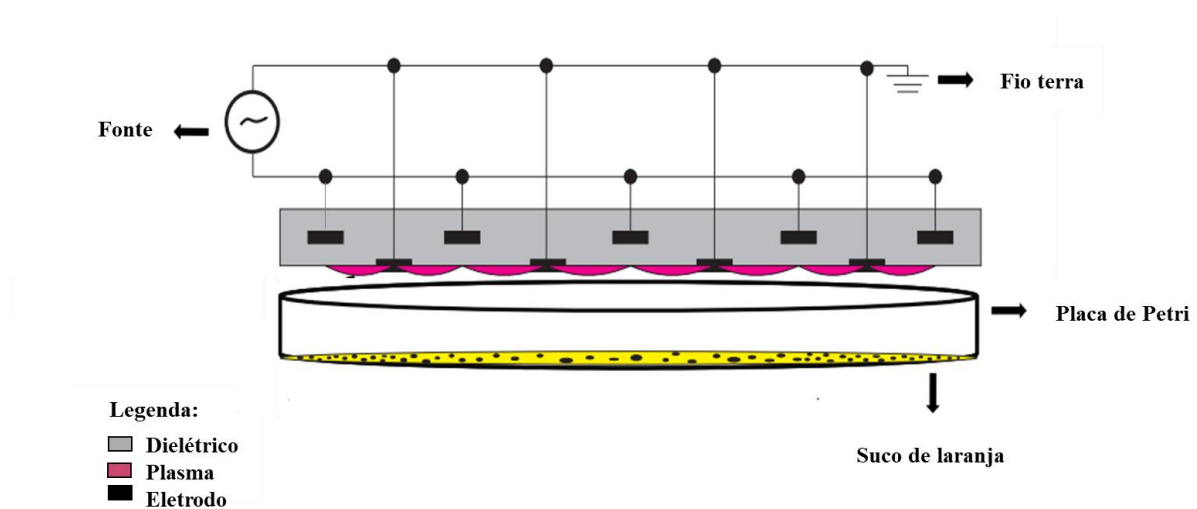


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.3 Geração do plasma atmosférico

Foi utilizado um protótipo experimental, conforme ilustrado na figura 4, desenvolvido por uma equipe de pesquisadores do Laboratório de Processamento de Materiais por Plasma (LABPLASMA) do Centro Integrado de Inovação Tecnológica do Semiárido (CITED) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). O aparato gera plasma por meio de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD), numa tensão de 14 kV e frequência de 400 Hz utilizando o ar atmosférico.

Figura 4 – Ilustração do protótipo experimental com modelo de aplicação de plasma DBD, tensão de 14 kV e frequência de 400 Hz.



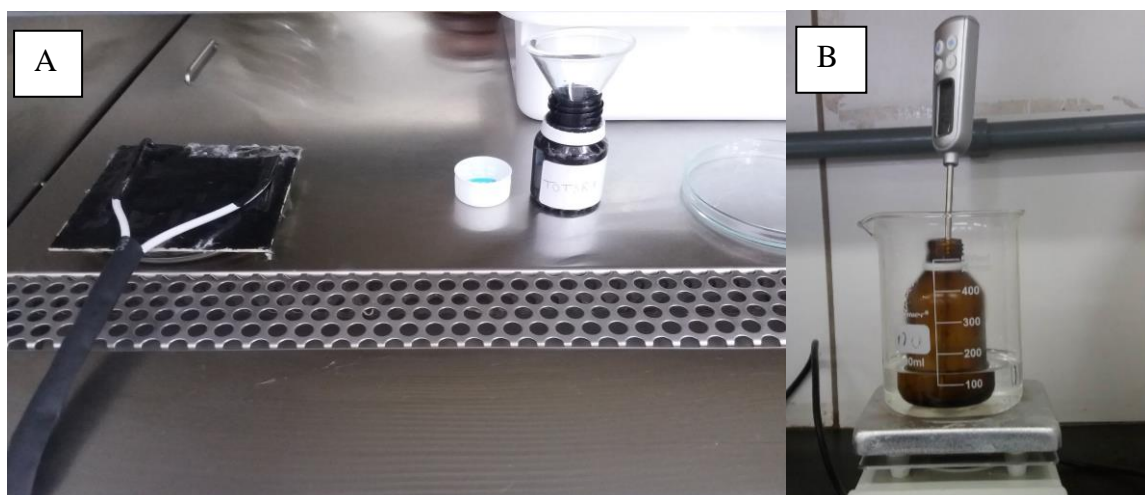
3.1.4 Aplicação dos tratamentos

Após o ajuste das concentrações de microrganismo no suco, foram aplicados os tratamentos, selecionados por meio de pré-testes. O tratamento com o plasma foi realizado em câmara de fluxo laminar estéril adicionando 5 mL de suco em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro e 1 cm de altura), aberta e estéril. A descarga de plasma foi colocada sobre a placa de Petri contendo o suco por 1 minuto (Figura 5A). Para o tratamento térmico, foram depositados 50 mL de suco, em frascos de vidro âmbar estéreis, mantidos em banho-maria (Figura 5B) à temperatura de 87 °C por 1 minuto. O tratamento térmico foi adotado como controle positivo devido à sua utilização na indústria de suco. O experimento contou ainda com um controle absoluto, representado pelo suco autoclavado, e um controle negativo, representado pelo suco apenas adicionado de microrganismo, sem aplicação de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Tratamentos empregados no suco de laranja ‘Lima’ para análises microbiológicas. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Quantidade de tratamentos	Tratamentos
1	Suco adicionado de microrganismo (controle negativo)
2	Suco tratado com plasma (5 mL/1min)
3	Suco tratado termicamente - Controle positivo (87 °C/1 min)
4	Suco autoclavado (controle absoluto)

Figura 5 – Aplicação de plasma DBD utilizando ar atmosférico, 14 kV e 400 Hz (A) e tratamento térmico a 87 °C/1 min (B), ambos em suco de laranja ‘Lima’.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.5 Análises microbiológicas

O suco inoculado com *E. coli*, após passar pelos tratamentos, foi plaqueado em meio de cultura VRB. O suco inoculado com *C. albicans*, após os tratamentos, foi plaqueado em meio de cultura BDA. Ambos os microrganismos foram incubados à temperatura de 36 ± 1 °C, em B.O.D. por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (SIQUEIRA, 1995).

3.1.6 Análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os tratamentos foram aplicação de plasma e os controles: positivo (tratamento térmico), negativo (apenas o suco inoculado) e absoluto (suco autoclavado). Os dados foram avaliados no programa estatístico R versão 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018) pelo teste de Kruskal-Wallis; para comparação das médias, utilizou-se o teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade.

3.2 Preparação do suco integral de laranja para as análises físico-químicas e compostos bioativos

As laranjas da variedade Lima foram adquiridas em supermercado na cidade de Mossoró, lavadas com água e detergente neutro e desinfetadas com água clorada a 100 ppm por 10 minutos. Em seguida, as frutas foram cortadas, processadas em processador doméstico para citros e o suco foi passado em peneira para eliminar grânulos grandes (Figura 3).

3.2.1 Aplicação dos tratamentos

Após o preparo do suco, foram aplicados os tratamentos como descrito no item 3.1.4. A etapa de esterilização do suco não foi realizada para as avaliações nutricionais. Os tratamentos foram aplicação de plasma, tratamento térmico (controle positivo) e controle absoluto (suco apenas extraído das frutas) (Tabela 2). O suco foi armazenado em frascos fechados de cor âmbar, cada frasco continha 25 mL de suco, sendo a capacidade do frasco 30 ml (Figura 6). Estes foram mantidos em geladeira à temperatura de 2 ± 1 °C e umidade relativa de $53 \pm 3\%$ por 16 dias, sendo analisados no dia do processamento e a cada quatro dias.

Tabela 2 – Tratamentos empregados no suco de laranja ‘Lima’ para análises físico-químicas e compostos bioativos. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Quantidade de tratamentos	Tratamentos
1	Suco <i>in natura</i> (controle absoluto)
2	Suco tratado com plasma (5 mL/1 min)
3	Suco tratado termicamente - controle positivo (87 °C/1 min)

Figura 6 – Frasco utilizado no armazenamento do suco de laranja ‘Lima’.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.2 Análises físico-químicas

3.2.2.1 Cor

A cor foi analisada adicionando 15 mL do suco em placa de Petri aberta sobre um papel branco por meio de um colorímetro da marca Konica Minolta (CHROMA METER CR-410). Foram realizadas leituras nas medidas de L (luminosidade - brilho, claridade ou refletância), C (croma – saturação ou intensidade da cor) e H (ângulo Hue - tonalidade) (MINOLTA, 2007).

3.2.2.2 pH

O pH foi medido diretamente na amostra, utilizando medidor de pH de bancada da marca mPA – 210 (AOAC, 2002).

3.2.2.3 Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis foram medidos depositando três gotas de suco na lente do refratômetro digital da marca Refractive index (13330 – 14098) (AOAC, 2002).

3.2.2.4 Acidez titulável

Para a determinação da acidez titulável, foram pesados 0,5 g de suco em erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se 50 mL de água destilada e três gotas de fenolftaleína 1% como indicador, seguido de titulação por titulometria com NaOH 0,1 N até a viragem para cor rósea claro, com permanência da cor por 15 segundos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.2.2.5 Relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT)

Esta relação foi feita dividindo os valores de sólidos solúveis pelos valores de acidez titulável.

3.2.2.6 Açúcares totais

Para determinação de açúcares totais, foi feito um extrato, pesando-se 0,5 g de amostra e completando um balão volumétrico de 50 mL com água destilada. O conteúdo do balão foi

filtrado em papel de filtro e foi retirada alíquota de 40 μ L do filtrado, realizando-se a análise pelo método do Antrona, com o uso do espectrofotômetro a um comprimento de onda de 620 nm (YEMN; WILLIS, 1954).

3.2.2.7 Açúcares redutores

Para a determinação dos açúcares redutores, foi feito um extrato pesando-se 0,5 g de amostra e completando um balão volumétrico de 50 mL com água destilada. O conteúdo do balão foi filtrado em papel de filtro e foi retirada uma alíquota de 1000 μ L do extrato. Seguiu-se o método do reagente 3,5 - Dinitro – Salicílico (DNS) com o uso do espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959).

3.2.3 Compostos bioativos

3.2.3.1 Carotenoides totais

Foram pesados 5 g de amostra para extração dos carotenoides por meio da metodologia proposta por Higby (1962), com uso do espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm.

3.2.3.2 Flavonoides amarelos

Para a determinação dos flavonoides amarelos, foi pesado 1 g de amostra e adicionada uma solução de Etanol-HCl (1,5 N) (85:15%) para extração dos compostos bioativos. Seguiu-se a metodologia de Francis (1982), utilizando espectrofotometria com comprimento de onda de 374 nm.

3.2.3.3 Polifenóis extraíveis totais

Para a determinação dos polifenóis, foi preparado um extrato pesando-se 10 g da amostra. Em seguida, foi realizada a extração dos compostos com álcool metílico 50% e acetona 70%, seguindo a metodologia descrita por Larrauri et al. (1997) e realizando as leituras em espectrofotômetro a 700 nm.

3.2.3.4 Vitamina C

Foram pesados 0,5 g da amostra e adicionado ácido oxálico 0,5% gelado e completado um balão de 25 mL. Filtrou-se o conteúdo do balão em papel filtro, retirou-se uma alíquota de 5 mL do filtrado para Erlenmeyer de 125 mL e foram adicionados 45 mL de água destilada. Em seguida, foi titulado com solução de Tillman gelada até viragem rósea claro, com permanência da cor por 25 segundos (STROHECKER; HENNING, 1967).

3.2.3.5 Atividade Antioxidante pela captura do radical ABTS^{·+}

Inicialmente, foram preparados extratos pesando-se 10 g da amostra e adicionando-se reagentes extratores, álcool metílico 50% e acetona 70%. Em seguida, tomou-se 30 µL deste extrato, adicionou-se 3 mL do radical ABTS^{·+} e, após seis minutos, realizou-se as leituras em espectrofotômetro a 734 nm (RUFINO et al., 2006).

3.2.4 Análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 5, com cinco repetições. O primeiro fator representa os tratamentos aplicados no suco (aplicação de plasma e os controles positivo e absoluto). O segundo fator representa os tempos nos quais o suco foi analisado durante o armazenamento (0, 4, 8, 12 e 16 dias). Os dados foram avaliados no programa estatístico R versão 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018), por meio de análise de variância (ANAVA) e teste de Tukey para comparação das médias a 5% de probabilidade.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Análises microbiológicas do suco de laranja

4.1.1 *Escherichia coli*

O suco de laranja ‘Lima’ inoculado com *E. coli*, depois de ser tratado com o plasma, apresentou menor quantidade de UFC/mL do que o suco controle negativo (suco adicionado de bactéria que não passou por nenhum tratamento), com diferença significativa entre eles. O plasma foi capaz de inativar 16,72% das bactérias contidas no suco. Porém, o suco controle positivo (suco adicionado de bactéria e tratado termicamente) não apresentou UFC/mL em contagem real, sendo igual estatisticamente ao controle absoluto (suco autoclavado) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número médio de UFC de *E. coli* ATCC 25922 em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Tratamentos	UFC/mL
Suco não tratado (controle negativo)	17,4 (5,86 x 10 ³) a
Suco tratado com plasma	13,6 (4,88 x 10 ³) b
Suco tratado termicamente (controle positivo)	5,5 (0) c
Suco autoclavado (controle absoluto)	5,5 (0) c

Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade. Valores referentes a UFC/mL são “rank” médios obtidos da análise não paramétrica (valores reais estão entre parênteses).

A legislação brasileira estabelece uma quantidade máxima de coliformes fecais de 10 UFC/mL em sucos pasteurizados. Considerando esta referência, somente o suco que passou pelo tratamento térmico (controle positivo) e o suco autoclavado (controle absoluto) são indicados para o consumo, levando em consideração a qualidade microbiológica.

Segundo Majumdar et al. (2009), o efeito bactericida do plasma provavelmente ocorre por meio de choques ou tensões elétricas que rompem a parede celular. Além disso, a radiação UV, aliada aos demais produtos de plasma, induz o rompimento das ligações químicas, aumentando a taxa de morte bacteriana.

Shi et al. (2011), usando um protótipo que gera plasma por meio DBD, a uma tensão de 30 kV e frequência de 60 kHz, observaram apenas 1 UFC/50 µL de suco, redução de mais de cinco logs da bactéria *E. coli* (ATCC 8039), quando trataram 50 µL de suco de laranja por 8 segundos.

Montenegro et al. (2002) também analisaram a influência do plasma frio na inativação de bactérias. O isolado *E. coli* O157:H7 foi inoculado em suco de maçã estéril, em seguida foram aplicados pulsos de plasma não térmico. Os autores concluíram que a melhor inativação, redução de mais de cinco logs da bactéria, ocorreu quando se utilizou uma frequência de 100 Hz, com 4000 pulsos de 9000 V, o que pode ser alcançado em 40 segundos.

Amostras de leite inoculadas com *E. coli* (KCTC 1682) foram estudadas por Kim et al. (2015). Foi aplicado plasma por descarga de barreira dielétrica encapsulada em pressão atmosférica numa tensão de 250 W e frequência de 15 kHz durante cinco e dez minutos. A maior eficiência ocorreu na aplicação de plasma durante 10 min, com inativação de 3,85 log UFC/mL de bactéria.

Como citado anteriormente, alguns autores, em experimentos envolvendo a aplicação de plasma frio em bactérias *E. coli*, obtiveram maior inativação das bactérias. De acordo com Wan et al. (2009), é necessária energia para a formação do plasma, a qual permite que os elétrons dos átomos de gás colidam e gerem produtos de plasma. Neste sentido, se compararmos a potência do aparato utilizado no presente trabalho com a potência dos aparatos utilizados por Shi et al. (2011), Montenegro et al. (2002) e Kim et al. (2015), podemos perceber que o aparato utilizado neste trabalho possui menor potência ou menor quantidade de energia inserida no sistema. Isto pode ter ocasionado menor colisão dos átomos presente no gás atmosférico e, conseqüentemente, menor formação de produtos de plasma e menor interação destes produtos com as bactérias. Além do fator potência, existem outros fatores como: fluxo de gás inserido no sistema, quantidade de amostra tratada e distância entre amostra e plasma, que podem interferir na inativação dos microrganismos pelo plasma. Estes fatores podem ter contribuído para a baixa inativação da bactéria no tratamento do suco de laranja utilizando o plasma.

4.1.2 *Candida albicans*

O suco de laranja 'Lima' inoculado com *C. albicans*, após ser tratado com o plasma, não apresentou diferença estatística, apesar de apresentar menor quantidade de UFC/mL, inativação de 11,94%, se comparado com o suco controle negativo (suco adicionado de

levedura que não passou por nenhum tratamento). O suco controle positivo (suco adicionado de levedura e tratado termicamente) não apresentou nenhuma UFC do fungo, sendo semelhante ao controle absoluto (suco estéril). Portanto, o controle positivo foi igual estatisticamente ao controle absoluto e diferente dos demais tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Número médio de UFC de *C. albicans* ATCC SC 5314 em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Tratamentos	UFC/mL
Suco não tratado (controle negativo)	16,4 (1,74 x 10 ⁴) a
Suco tratado com plasma	14,6 (1,53 x 10 ⁴) a
Suco tratado termicamente (controle positivo)	5,5 (0) b
Suco autoclavado (controle absoluto)	5,5 (0) b

Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade. Valores referentes a UFC/mL são “rank” médios obtidos da análise não paramétrica (valores reais estão entre parênteses).

As normas brasileiras não trazem padrão de contagem microbiana para leveduras, porém estes microrganismos deterioram os alimentos e podem ser comensais ou patogênicos para os seres humanos, o que torna interessante a preocupação com as leveduras, inclusive *C. albicans* (SIQUEIRA, 1995; SOARES et al., 2011).

Alguns autores sugerem que o modo de ação do plasma para inativar fungos se deve à destruição ou deformação de estruturas ou partes deles, como parede celular e membrana celular de esporos, micélio e organelas, ocasionando vazamento do citoplasma e do conteúdo celular, bem como também a degeneração e oxidação de proteínas e de moléculas de DNA no citoplasma (XIONG et al., 2010; YE et al., 2012; LU et al., 2014; KANG, et al., 2014).

Xiong et al. (2010) observaram a influência do jato de plasma gerado numa voltagem de 8 kV, frequência de 9 kHz e um fluxo de gás hélio de 2 L/min sobre *C. albicans*. Uma quantidade desconhecida de solução esporica numa concentração de 10⁷ UFC/mL foi espalhada em placas de Petri contendo meio de cultura. Após 8 min de tratamento, houve inativação de 99,9% das UFC/mL de *C. albicans*, tratadas em placa de Petri tampada, ao passo que em placa de Petri aberta à inativação foi de pequenas frações, aplicando um jato de plasma também de 8 min, resultado interessante comparado com o encontrado neste trabalho,

quando o suco de laranja com *Candida* foi tratado com plasma em placa de Petri aberta, no qual foi verificada baixa inativação deste microrganismo.

Shi et al. (2011) também obtiveram alta inativação da *Candida* em suco de laranja, quando utilizaram um protótipo que gera plasma por meio DBD e gás atmosférico a uma tensão de 30 kV e frequência de 60 kHz. Shi et al. (2011) observaram apenas 1 UFC/50 µL de suco, uma redução de mais de 5 logs da levedura *C. albicans* (ATCC 10231) quando trataram 50 µL de suco de laranja por 25 segundos.

Klämpfl et al. (2012), também trabalhando com a inativação da *Candida* e algumas bactérias, investigaram a influência do plasma frio sobre a esterilização destes microrganismos. Estes autores avaliaram a aplicação de microdescargas de plasma gerado em aparato com tensão de 10 kV_{pp}, frequência de 1 kHz e operando em ar atmosférico sobre 15 cepas bacterianas e *C. albicans* (ATCC 90028). Uma alíquota de 100 µL de solução com esporos foi espalhada em placas de Petri contendo meio de cultura, em seguida as placas foram tratadas por plasma durante 30 s. Os pesquisadores verificaram inativação de aproximadamente 4 logs da levedura, verificando-se, entretanto, maior inativação das bactérias estudadas.

Como citado nos parágrafos anteriores, autores como Xiong et al. (2010), Shi et al. (2011) e Klämpfl et al. (2012) obtiveram maior inativação do que a alcançada neste trabalho, quando aplicaram descargas de plasma em *Candida*. Assim como já discutido no item 4.1.1 a respeito da inativação da bactéria *E. coli* no suco de laranja tratado pelo plasma neste trabalho, foi verificado que os mesmos fatores – potência do aparato, fluxo de gás inserido no sistema, distância entre amostra e plasma, e quantidade de amostra tratada – podem ter interferido na inativação da *Candida*.

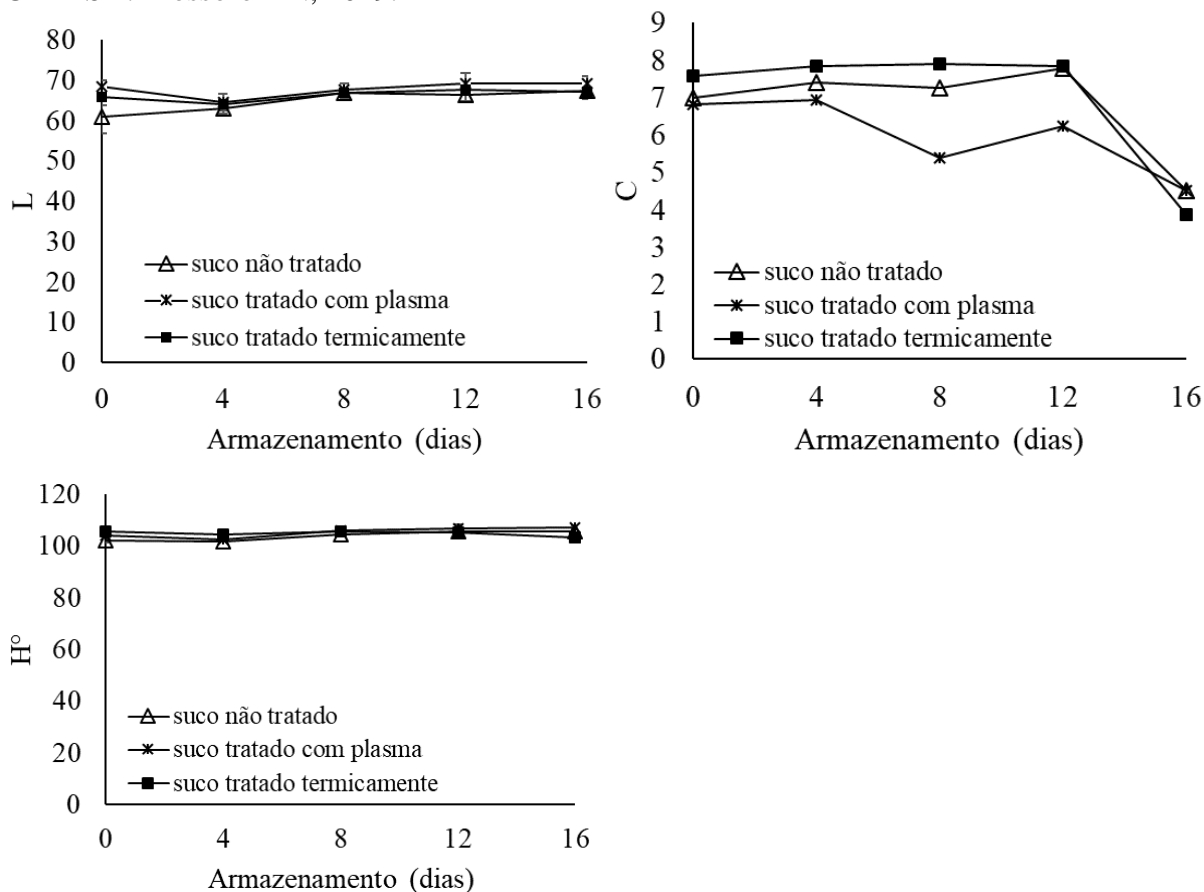
4.2 Análises físico-químicas

4.2.1 Cor

Quanto ao parâmetro cor, para a medida de luminosidade (L) houve interação significativa entre as formas de tratamento do suco e o armazenamento (Figura 7). A medida de luminosidade da amostra indica que números mais próximos de 0 tendem para o preto (escuro) e números mais próximos de 100, para o branco (claro). As formas de tratar o suco influenciaram na luminosidade no dia do processamento (tempo zero), ou seja, tornaram o

suco mais claro do que o não tratado; nos demais dias de avaliação, 4, 8, 12 e 16 dias, os tratamentos não influenciaram a luminosidade do suco.

Figura 7 – Valor médio de cor em luminosidade (L), croma (C) e ângulo Hue (H°) em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenados a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



Entretanto, avaliando apenas o suco controle absoluto no decorrer do armazenamento, observou-se que no dia do processamento a luminosidade era menor do que no último tempo de avaliação. Para o suco tratado pelo plasma, temos que aos quatro dias de armazenamento a luminosidade apresentava menor valor do que nos demais dias de avaliação. Quanto à luminosidade do suco tratado termicamente, se diferenciaram os valores dos sucos do 4º e o 12º dias.

Para a medida de croma (C), foi observada diferença significativa apenas aos 8 e 12 dias de armazenamento no suco tratado com plasma, com menor valor do que os demais sucos, ou seja, uma cor com menos saturação. Avaliando os sucos durante o armazenamento, foi observado que no último dia de avaliação os valores de croma foram menores do que os valores das avaliações anteriores, para todos os tratamentos (Figura 7).

Com relação ao ângulo Hue (H), houve interação significativa entre os tratamentos aplicados e o armazenamento (Figura 7). O ângulo Hue representa a cor da amostra e nesse trabalho o suco de laranja apresentou valores próximos a 100° , o que representa a faixa de cor amarelo.

No dia do processamento (tempo 0), o suco tratado termicamente apresentou maior valor, seguido do suco tratado pelo plasma. No final do armazenamento foi observado que o suco tratado com o plasma apresentou maior valor de ângulo Hue, seguido do suco controle absoluto.

O suco controle absoluto apresentou menores valores de ângulo Hue no início do armazenamento e maiores valores no final, o que também se observou no suco tratado pelo plasma. Por sua vez, o suco tratado termicamente apresentou maior valor de ângulo Hue no dia do processamento e menor valor no final do armazenamento, inversamente ao observado nos demais sucos.

De maneira geral, os sucos sofreram leve alteração na cor após a aplicação dos tratamentos térmico e plasma.

Almeida et al. (2015), quando estudaram a influência do plasma no suco de laranja, observaram mudança significativa nas medidas de cor do suco após 15, 30, 45 e 60 segundos de exposição ao plasma gerado em modelo DBD a 70 kV e 50 Hz em ar atmosférico, não sendo possível perceber alteração visual da cor, como também não foi possível observar no presente trabalho.

Xiang et al. (2018), avaliando sucos de maçã expostos ao plasma, observaram alteração na cor. Os autores utilizaram plasma DBD numa potência de 90 W, com duração variando de 40 a 200 segundos sobre o suco de maçã. Os valores de croma diminuíram, os valores de ângulo Hue aumentaram e a luminosidade não sofreu alteração.

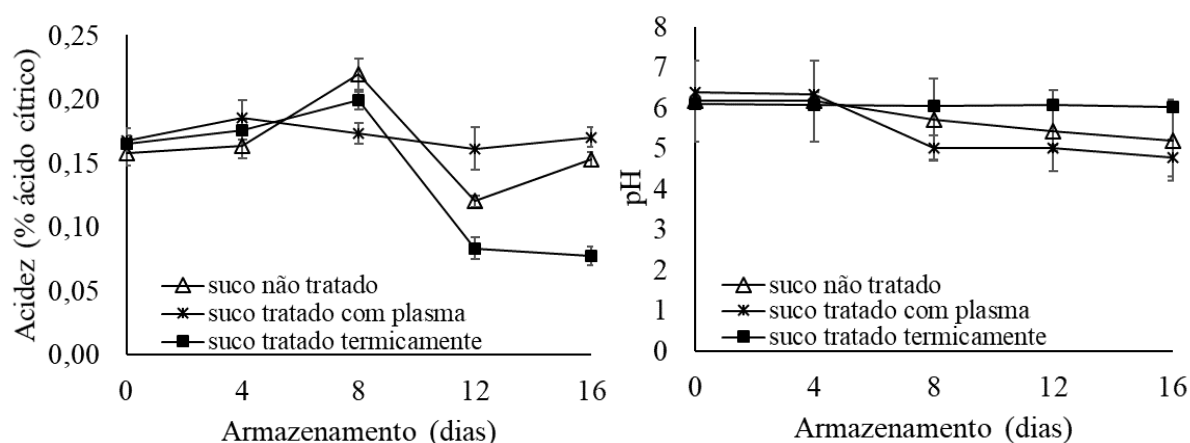
Kovacevic et al. (2016) também observaram alteração na cor de amostras de suco de romã tratados por jato de plasma gerado na presença de gás argônio e potência de 2,5 kV e 25 kHz. Eles observaram que a partir do aumento do tempo de tratamento, do volume da amostra e do fluxo de gás ocorrem alterações significativas na cor do suco.

Resultados distintos foram observados por Melo (2015), quando estudou a influência do plasma em suco de uva. O jato de plasma foi gerado por meio DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio. Depois de tratado durante 1, 2, 4 e 6 minutos, o suco não apresentou diferença significativa do controle quanto às medidas de cor.

4.2.2 Acidez e pH

A acidez que foi analisada no suco de laranja é expressa pelo principal ácido orgânico presente na laranja, o ácido cítrico. Os sucos, após aplicação dos tratamentos, não apresentaram alteração significativa da acidez nem do pH (Figura 8). Somente a partir do 8º dia de armazenamento, os tratamentos interferiram; no último tempo de avaliação, foi observado que o suco tratado pelo plasma apresentou menor pH e, conseqüentemente, maior acidez.

Figura 8 – Valor médio de acidez e pH em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



O suco controle absoluto apresentou, no decorrer do armazenamento, redução do pH, porém o aumento da acidez só foi significativo no 8º dia. O suco tratado pelo plasma também reduziu o pH e aumentou a acidez ao longo do armazenamento. Por sua vez, o suco tratado termicamente manteve o pH e reduziu a acidez no final do armazenamento.

Melo (2015) estudou a influência do jato de plasma gerado por meio DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio. O autor afirmou que, após tratar o suco de uva por plasma durante 1, 2, 4 e 6 minutos, não houve alteração do pH nem da acidez. Também não foi observada alteração destas variáveis no suco de laranja ‘Lima’ estudado neste trabalho após 1 minuto de exposição ao plasma.

Da mesma forma, Shi et al. (2011), quando analisaram a influência do plasma no suco de laranja utilizando um protótipo que gera plasma por meio DBD a uma tensão de 30 kV e frequência de 60 kHz, não observaram alteração no pH nem na acidez dos sucos após aplicação de plasma de 5 a 20 segundos.

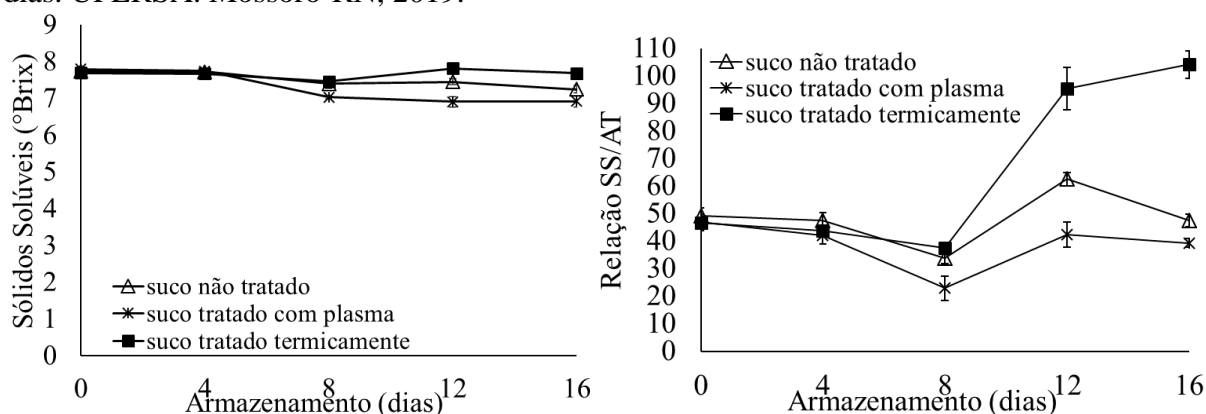
Resultados distintos foram encontrados por Xiang et al. (2018), que observaram redução do pH e aumento da acidez no suco de maçã em todos os tempos de exposição ao plasma, que variaram de 40 a 200 segundos. Os autores utilizaram plasma DBD numa potência de 90 W. O suco de maçã controle apresentou pH 3,96 e acidez de 0,27 g/100mL e o suco tratado durante 40 s apresentou pH 3,72 e acidez de 0,31 g/100mL.

Almeida et al. (2015), após aplicação de plasma em suco de laranja, também observaram redução do pH. O plasma foi gerado por meio DBD a 70 kV e 50 Hz na presença de ar atmosférico. Os autores observaram que o suco controle apresentou pH 4,43 e, após 15 segundos de tratamento, o pH reduziu para 3,90.

4.2.3 Sólidos solúveis e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT)

Os diferentes tratamentos empregados no suco não influenciaram nos SS e nem na relação SS/AT após o processamento e até o 4º dia de armazenamento (Figura 9). Só ocorreu diferença a partir do 8º dia de armazenamento. No final do armazenamento, o suco que apresentou menor quantidade de sólidos solúveis e da relação SS/AT foi o tratado pelo plasma, devido à redução dos sólidos solúveis e ao aumento da acidez.

Figura 9 – Valor médio de sólidos solúveis e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



É possível afirmar que houve redução significativa ao longo do armazenamento nos sólidos solúveis do suco controle absoluto, porém a relação SS/AT não apresentou redução significativa. O suco tratado pelo plasma apresentou redução no final do armazenamento tanto para os sólidos solúveis quanto para a relação SS/AT. Por sua vez, o suco tratado termicamente teve alteração apenas aos oito dias de armazenamento. Nos demais dias de

avaliação, os valores de SS não diferiram, ao contrário do que ocorreu na relação SS/AT, que aumentou no final do armazenamento devido à redução da acidez.

Shi et al. (2011) analisaram a influência do plasma no suco de laranja utilizando um protótipo que gera plasma por meio DBD a uma tensão de 30 kV e frequência de 60 kHz, observando que após 5, 10, 15 e 20 segundos de exposição a uma amostra de 50 μ L ocorreu redução não significativa nos sólidos solúveis.

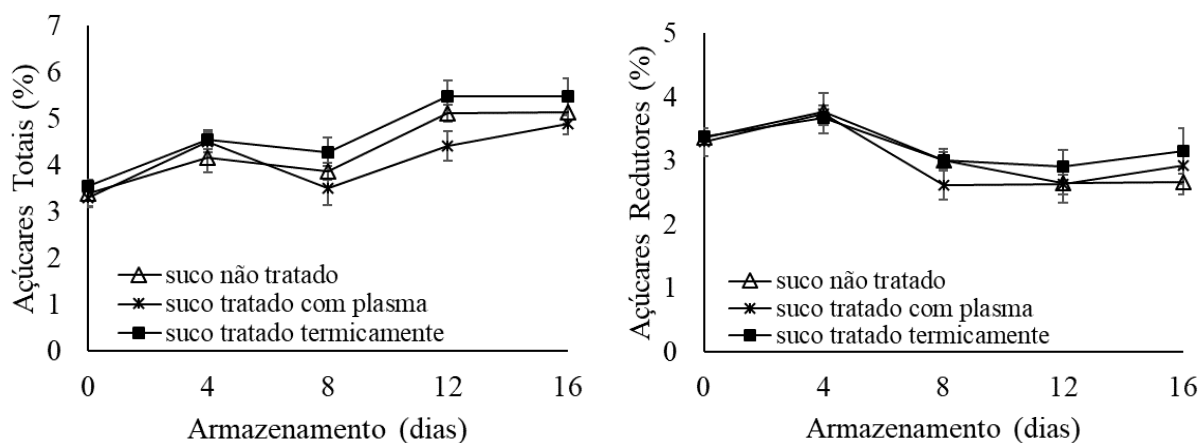
Xiang et al. (2018) não observaram alteração nos sólidos solúveis de suco de maçã tratados por plasma. Os autores utilizaram plasma DBD numa potência de 90 W com duração variando de 40 a 200 segundos sobre o suco de maçã.

Melo (2015), avaliando suco de uva tratado por jato de plasma gerado por meio DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio, também não observou alteração nos sólidos solúveis do suco após tratá-lo durante 1, 2, 4 e 6 minutos, assim como não foi observada alteração nos sólidos solúveis do suco de laranja após 1 minuto de exposição ao plasma neste trabalho.

4.2.4 Açúcares totais e açúcares redutores

Os açúcares totais e os açúcares redutores presentes no suco não sofreram alteração após a aplicação dos tratamentos, somente começaram a apresentar alteração a partir do 8º dia de armazenamento (Figura 10). Contudo, 16 dias após o processamento, o suco tratado pelo plasma apresentou quantidade de açúcares totais e de açúcares redutores semelhante ao suco controle absoluto.

Figura 10 – Valor médio de açúcares totais e açúcares redutores em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



Observou-se que os açúcares totais aumentaram no final do armazenamento tanto no suco controle absoluto quanto nos sucos tratados; os açúcares redutores diminuíram significativamente apenas no suco controle absoluto.

Melo (2015), avaliando suco de uva após tratar por jato de plasma DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio, não observou alteração nos açúcares redutores do suco após 1, 2, 4 e 6 minutos de exposição ao plasma, assim como não foi observado no presente trabalho após 1 minuto de tratamento.

Do mesmo modo, Xiang et al. (2018) não observaram alteração significativa nos açúcares redutores do suco de maçã. Foi utilizado plasma DBD numa potência de 90 W numa duração de 40 a 200 segundos sobre o suco de maçã, o suco controle apresentou 100,7 g/L e o suco tratado durante 200 s apresentou 99,2 g/L de açúcares redutores.

Almeida et al. (2015), estudando a influência do plasma sobre os açúcares redutores em suco de laranja utilizando plasma gerado por meio DBD a 70 kV e 50 Hz na presença de ar atmosférico aplicado diretamente sobre amostras de 20 mL de suco de laranja, observaram após 60 segundos de tratamento redução na quantidade de frutose, porém não houve alteração na glicose.

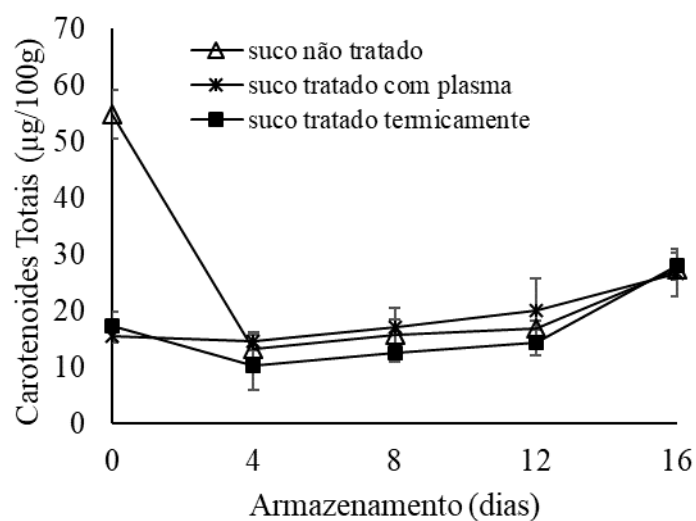
4.3 Compostos bioativos

4.3.1 Carotenoides totais

No dia do processamento, o suco controle absoluto apresentou mais carotenoides do que os demais sucos tratados, e os sucos tratados pelo plasma e pelo tratamento térmico reduziram 71,77% e 68,65% de carotenoides, respectivamente (Figura 11). Aos 12 dias de armazenamento, o suco tratado pelo plasma apresentou maior quantidade de carotenoides, diferindo apenas do tratamento térmico, que apresentou menor quantidade. Aos 4, 8 e 16 dias, não houve diferença para os valores de carotenoides entre os tratamentos.

A quantidade de carotenoides no suco controle absoluto diminuiu até os quatro dias de armazenamento e, posteriormente, apresentou leve aumento, significativo apenas aos 16 dias. No geral, entre o dia do processamento e o último tempo de avaliação houve redução significativa. No suco tratado pelo plasma, houve aumento significativo entre o dia do processamento e o final do armazenamento. Para o suco tratado termicamente, também houve aumento significativo entre o dia do processamento e o final do armazenamento.

Figura 11 – Valor médio de carotenoides totais em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



De maneira geral, os tratamentos plasma e térmico causaram as mesmas perdas de carotenoides, após serem aplicados no suco. Uma das explicações para o ocorrido é a foto-oxidação do carotenoide, motivada principalmente pelo oxigênio e luz ambiente (DUTRA et al., 2012), inevitáveis ao longo do processamento. Outra explicação para a degradação dos carotenoides diz respeito ao fator calor, empregado no tratamento térmico do suco. O calor pode degradar os carotenoides por meio da isomerização (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

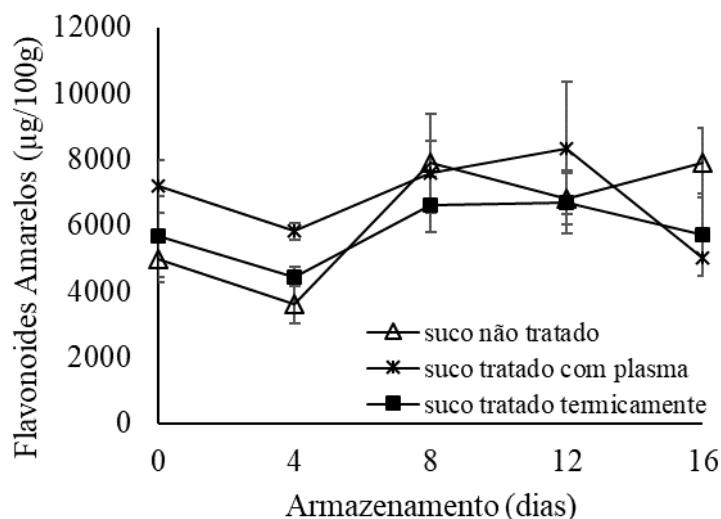
Dutra et al. (2012) aplicaram diferentes temperaturas (88-100 °C) por diferentes tempos (16-44 s) em sucos de tangerina, observando que o teor de carotenoides totais reduziu significativamente em quase todos os tratamentos. Quando foram aplicados 88 °C/30 s, valor próximo do tratamento utilizado nesse trabalho no suco de laranja (87° C/1 min), eles observaram que o teor de carotenoides foi 1420,4 µg/100 g, contrastando com os 1610,0 µg/100 g do suco controle, havendo redução de aproximadamente 11%.

4.3.2 Flavonoides amarelos

Após o processamento do suco tratado por plasma, este apresentou maior quantidade de flavonoides amarelos do que o suco controle absoluto. Essa diferença entre os sucos também foi observada no 4º dia de armazenamento. Aos oito dias, não houve diferença entre os sucos. Com 12 dias de armazenados, o suco tratado pelo plasma apresentou maior quantidade de flavonoides. Já no último tempo de avaliação, o suco controle absoluto contava

com maiores quantidades de flavonoides do que os sucos tratados termicamente e pelo plasma (Figura 12).

Figura 12 – Valor médio de flavonoides amarelos em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



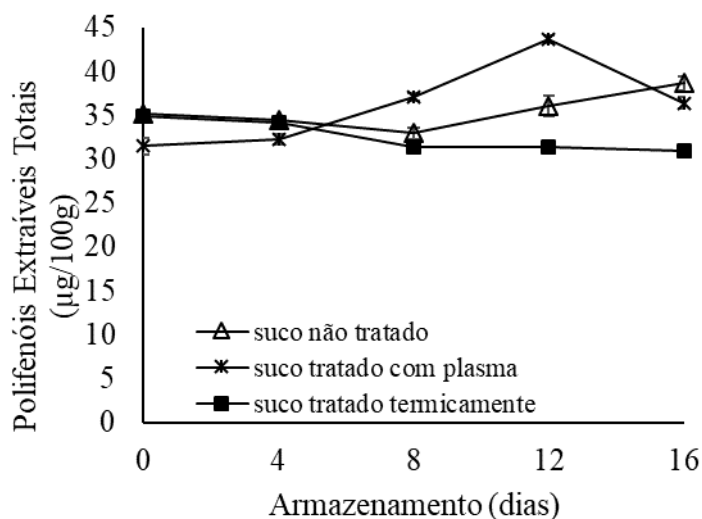
Avaliando o comportamento do suco controle absoluto acerca da quantidade de flavonoides amarelos, é possível observar aumento significativo entre o primeiro e o último tempos de avaliação. O suco tratado pelo plasma apresentou aumento significativo do 4º ao 12º dia, havendo redução no 16º dia de armazenamento. Por sua vez, o tratado termicamente apresentou aumento significativo apenas entre o 4 e o 12º dia de armazenamento. Não houve diferença estatística quando se comparou os valores de flavonoides amarelos do suco entre o primeiro e o último tempo de avaliação.

Kovacevic et al. (2016a), avaliando o comportamento de flavonoides no suco de chokeberry pasteurizados a 80 °C por 2 minutos e tratados por plasma gerado com gás argônio ($0,75 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$) e potência de 2,5 kV e frequência de 25 kHz, observaram que o suco pasteurizado sofreu aumento no conteúdo dos flavonoides e o tratado pelo plasma sofreu redução, porém estas alterações não foram significativas na comparação com o suco controle, diferentemente do observado neste trabalho, onde o suco de laranja tratado com o plasma apresentou aumento significativo dos flavonoides amarelos quando comparado aos teores do suco controle, não tratado.

4.3.3 Polifenóis extraíveis totais

Foi observado no dia do processamento e quatro dias após que o suco controle absoluto e o tratado termicamente apresentaram mais polifenóis do que o tratado pelo plasma (Figura 13). Aos 8 e 12 dias de armazenamento, o suco tratado pelo plasma apresentou aumento dos polifenóis e seus valores foram significativamente superiores aos demais sucos. Já aos 16 dias, o tratado pelo plasma apresentou pequena redução e os valores de polifenóis foram 38,63; 36,30 e 30,97 $\mu\text{g}/100\text{g}$ no suco controle absoluto, tratado pelo plasma e tratado termicamente, respectivamente.

Figura 13 – Valor médio de polifenóis extraíveis totais em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



O suco controle absoluto, no decorrer do armazenamento, apresentou redução no conteúdo de polifenóis. Entretanto, a partir do 8º dia de armazenamento houve aumento desses compostos. No dia do processamento, o suco controle absoluto apresentava 35,24 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e aos 16 dias 38,63 $\mu\text{g}/100\text{g}$. No suco tratado pelo plasma, ocorreu aumento contínuo até o 12º dia de armazenamento, com posterior redução aos 16 dias, e os valores no início e no final do armazenamento foram 31,48 e 36,30 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente. Por sua vez, o suco tratado termicamente teve redução do início ao final do armazenamento, apresentando 34,82 e 30,97 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente.

Almeida et al. (2015), utilizando um protótipo que gera plasma por meio DBD com potência de 70 kV e frequência de 50 Hz com entrada de ar atmosférico, trataram uma alíquota de 20 mL de suco de laranja adicionada de oligossacarídeo, observando redução significativa na quantidade dos compostos fenólicos após 15, 30, 45 e 60 segundos, assim como observaram após 60 segundos de exposição direta ao plasma.

Resultados distintos foram observados por Melo (2015), o qual tratou 2 mL de suco de uva por jato de plasma DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio, observando aumento no teor de polifenóis após 1, 2, 4 e 6 minutos de exposição ao plasma. Apesar disso, aumento significativo em relação ao suco controle (1721,2 mg/L) só foi possível após os 6 minutos (2524,2 mg/L).

Herceg et al. (2016) também observaram aumento de 29,55% e 33,03% nos compostos fenólicos de suco de romã pasteurizados e tratados por plasma, respectivamente. Os tratamentos no suco de romã foram realizados pelo uso de pasteurizador tubular com temperatura de 80 °C por 2 minutos e um equipamento gerador de plasma com uso de gás argônio e potência de 2,5 kW e frequência de 25 kHz.

Diferentemente do observado pelos autores citados anteriormente, Xiang et al. (2018) não observaram alteração nos compostos fenólicos totais de suco de maçã tratados por plasma. Os autores utilizaram plasma DBD numa potência de 90 W, com duração variando de 40 a 200 segundos sobre o suco de maçã.

Como visto, a influência do plasma e do tratamento térmico varia de acordo com o tipo de suco. Segundo Kovacevic et al. (2016a), essa discrepância na estabilidade dos polifenóis dos sucos pode estar relacionada à diferença dos compostos fenólicos entre as frutas.

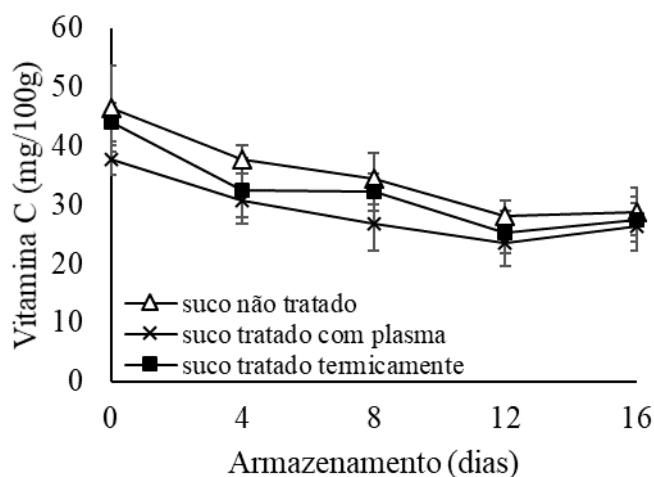
4.3.4 Vitamina C

De acordo com a análise de variância, não houve interação significativa entre os fatores tecnologia de tratamento empregada no suco e armazenamento (Figura 14). Os valores médios de vitamina C para os sucos controle absoluto, tratados por plasma e por calor (térmico) foram 35,09; 28,98 e 32,29 mg/100g, respectivamente. O tratamento por plasma foi significativamente diferente dos demais. Foi constatado que a vitamina C foi degradada tanto com o tratamento térmico quanto com plasma, no qual a redução foi significativa. Durante o armazenamento do suco, houve redução da quantidade de vitamina C no primeiro tempo de avaliação, dia em que o suco foi extraído e tratado, a quantidade média foi de 42,68 mg/100g; aos 16 dias de armazenamento, a quantidade de vitamina C era apenas 27,53 mg/100g, mostrando redução significativa.

A degradação ocorrida no suco tratado pelo plasma pode estar associada à maior exposição ao ar atmosférico, pois o suco na placa aberta formou um espelho de 9 cm de

diâmetro durante o tratamento. A alta concentração de oxigênio no ar atua na degradação da vitamina C pela ativação das enzimas oxidases.

Figura 14 – Valor médio de vitamina C em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



Shi et al. (2011) analisaram a influência do plasma no suco de laranja utilizando um protótipo que gera plasma por meio DBD a uma tensão de 30 kV e frequência de 60 kHz. Os autores trataram 4 mL de suco em uma placa de vidro (2,4 cm x 5 cm) aberta, observando que a quantidade de vitamina C no suco controle foi 43,71 mg/100mL. Após 10s e 20s de exposição ao plasma, a quantidade de vitamina C no suco foi 43,54 e 43,22 mg/100mL, respectivamente, demonstrando redução não significativa, de acordo com o aumento de exposição ao plasma.

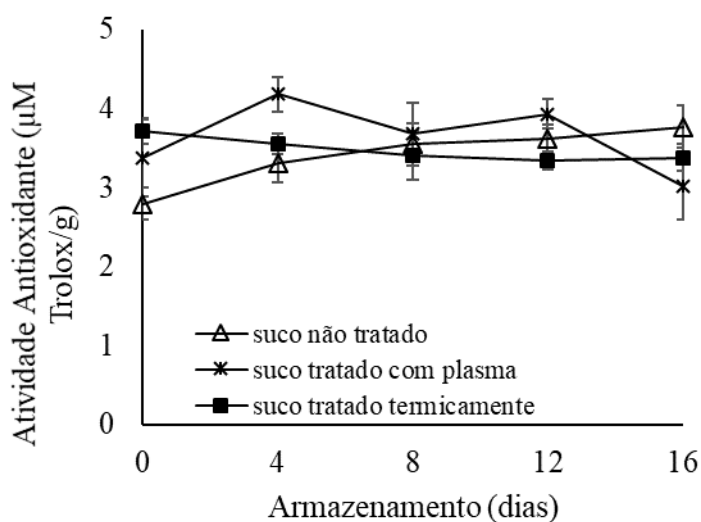
Almeida et al. (2017), por sua vez, observaram aumento significativo na quantidade de vitamina C. Os autores avaliaram suco de laranja adicionado de fruto-oligosacarídeos tratados por plasma gerado em modelo DBD a 70 kV e 50 Hz em ar atmosférico. Uma alíquota de 20 mL de suco foi adicionada em uma placa de Petri coberta com uma película polimérica e tratada durante 1 min com exposição direta e indireta pelo plasma. O suco controle apresentou 35,1 mg/100mL de vitamina C e o suco tratado por exposição direta e indireta apresentou 41,11 e 49,21 mg/100mL.

4.3.5 Atividade antioxidante pela captura do radical ABTS⁺

É possível observar que no dia do processamento o suco controle absoluto apresentou atividade inferior aos demais sucos tratados, com diferença significativa. Os valores

encontrados no suco controle absoluto, suco tratado termicamente e suco tratado pelo plasma foram 2,79, 3,72, 3,37 μM de Trolox/g, respectivamente (Figura 15). Quatro dias após o processamento, apenas o suco tratado pelo plasma apresentou maior atividade, com 4,18 μM de Trolox/g, e aos oito dias todos os sucos apresentavam semelhanças. Aos 12 dias de armazenamento, o suco tratado pelo plasma também apresentou maior atividade antioxidante (3,93 μM de Trolox/g), porém não diferiu do controle absoluto, mas somente daquele tratado termicamente, que apresentou menor valor. Aos 16 dias de armazenamento, o suco tratado pelo plasma reduziu a atividade antioxidante, porém foi semelhante ao tratado termicamente e diferente do suco controle absoluto.

Figura 15 – Valor médio de atividade antioxidante pela captura do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ em suco de laranja ‘Lima’ submetido a diferentes tratamentos e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.



Levando em consideração a atividade antioxidante do suco controle ao longo do armazenamento, foi observado aumento significativo, passando de 2,79 μM de Trolox/g no dia zero para 3,77 μM de Trolox/g no último tempo avaliado. O suco tratado pelo plasma apresentou aumento da atividade antioxidante apenas do dia do processamento até os quatro dias, quando começou a redução, porém as atividades do dia zero e do 16º dia foram semelhantes, 3,37 e 3,01 μM de Trolox/g, respectivamente. O suco tratado termicamente não apresentou alteração considerável na atividade antioxidante ao longo do armazenamento (Figura 15).

A redução da vitamina C (Figura 14), ocasionada pelo tratamento com plasma, não causou prejuízo na atividade antioxidante, pelo contrário: a aplicação do tratamento no suco

de laranja 'Lima' propiciou aumento na atividade antioxidante (Figura 15), provavelmente devido ao aumento dos flavonoides amarelos (Figura 12), pois, segundo Klimczak et al. (2007), os antioxidantes de maior quantidade nos citros são a vitamina C e os flavonoides.

Melo (2015) observou aumento na atividade antioxidante de suco de uva após o tratamento por jato de plasma, comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. O autor tratou o suco durante 1, 2, 4, e 6 minutos por plasma DBD a 9 kV e 10 kHz utilizando gás Hélio. Ele observou aumento da atividade logo após 1 minuto, quando esta passou de 41,26% de DPPH (controle) para 49,95% de DPPH, porém o aumento só foi significativo após seis minutos de tratamento (51,14% de DPPH).

Resultados distintos foram encontrados por Almeida et al. (2015), que observaram redução significativa na atividade antioxidante por $ABTS^+$ quando 20 mL de suco de laranja adicionado de oligossacarídeo foram tratados com plasma por contato direto. O suco controle apresentou atividade de 4,97 μ M de Trolox/g e o suco exposto por 60 segundos apresentou 2,63 μ M de Trolox/g. O equipamento gerador de plasma utilizou potência de 70 kV e frequência de 50 Hz, ar atmosférico e DBD.

5 CONCLUSÃO

A aplicação do plasma e do tratamento térmico reduziu a quantidade da bactéria *Escherichia coli* no suco, com inativação de 16,72 e 100%, respectivamente. O plasma não inativou *Candida albicans* em suco de laranja integral. O tratamento térmico inativou 100% da *C. albicans*.

As características físico-químicas não se alteraram logo após a aplicação do plasma e do tratamento térmico, exceto a cor, que apresentou aumento nos valores de luminosidade e ângulo Hue, não perceptível ao olho humano.

A aplicação do plasma reduziu os teores de vitamina C, carotenoides e polifenóis; os flavonoides amarelos aumentaram. O suco que passou pelo tratamento térmico, logo após o processo, reduziu o teor de carotenoides. Contudo, os tratamentos térmico e com plasma não prejudicaram a atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ADAM, B.; TEIXEIRA, J. J. L.; SANTOS, B. P.; SOUZA, J. K. R.; AMERICANO, M. M. S. Avaliação da qualidade microbiológica de suco de laranja *in natura* em um campus universitário de Cuiabá, MT. **UNOPAR Científica. Ciência biológica e da saúde**, Londrina, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2015.
- AGANOVIC, K.; GRAUWET, T.; SIEMER, C.; TOEPFL, S.; HEINZ, V.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. Headspace fingerprinting and sensory evaluation to discriminate between traditional and alternative pasteurization of watermelon juice. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 242, n. 05, p. 1-17, 2015.
- ALEGRE, G. F. S. **Determinação de compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos frescos e pasteurizados de laranja**: compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos de laranja. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.
- ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin v. 32, n. 01, p. 127–135, 2015.
- ALMEIDA, F. D. L.; GOMES, W. F.; CAVALCANTE, R. S.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high pressure processing of a functional orange juice. **Food Research International**, Campinas, v. 102, n. 1, p. 282–290, 2017.
- AMINI, M; GHORANNEVISS, M. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 73, n. 01, p. 178-184, 2016.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2017, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Cruz, 2017. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/wp-content/uploads/2017/03/PDF-Frusicultura_2017.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2017.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos, entre outras considerações.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17. ed. Washington: AOAC, 2002. 1115 p.
- BADOLATO, G. G. **Tratamento térmico mínimo do suco de laranja natural**: cinética da inativação da pectinesterase. 2000. 157f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BRAND, W. W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Lebensm Wiss Technology**, Oxford, v. 28, n. 01, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000**. Complementa padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da comissão intersetorial de bebidas e dá outras providências. Brasília, 2009.

BRITO, C. S.; ROSSI, D. A. Bolors e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja *in natura* e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 133-40, 2005.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.

CITRUSBR. **Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos**. ISS 2359-1889, n. 9, 2017. Disponível em: <www.citrusbr.com>. Acesso em: 09 ago. 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura mensal de laranja**.

Disponível em:

<[COSTA, I. K. F. **Tratamento *in vitro* do *Colletotrichum brevisporum* com plasma frio atmosférico associado à cera de carnaúba visando aplicação em pós-colheita de frutos**. 2018. 60f. Dissertação \(Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais\) – Universidade Federal Rural do Semi-árido. Mossoró, 2018.](https://www.google.com.br/search?q=produ%C3%A7%C3%A3o+de+laranja+2016&oq=produ%C3%A7%C3%A3o+de+&aqs=chrome.69i59j69i57j0l4.3111j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8#>>. Acesso em: 21 ago. 2017.</p></div><div data-bbox=)

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. C. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 15-19, 2010.

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

DUTRA, A. S.; FURTADO, A. A. L.; PACHECO, S.; NETOS, J. O. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenoides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 03, p. 198-207, 2012.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FAZIO, M. L. S. **Qualidade microbiologia e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. 2006. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP - São José do Rio Preto, 2006.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (org.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 181-207.

HERCEG, Z.; KOVACEVIC, D. B.; KLJUSURIC, J. G.; JAMBRAK, A. R.; ZORIC, Z.; UZELAC, V. D. Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. **Food Chemistry**, Oxford, v. 190, n. 1, p. 665-672, 2016.

HIGBY, W. K. A. Simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 42-49, 1962.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-8, 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3^o ed. São Paulo, 1985, v. 1, 533 p.

KANG, M. H.; HONG, Y. J.; ATTRI, P.; SIM, G. B.; LEE, G. J.; PANNGOM, K.; KWON, G. C.; CHOI, E. H.; UHM, H. S.; PARK, G. Analysis of the antimicrobial effects of nonthermal plasma on fungal spores in ionic solutions. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 72, n. 1, p. 191-199, 2014.

KIM, H. -J.; YONG, H. I.; PARK, S.; KIM, K.; CHOE, C. J. Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. **Food Control**, Guildford, v. 47, n. 1, p. 451-456, 2015.

KLÄMPFL, T. G.; ISBARY, G.; SHIMIZU, T.; LI, Y.; ZIMMERMANN, J. L.; STOLZ, W.; SCHLEGEL, J.; MORFILL, G. E.; SCHMIDT, H. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and microorganisms of clinical interest. **Applied and Environmental Microbiology**, London, v. 78, n. 15, p. 5077-5082, 2012.

KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZLACHTA, M.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

KOGELSCHATZ, U. Twenty years of Hakone symposia: from basic plasma chemistry to billion dollar markets. **Plasma Processes and Polymers**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 678-681, 2007.

KOVACEVIC, D. B.; KLJUSURIC, J. G.; PUTINIK, P.; VUKUSIC, T.; HERCEG, Z.; UZELAC, V. D. Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma. **Food Chemistry**, Oxford, v. 212, n. 1, p. 323-331, 2016a.

KOVACEVIC, D. B.; PUTINIK, P.; UZELAC, V. D.; PEDISIC, S.; JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z. Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. **Food Chemistry**, Oxford, v. 190, n. 1 p. 317–323, 2016b.

LAROUSSE, M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-art. **Plasma Processes and Polymers**, Berlin, v. 2, n. 01, p. 391-400, 2005.

LAROUSSE, M.; LEIPOLD, F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. **Int. J. Mass Spectrom.**, Manchester, v. 233, n. 1–3, p. 81–86, 2004.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 01, p. 1390-1393, 1997.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: McGraw Hill, 2016.

LU, Q.; LIU, D.; SONG, Y.; ZHOU, R.; NIU, J. Inactivation of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* by an atmospheric-pressure cold plasma jet. **Plasma Processes and Polymers**, Berlin, v. 11, n. 01, p. 1028–1036, 2014.

LUCATELLI, A. **Comportamento de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em meios ácidos**. 2009. 22f. Trabalho de conclusão (Bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009.

MAJUMDAR, A.; SINGH, R. K.; PALM, G. J.; HIPPLER, R. Dielectric barrier discharge plasma treatment on *E. coli*: Influence of CH₄/N₂, O₂, N₂/O₂, N₂, and Ar gases. **Journal of Applied Physics**, Melville, v. 106, n. 01, p. 1-5, 2009.

MALFEITO, F. M.; LOUREIRO, V.; SANCHO, T.; GIMENEZ-JURADO, G. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 01, p. 613-624, 2000.

MELO, F. L. **Efeitos do processamento por plasma atmosférico sobre as características de qualidade em suco de uva “Isabel**. 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2015.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 01, p. 426-428, 1959.

MINOLTA CORP. **Precise Color Communication**: Color Control from Feeling to Instrumentation. Osaka: MINOLTA Corp. Ltda., 2007.

MONTENEGRO, J.; RUAN, R.; MA, H.; CHEN, P. Inactivation of *E. coli* O157:H7 using a pulsed nonthermal plasma system. **Food Engineering and Physical Properties**, North Carolina, v. 67, n. 02, p. 146-148, 2002.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da Citricultura 2017**. 1. ed. CitrusBR, 2017.

OLIVEIRA, J. C.; SETTI, P. P.; SIQUEIRA, K.A.G.; SANTOS, A. C.; MIGUEL, M. A. L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 241-245, 2006.

PALIYATH, G.; MURR, D. P.; HANDA, A. K.; LURIE, S. **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers**. Ames: Wiley-Blackwell Press, 2008.

POLYDERA, A.C.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and pressure processed reconstituted orange juice. **Journal of Food Engineering**, London, v. 60, n. 01, p. 21-29, 2003.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Versão 3.5.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 1º set. 2018.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington: ILSI Press, 2001.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica**: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Boletim de inteligência**. 2015.

SHANCHEZ, M. C.; LARRAURI, J. A.; SAURA, C. F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science Food Agriculture**, Chichester, v. 76, n. 01, p. 270-276, 1998.

SHI, X. M.; ZHANG, G. J.; WU, X. L.; MA, Y.; SHAO, X. J. Effect of low-temperature plasma on microorganism inactivation and quality of freshly squeezed orange juice. **IEEE Transactions on Plasma Science**, Chiang Mai, v. 39, n. 7, p. 1591-1597, 2011.

SHI, X. M.; ZHANG, G. J.; YUAN, Y. K.; MA, Y.; XU, G. M.; YANG, Y. Research on the inactivation effect of low-temperature plasma on *Candida albicans*. **IEEE Transactions on Plasma Science**, Chiang Mai, v. 36, n. 2, p. 498–503, 2008.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995.

SOARES, U. J. O.; SOUZA, G. R.; BARBOSA, A. H.; MARTINS, C. H. G.; PIRES, R. H. Detecção e identificação de leveduras em sucos de laranja natural comercializados. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 663-668, 2011.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Análises de vitaminas**: métodos comprovados. Madrid: Paz Montalvo, 1967.

SUCUPIRA, N. R.; XEREZ, A. C. P.; SOUSA, P. H. M. Perdas vitamínicas durante o tratamento térmico de alimentos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 121-128, 2012.

TACO – **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. revisada e ampliada. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRIVELATO, A. A.; VIRGOLIN, L. B.; JANZANTTI, N. S. Avaliação físico-química de sucos de laranja integral. In: Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual Paulista, 28. 2016, Bauru. **Anais...** Disponível em: <http://prope.unesp.br/cic/admin/ver_resumo.php?area=100087&subarea=27124&congresso=38&CPF=43911895852>. Acesso em: 19 jan. 2019.

WAN, J.; COVENTRY, J.; SWIERGON, P.; SANGUANSRI, P.; VERSTEEG, C. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety e pulsed electric field and low-temperature plasma. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 01, p. 414-424, 2009.

XIANG, Q.; LIU, X.; LI, J.; LIU, S.; ZHANG, H.; BAI, Y. Effects of dielectric barrier discharge plasma on the inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* and quality of apple juice. **Food Chemistry**, Oxford, v. 254, n. 01, p. 201–207, 2018.

XIONG, Z.; LU, X.; FENG, A.; PAN, Y.; OSTRIKOV, K. Highly effective fungal inactivation in He + O₂ atmospheric-pressure nonequilibrium plasmas. **Physics of Plasmas**, Maryland, v. 17, n. 01, p. 1-6, 2010.

YAMADA, J. A.; GONZALES, L. M.; ALMEIDA, A. A.; LINCOLN-DE-CARVALHO, C. R. Análise microbiológica de suco de laranja *in natura* comercializados em quiosques das praias de santos (SP). In: Congresso Nacional de Iniciação Científica da Universidade Cidade de São Paulo, 14, 2014. **Anais...** Ipiranga. Disponível em: <<http://conic-semesp.org.br/anais/files/2014/trabalho-1000018433.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

YE, S. Y.; SONG, X. L.; LIANG, J. L.; ZHENG, S. H.; LIN, Y. Disinfection of airborne spores of *Penicillium expansum* in cold storage using continuous direct current corona discharge. **Biosystems Engineering**, Hexham v. 113, n. 01, p. 112–119, 2012.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 01, p. 508-514, 1954.

YU, H.; XIU, Z. L.; REN, C. S.; ZHANG, J. L.; WANG, D. Z.; WANG, Y. N.; MA, T. C. Inactivation of yeast by dielectric barrier discharge (DBD) plasma in helium at atmospheric pressure. **IEEE Transactions on Plasma Science**, Chiang Mai, v. 33, n. 4, p. 1405–1409, 2005.

APÊNDICE

Tabela 1A – Medidas de cor em luminosidade (L), croma (C) e ângulo Hue (H) em suco de laranja ‘Lima’ tratado por plasma ou não (controles) armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Tratamento	Armazenamento (dias)	L	C	H
Controle	0	60,87 cB	7,00 aA	101,97 bC
	4	63,09 bcA	7,41 aA	101,82 bB
	8	66,82 aA	7,25 aA	104,31 aB
	12	66,38 abA	7,80 aA	105,46 aB
	16	67,40 aA	4,50 bA	105,50 aB
Térmico	0	65,82 abA	7,58 aA	105,69 aA
	4	64,12 bA	7,85 aA	104,38 bcA
	8	66,97 abA	7,91 aA	105,55 abA
	12	67,66 aA	7,85 aA	105,32 abB
	16	67,03 abA	3,88 bA	103,40 cC
Plasma	0	68,35 aA	6,81 aA	103,94 bB
	4	64,55 bA	6,94 aA	102,32 cB
	8	67,61 abA	5,38 bcB	106,05 aA
	12	69,31 aA	6,22 abB	106,92 aA
	16	69,25 aA	4,51 cA	107,14 aA
Média		66,35	6,59	104,65
CV1 (%)		3,25	11,46	0,64
CV2 (%)		2,88	9,96	0,69
Tratamento		11,29**	13,16***	35,53***
Armazenamento		13,06***	58,81***	45,81***
Trat x Arm		2,81*	4,55***	18,09***

Arm.: armazenamento. Trat.: tratamento. Letra minúscula compara armazenamento e letra maiúscula compara tratamento. CV1: coeficiente de variação do fator da parcela tratamento. CV2: coeficiente de variação do fator da subparcela armazenamento. ns: não significativo; *, **, *** significativo a 5%, 1% e 0,1% de probabilidade, respectivamente, de acordo com o teste de F.

Tabela 2A – Valores médios de pH, sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), relação SS/AT, açúcar total (AÇT) e açúcar redutor (AÇR) de suco de laranja ‘Lima’ tratado por plasma ou não (controles) e armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Tratamento	Arm.(dias)	pH	SS (°Brix)	AT (% ác. Cítrico)	SS/AT	AÇT (%)	AÇR (%)
Controle	0	6,17 aAB	7,74 aA	0,158 bA	49,15 bA	3,38 cA	3,36 bA
	4	6,16 aAB	7,73 aA	0,163 bB	47,50 bA	4,15 bA	3,77 aA
	8	5,72 bB	7,41 bA	0,220 aA	33,88 cA	3,87 bAB	3,01 bcA
	12	5,42 cB	7,46 bB	0,120 cB	62,49 aB	5,11 aA	2,64 cA
	16	5,19 cB	7,25 cB	0,153 bB	47,54 bB	5,14aAB	2,67 cB
Térmico	0	6,10 aB	7,70 aA	0,165 bA	46,73 cA	3,55 cA	3,37 abA
	4	6,07 aB	7,68 aA	0,176 bAB	43,74 cdA	4,53 bA	3,66 aA
	8	6,04 aA	7,47 bA	0,199 aB	37,66 dA	4,28 bA	2,99 bcA
	12	6,07 aA	7,83 aA	0,083 cC	95,52 bA	5,46 aA	2,91 cA
	16	6,01 aA	7,69 aA	0,077 cC	104,13 aA	5,47 aA	3,15 bcA
Plasma	0	6,39 aA	7,80 aA	0,168 bA	46,83 aA	3,30 cA	3,29 bA
	4	6,32 aA	7,75 aA	0,186 aA	42,00 abA	4,49 abA	3,74 bcA
	8	5,01 bC	7,04 bB	0,173 abC	22,01 cB	3,49 cB	2,61 cB
	12	5,01 bC	6,91 bC	0,161 bA	42,42 abC	4,41 bB	2,62 cA
	16	4,76 bC	6,93 bC	0,170 abA	39,39 bC	4,89 aB	2,92bcAB
Média		5,76	7,49	0,158	50,73	4,37	3,11
CV1 (%)		2,89	1,32	7,10	7,57	7,03	5,35
CV2 (%)		2,53	1,10	5,69	6,83	6,03	6,83
Trat.		71,33***	96,62***	52,65***	313,67***	19,76***	7,88**
Arm.		120,4***	111,31***	175,71***	263,66***	118,25***	55,95***
Trat.xArm.		36,19***	41,75***	51,44***	114,49***	3,88**	2,65*

Arm.: armazenamento. Trat.: tratamento. Letra minúscula compara armazenamento e letra maiúscula compara tratamento. CV1: coeficiente de variação do fator da parcela tratamento. CV2: coeficiente de variação do fator da subparcela armazenamento. ns: não significativo; *, **, *** significativo a 5%, 1% e 0,1% de probabilidade, respectivamente, de acordo com o teste de F.

Tabela 3A – Valores médios de carotenoides totais (CT), flavonoides amarelos (FA) e polifenóis extraíveis totais (PET) de suco de laranja ‘Lima’ tratado por plasma ou não (controles), armazenado a 2 ± 1 °C por 16 dias. UFERSA. Mossoró-RN, 2019.

Tratamento	Armazenamento (dias)	CT ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	FA ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	PET ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Controle	0	54,80 aA	4970,05 bcB	35,24 bcA
	4	13,20 cA	3602,15 cB	34,40 cA
	8	15,66 cA	7880,67 aA	32,95 dB
	12	16,79 cAB	6793,75 abB	36,10 bB
	16	27,34 bA	7906,45 aA	38,63 aA
Térmico	0	17,18 bB	5666,44 abAB	34,82 aA
	4	10,26 cA	4434,80 bAB	34,19 aA
	8	12,43 bcA	6626,73 aA	31,40 bC
	12	14,37 bcB	6703,31 aB	31,41 bC
	16	27,87 aA	5717,54 abB	30,97 bC
Plasma	0	15,47 bB	7177,98 abA	31,49 cB
	4	14,58 bA	5815,52 bcA	32,28 cB
	8	16,96 bA	7585,55 abA	37,06 bA
	12	20,00 bA	8343,55 aA	43,64 aA
	16	26,72 aA	5029,70 cB	36,30 bB
Média		20,24	6283,61	34,73
CV1 (%)		12,10	16,11	1,67
CV2 (%)		15,62	16,24	1,86
Tratamento		102,26 ***	5,68 *	272,45***
Armazenamento		80,51 ***	18,23 ***	77,26***
Trat. x Arm.		47,94 ***	5,88 ***	148,43***

Arm.: armazenamento. Trat.: tratamento. Letra minúscula compara armazenamento e letra maiúscula compara tratamento. CV1: coeficiente de variação do fator da parcela tratamento. CV2: coeficiente de variação do fator da subparcela armazenamento. ns: não significativo; *, **, *** significativo a 5%, 1% e 0,1% de probabilidade, respectivamente, de acordo com o teste de F.