



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



# **Aumento da vida de prateleira de leite de castanha de caju através de tratamento térmico convencional**

*Autor: Lucas Paese*

*Orientador: Daniele Misturini Rossi*

*Co-orientador: Sueli Teresinha Van Der Sand*

*Colaborador: Lígia Damasceno Ferreira Marczack*

Porto Alegre, julho de 16

## Sumário

|   |      |
|---|------|
| Sumário   | ii   |
| Agradecimentos  | iv   |
| Resumo  | v    |
| Lista de Figuras  | vi   |
| Lista de Tabelas  | vii  |
| Lista de Símbolos   | viii |
| Lista de Abreviaturas e Siglas                                | ix   |
| 1 Introdução  | 1    |
| 2 Revisão Bibliográfica                                       | 3    |
| 2.1 Leites vegetais   | 3    |
| 2.1.1 Preparo de leites vegetais                              | 3    |
| 2.1.2 Propriedades de leites vegetais                         | 4    |
| 2.2 Tratamentos térmicos                                      | 5    |
| 2.2.1 Mecanismo de controle de população microbiana por calor | 7    |
| 2.2.2 Pasteurização   | 7    |
| 2.2.3 Outros tipos de tratamentos térmicos                    | 10   |
| 2.3 Propriedades físico-químicas dos alimentos                | 11   |
| 2.3.1 Umidade   | 11   |
| 2.3.2 Cinzas  | 12   |
| 2.3.3 Lipídeos  | 12   |
| 2.3.4 Proteínas   | 12   |
| 2.3.5 Carboidratos  | 13   |
| 2.4 Microbiologia em leites vegetais                          | 13   |
| 2.4.1 Microrganismos indicadores                              | 14   |
| 2.4.2 Bactérias heterotróficas                                | 14   |
| 2.4.3 Staphylococcus aureus                                   | 15   |
| 3 Materiais e Métodos   | 16   |
| 3.1 Obtenção do leite de castanha de caju                     | 16   |
| 3.2 Avaliações piloto   | 17   |
| 3.3 Tratamento térmico  | 18   |
| 3.4 Análises microbiológicas                                  | 20   |
| 3.4.1 Contagem padrão de bactérias heterotróficas             | 20   |
| 3.4.2 Coliformes totais                                       | 20   |
| 3.4.3 Escherichia coli  | 22   |
| 3.5 Análises Físico-Químicas                                  | 23   |
| 3.5.1 Determinação de umidade                                 | 23   |
| 3.5.2 Determinação de cinzas                                  | 23   |
| 3.5.3 Determinação de lipídeos                                | 24   |
| 3.5.4 Determinação de proteínas                               | 25   |
| 4 Resultados e discussão                                      | 26   |

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.1   | Tratamentos térmicos                          | 26 |
| 4.2   | Análises microbiológicas                      | 27 |
| 4.2.1 | Avaliações piloto                             | 27 |
| 4.2.2 | Análise do leite pasteurizado                 | 30 |
| 4.3   | Análise Físico-Química                        | 32 |
| 5     | Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros | 33 |
| 6     | Referências                                   | 34 |
|       | Anexo A                                       | 37 |

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Vera e Valdir. Este trabalho não poderia ser realizado sem sua ajuda, por me dar todas as condições necessárias para chegar até aqui. Sou muito grato por todo apoio emocional e financeiro que me deram para construir toda base para a vida que seguirá de hoje em diante.

Agradeço às forças que regem o universo por ter nascido em boas condições e reconheço que tenho sorte por isso, pois sei que muitos jovens não têm recursos mínimos para cursar uma faculdade, seja por falta de oportunidade de ingressar nela ou então por não ter condições financeiras de se manter nela.

Agradeço também à Cíntia, por estar sempre ao meu lado, pela incondicional parceria, cumplicidade e carinho, sem os quais eu não conseguiria ser tão feliz como sou ao seu lado.

Agradeço às minhas orientadoras, Daniele e Sueli, pelos ensinamentos, dedicação e motivação que tornaram possível a realização desse trabalho e também à Ligia, que me deu suporte paralelamente.

Agradeço à técnica de laboratório do ICBS, Sayonara, por ter me ajudado com muita dedicação e também me ensinado muito.

Agradeço aos meus grandes amigos João, Adriano, Letícia e Cibele, pelas tardes passadas estudando e me ajudando a levar o curso adiante e também aos meus colegas companheiros desde o primeiro semestre de 2010, pelas risadas que ajudaram a manter longe o stress.

---

## Resumo

---

A procura por alimentos semelhantes ao leite de origem animal é crescente. Observa-se que a intolerância à lactose e a alergia ao leite estão presentes em grande parte da população, que procura uma alternativa para contornar esse problema de saúde. A população engajada com a sustentabilidade também se preocupa com a indústria do leite de origem animal, por ser bastante prejudicial ao meio-ambiente. Somam-se a isso, novos estudos que mostram uma possível relação entre o consumo de produtos lácteos e a presença de osteoporose e desenvolvimento de câncer. Leites vegetais, denominação que se dá ao extrato obtido de grãos, são uma alternativa para o leite de origem animal. Por ser uma indústria muito nova, poucos estudos foram feitos e não se sabe muito sobre métodos de conservação desse produto. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a aplicação de calor por um método convencional na indústria – a pasteurização – e avaliar a sua eficiência no aumento de vida de prateleira de um leite de castanha-de-caju através de análises microbiológicas. Alterações na qualidade do leite vegetal foram avaliadas através de análises físico-químicas. O binômio tempo – temperatura utilizado foi de 63,5°C por 30 minutos, conhecido como pasteurização lenta. Do ponto de vista microbiológico, o tratamento se mostrou eficiente, pois se observou grande diminuição de bactérias através da análise de contagem de heterotróficos e também se verificou ausência de *Staphylococcus aureus* e coliformes totais/fecais no leite vegetal tratado. Do ponto de vista físico-químico, observou-se que o tratamento pouco alterou as características presentes no leite cru, mostrando que a pasteurização é um tratamento viável para o aumento da vida de prateleira do leite vegetal de castanha-de-caju.

---

**Palavras chave:** Leite vegetal, vida de prateleira, pasteurização, lactose, análises microbiológicas, análises físico-químicas, castanha-de-caju.

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1: Exemplo de curva de taxa de letalidade.....   | 8  |
| Figura 2.2: Gráfico TDT para leite, derivados e proteínas.....  | 9  |
| Figura 3.1: Aspecto do leite de castanha-de-caju após cominuição das castanhas .....  | 17 |
| Figura 3.2: Esquema representativo dos banhos-água utilizados.....  | 18 |
| Figura 3.3: Célula de aquecimento.....  | 19 |
| Figura 3.4: Banhos-água e célula de aquecimento. ....   | 19 |
| Figura 3.5: Método de semeadura em superfície para contagem de heterotróficos.....  | 20 |
| Figura 3.6: Fluxograma para análise de coliformes totais.....   | 22 |
| Figura 3.7: Esquema representativo da análise de <i>E. coli</i> em meio Eosina Azul de Metileno (EMB).....                              | 22 |
| Figura 3.8: Cápsulas com a amostra antes da etapa de aquecimento em estufa. ....  | 23 |
| Figura 3.9: Cadinhos de porcelana contendo a amostra antes do aquecimento na mufla.   | 24 |
| Figura 3.10: Decantação e filtração do sistema clorofórmio + metanol + amostra e coleta do clorofórmio com lipídeos. ....               | 24 |
| Figura 4.1: Um dos perfis de aquecimento da pasteurização do leite de castanha de caju realizados em triplicata no dia 09/05/2016. .... | 26 |
| Figura 4.2: Um dos perfis de aquecimento da pasteurização do leite de castanha de caju realizados em triplicata no dia 23/05/2016. .... | 26 |
| Figura 4.3: Contagem de heterotróficos nas amostras de controle. ....   | 28 |
| Figura 4.4: Crescimento de heterotróficos nas amostras C, D, E e F após 48h.....  | 28 |
| Figura 4.5: Análise presuntiva de coliformes totais e formação de precipitado nos tubos de diluição 1:1. ....                           | 29 |
| Figura 4.6: Ausência de <i>Staphylococcus</i> na amostra controle. ....   | 29 |

**Lista de Tabelas**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 2.1: Tabela de nutrientes presentes em 100 g de leites de origem animal e vegetal .....                      | 4  |
| Tabela 2.2: Quantidade de gorduras em 100 g de leite de vaca e leites vegetais .....                                | 5  |
| Tabela 2.3: Produção em milhões de litros de leite de vaca por tipo de tratamento térmico no Brasil. ....           | 6  |
| Tabela 2.4: Perda (%) de nutrientes pelo processamento do leite após a esterilização UHT e após pasteurização ..... | 11 |
| Tabela 4.1: Resultados da primeira análise de sondagem. ....  | 27 |
| Tabela 4.2: Contagem de colônias em meio PCA da amostra de leite cru feitas em duplicata. ....                      | 30 |
| Tabela 4.3: Resultados das análises microbiológicas da pasteurização realizada no dia 09/06. ....                   | 31 |
| Tabela 4.4: Resultados das análises microbiológicas da pasteurização realizada no dia 23/06. ....                   | 31 |
| Tabela 4.5: Comparação da composição centesimal da amostra de leite cru e do leite pasteurizado. ....               | 32 |

## **Lista de Símbolos**

°C – graus Celsius

g – grama

mg – miligrama

l – litro

ml – mililitro

m – metro

m<sup>3</sup> – metro cúbico

h – hora

% - percentual

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

EMB – Eosina Azul de Metileno

HDL – *High Density Lipoprotein*

HTST – *High Temperature Short Time*

ICMSF – *International Commission of Microbiological Specifications for Foods*

LDL – *Low Density Lipoprotein*

ND – Não Determinado

NMP – Número Mais Provável

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCA – *Plate Count Agar*

LTLT – *Low Temperatura Long Time*

TDT – Tempo de destruição térmica

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UHT – Ultra High Temperature

USDA – *United States Department of Agriculture*



## 1 Introdução

A revolução industrial nos trouxe grandes benefícios nas mais diversas áreas. Com a utilização de máquinas, tornou-se possível produzir com grande eficiência produtos de melhor qualidade com um custo menor. Na indústria alimentícia, a substituição do trabalho manual e da tração animal possibilitou grande aumento da produção, gerando um grande crescimento populacional e, como consequência disso, o ser humano pôde focar-se em outras áreas da tecnologia, resultando num mundo onde o desenvolvimento tecnológico cresce em nível exponencial.

Entretanto, pouca atenção foi dada à sustentabilidade desse crescimento, de maneira que a utilização dos nossos recursos naturais foi feita com irresponsabilidade, prejudicando nós mesmos e muitos outros seres vivos com quem compartilhamos nosso planeta. Hoje se tem consciência da importância de um desenvolvimento sustentável e a tendência mundial é a busca por alternativas frente a processos de produção tradicionais.

A indústria dos laticínios é um exemplo disso. Surgida há milênios, tinha o objetivo de dar uma destinação ao leite disponível nas fêmeas dos rebanhos após estarem prenhas. Esse costume foi mantido e hoje é uma indústria chave no ramo alimentício (Henriksen, 2009). Porém, existem dois motivos pelos quais é importante a busca por alternativas à indústria dos laticínios:

- **Sustentabilidade:** segundo dados da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP, a produção de leite e derivados consome grande quantidade de água. Para a produção de um litro de leite são necessários aproximadamente 700 litros de água; para um quilo de queijo, 5.000 litros de água e para um quilo de manteiga, 18.000 litros de água são consumidos. Para comparação, a produção de um quilo de batatas consome aproximadamente 100 litros de água.

- **Saúde:** a presença de células somáticas no leite devido à inflamação no tecido mamário das vacas (mastite) é muito comum. É permitido por lei que haja até 600 mil células somáticas por mL de leite, isso sem levar em consideração os casos de indústrias clandestinas, onde nenhum padrão de higiene é respeitado (Dürr, 2005). Além disso, novos estudos mostram que não existe necessidade do consumo de laticínios para o combate da osteoporose – o que se observa é um efeito contrário, de malefício aos ossos (Feskanich *et al.*, 1997; Bolland *et al.*, 2005) e isso se estende a outros problemas de saúde, como por exemplo, a ligação indireta com o câncer de próstata (Ludwig e Willet, 2013). Finalmente, pode-se citar a grande quantidade de indivíduos que apresentam

intolerância à lactose – dados da *Food Intolerance Network* indicam que, no Brasil, aproximadamente 50% da população apresenta algum nível de intolerância, fato que é comprovado pela ausência da enzima lactase em adultos, que é produzida apenas na infância para degradar a lactose vinda do leite materno (excetuando os casos de crianças que já nascem com deficiência na produção da enzima).

Uma alternativa à indústria dos laticínios é a produção de leites a partir de matéria-prima vegetal. Um bom exemplo disso é o leite de soja, que já é comercializado em grande escala desde os anos 80. Além da soja, é possível também a obtenção do leite a partir de outros grãos e oleaginosas bastante nutritivas (como castanhas, amêndoas, arroz, aveia, coco, etc) (Wong, 2013).

A motivação para este trabalho não é apenas a busca por um sistema mais sustentável de produção de leite, mas também a inserção do estudo no mercado. O nordeste brasileiro possui grande potencial como fornecedor de matéria-prima e, além disso, poucos estudos foram realizados nesse segmento.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral testar o tratamento térmico de pasteurização lenta em leite vegetal obtido a partir da castanha-de-caju, a fim de aumentar a vida de prateleira do produto. Os resultados foram avaliados a partir de análises microbiológicas, as quais foram realizadas no leite submetido ao tratamento térmico e comparadas com o controle (leite cru) e também a partir da análise físico-química dos melhores resultados.

Os objetivos específicos foram:

- realizar tratamento térmico de pasteurização lenta;
- verificar a eficiência dos métodos através de análises microbiológicas:
  - contagem bacteriana total;
  - presença de *Staphylococcus aureus*;
  - coliformes totais e termotolerantes.
- verificar possíveis alterações nos constituintes do leite devido ao uso dos tratamentos através de análise físico-química.

## 2 Revisão Bibliográfica

Uma boa característica de qualquer produto alimentício é que o mesmo possua uma longa vida de prateleira, período no qual o produto é teoricamente consumível sem perigo ao consumidor (Gyeszly, 1991). Para obter essa característica, existem dois requisitos básicos que devem ser seguidos:

- Condições adequadas de armazenamento – aplicação de um sistema de refrigeração adequado para o produto, quando necessário, assim como o controle da umidade do ambiente. Além disso, é recomendável boas condições de transporte, em embalagens adequadas que evitem rompimento e possível contato com o ambiente externo. Calor ou frio extremo, passíveis de degradar o alimento, devem ser evitados.

- Controle microbiológico – deve ser feito através de um tratamento, logo antes ou após o alimento ser embalado, com o objetivo de eliminar, ao máximo, microrganismos que possam degradar o produto (Azanha e Faria, 2005).

Os tratamentos para controle microbiológico mais empregados na indústria alimentícia são os térmicos e os químicos. No tratamento térmico, elevadas temperaturas por um período mínimo de tempo são utilizadas para eliminar ou inibir microrganismos presentes no meio. No tratamento químico, são utilizados aditivos capazes de inibir microrganismos. Ambos os tratamentos devem garantir as características do produto, mantendo-o consumível (Vegara *et al*, 2013).

### 2.1 Leites vegetais

A denominação de “leites” vegetais se dá à bebida própria para consumo, obtida de matéria-prima vegetal, cujas características se assemelham muito ao leite de origem animal, tanto nas características organolépticas (pela cor e o sabor) quanto nas características físico-químicas (quantidade de gordura e açúcares) (Enig, 1996). Os leites vegetais mais comuns no mercado são o leite de soja e o leite de coco, entretanto, muitos outros tipos de matéria-prima podem ser utilizados, como amêndoas, castanhas, arroz, aveia, entre outros (Wong, 2013).

#### 2.1.1 Preparo de leites vegetais

O preparo de leites vegetais varia conforme a matéria-prima a ser utilizada. Algumas matérias-primas requerem poucas operações unitárias para o seu processamento, como é o caso da castanha de caju, que requer apenas a hidratação da castanha, seguido pela cominuição da mesma com água. Outras matérias-primas, como o

coco, necessitam a trituração da polpa com água, seguido da prensagem desse extrato em um meio filtrante, etapa na qual se separa a parte líquida, ou o “leite” de coco, da parte sólida, com a qual se pode fazer farinhas ou incorporar em outros alimentos (Brough, 1992). O leite de soja, por sua vez, requer hidratação dos grãos, cozimento, cominuição com água, filtração e tratamento térmico (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2005).

### 2.1.2 Propriedades de leites vegetais

Uma comparação dos nutrientes presentes no leite vegetal com os do leite de origem animal pode ser visualizada na Tabela 2.1 abaixo:

**Tabela 2.1:** Tabela de nutrientes presentes em 100 g de leites de origem animal e vegetal

|                 | Unidade | Leite de vaca<br>(1% de gordura) | Leite de soja | Leite de coco | Leite de castanha<br>de caju* |
|-----------------|---------|----------------------------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Calorias        | kcal    | 42                               | 54            | 230           | 53,3                          |
| Água            | g       | 89,92                            | 88,85         | 67,62         | 89,85                         |
| Proteínas       | g       | 3,37                             | 3,27          | 2,29          | 1,82                          |
| Lipídeos totais | g       | 0,97                             | 1,75          | 23,84         | 4,38                          |
| Fibras totais   | g       | 0                                | 0,6           | 2,2           | 0,33                          |
| Açúcares totais | g       | 5,2                              | 3,99          | 3,34          | 0,59                          |
| Carboidratos    | g       | 4,99                             | 6,28          | 5,54          | 3,02                          |

\*Valores estimados usando como cálculo os nutrientes presentes na castanha de caju crua numa concentração de 10% em água

Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016).

Entre os nutrientes acima citados, pode-se dar mais importância às gorduras, que afetam diretamente na saúde do consumidor. Elas dividem-se entre gorduras saturadas e insaturadas. As gorduras saturadas são as responsáveis pelo aumento do colesterol LDL e, conseqüentemente, aumento do risco de doenças cardiovasculares. Alimentos de origem animal, óleo de coco, óleo de palma e manteiga de cacau são ricos em gorduras saturadas.

As gorduras insaturadas, por sua vez, auxiliam na redução do colesterol LDL e aumentam o colesterol HDL (benéfico para a saúde). Elas são encontradas em altas concentrações em nozes, abacate, olivas, entre outros (*American Heart Association*, 2014). Pode-se observar na Tabela 2.2, o maior teor de gorduras insaturadas em leites vegetais em relação ao leite de vaca. Entretanto, o leite de coco apresenta um grande teor de gorduras saturadas e por isso deve ser consumido moderadamente.

**Tabela 2.2:** Quantidade de gorduras em 100 g de leite de vaca e leites vegetais

|                          | Unidade | Leite de vaca<br>(1% de gordura) | Leite de soja | Leite de coco | Leite de castanha<br>de caju* |
|--------------------------|---------|----------------------------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Gorduras saturadas       | g       | 0,604                            | 0,205         | 21,14         | 0,778                         |
| Gorduras monoinsaturadas | g       | 0,28                             | 0,401         | 1,014         | 2,38                          |
| Gorduras poliinsaturadas | g       | 0,036                            | 0,961         | 0,261         | 0,784                         |

\*Valores estimados usando como cálculo os nutrientes presentes na castanha de caju crua numa concentração de 10% em água

Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016).

## 2.2 Tratamentos térmicos

Tecnologias térmicas têm sido a base da preservação e produção de alimentos por muitos anos. A temperatura é conhecida por ser um dos principais mecanismos de preservação que podem ser aplicados na obtenção de produtos comercialmente estéreis, ou seja, livre de patógenos e microrganismos degradantes que possam crescer durante a vida de prateleira desse produto. Embora a segurança alimentar seja a primeira preocupação da indústria alimentícia, pouco valor é dado a produtos de baixa qualidade, no sentido de que o tratamento térmico tem como desafio manter as propriedades do produto fresco. Para isso, uma das soluções encontrada é a utilização de tempos curtos de aquecimento, seguido de um resfriamento rápido (Richardson, 2001).

Os processos térmicos variam consideravelmente de acordo com a severidade do calor aplicado, indo desde a pasteurização (em temperaturas mais brandas) até a esterilização *in-container* (temperaturas mais elevadas). Para o caso do leite de origem animal, os processos utilizados variam muito de acordo com as práticas mais adotadas em cada país. Por exemplo, no Reino Unido, de todo leite vendido, 87% corresponde ao leite pasteurizado. Em contrapartida, na França e Alemanha, na maior parte da produção de leite é feita esterilização UHT (*Ultra High Temperature*) (Lewis e Heppel, 2000). No Brasil, a pasteurização já foi muito popular nos anos 90, mas vem perdendo espaço para o tratamento UHT devido à forte industrialização do país a partir desse período, como mostra a Tabela 2.3.

**Tabela 2.3:** Produção em milhões de litros de leite de vaca por tipo de tratamento térmico no Brasil.

| Ano  | Pasteurizado | UHT   | Total |
|------|--------------|-------|-------|
| 1990 | 4.054        | 187   | 4.241 |
| 1991 | 3.747        | 204   | 3.951 |
| 1992 | 3.338        | 355   | 3.693 |
| 1993 | 2.706        | 456   | 3.162 |
| 1994 | 2.885        | 730   | 3.615 |
| 1995 | 3.150        | 1.050 | 4.200 |
| 1996 | 2.853        | 1.700 | 4.553 |
| 1997 | 2.270        | 2.450 | 4.720 |
| 1998 | 1.980        | 3.100 | 5.080 |
| 1999 | 1.700        | 3.425 | 5.125 |
| 2000 | 1.630        | 3.600 | 5.230 |
| 2001 | 1.440        | 3.950 | 5.390 |
| 2002 | 1.480        | 4.220 | 5.700 |
| 2003 | 1.540        | 4.227 | 5.767 |
| 2004 | 1.590        | 4.403 | 5.993 |
| 2005 | 1.550        | 1.802 | 3.352 |
| 2006 | 1.610        | 5.050 | 6.660 |
| 2007 | 1.710        | 5.033 | 6.743 |
| 2008 | 1.795        | 5.308 | 7.103 |
| 2009 | 1.790        | 5.262 | 7.052 |
| 2010 | 1.690        | 5.455 | 7.145 |
| 2011 | 1.625        | 5.818 | 7.443 |

ADAPTADO DE: MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2011.

No que se refere a leites vegetais, existem poucos dados sobre qual o tratamento térmico é mais empregado. No caso do leite de soja, um tratamento térmico comum empregado em agroindústrias de pequeno porte é a pasteurização de 95 a 98°C por 10 minutos, seguido de resfriamento brusco (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2005). Algumas tecnologias emergentes têm se mostrado muito eficientes em escala laboratorial e que poderiam ser implementadas em escala industrial, como é o caso do tratamento em alta temperatura com aplicação de pressão, tanto do ponto de vista físico-químico e organoléptico (Feng *et al*, 2016) e do ponto de vista microbiológico (Manassero *et al*, 2016).

### 2.2.1 Mecanismo de controle de população microbiana por calor

Segundo Fellows (2006), a utilização de altas temperaturas tem como alvo as moléculas orgânicas pertencentes às células dos microrganismos presentes no meio, como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Essas moléculas desempenham papel fundamental no funcionamento dessas células.

A parede celular da maioria das bactérias procariotas e alguns fungos é composta basicamente de carboidratos que ajudam a manter a forma da célula. O calor torna a ligação entre esses carboidratos fraca, tornando a parede celular estruturalmente instável.

A membrana das células é composta basicamente por fosfolipídios que têm como função básica o controle de entrada e saída de substâncias. Em altas temperaturas, lipídeos se tornam mais fluidos, tornando a membrana fraca, o que resulta no vazamento do líquido intracelular da célula. Vírus envelopados são envoltos também por fosfolipídios e são destruídos pelo mesmo mecanismo.

As proteínas celulares são altamente sensíveis ao calor, pois perdem sua estrutura tridimensional facilmente no processo de desnaturação por calor, perdendo sua função. Essas proteínas são formadas baseadas em informações contidas no material genético constituído de ácidos nucleico (como o DNA e o RNA). Altas temperaturas podem causar mutações fatais ao DNA que pode prejudicar a síntese de proteínas nas células e vírus.

### 2.2.2 Pasteurização

A pasteurização é uma forma relativamente branda de tratamento por calor, na qual o alimento é aquecido em temperaturas menores que 100°C (Fellows, 2006). É usada para inativar microrganismos sensíveis ao calor, como bactérias vegetativas, leveduras e fungos filamentosos, que podem estragar o alimento ou causar intoxicação alimentar. Na indústria do leite e laticínios, a Federação Internacional dos Laticínios define pasteurização como “um processo aplicado a um produto com o objetivo de minimizar possíveis ameaças à saúde vindas de microrganismos patogênicos associados ao leite, por tratamento térmico que seja consistente com mudanças químicas, físicas e organolépticas mínimas” (Lewis e Heppel, 2000).

Normalmente, o processo de pasteurização é complementado com outros métodos, como a refrigeração, no caso de leites. Os alimentos pasteurizados devem ser consumidos dentro de um curto espaço de tempo, entre 2 a 16 dias para os laticínios, dependendo do tipo de pasteurização empregada e do produto. A pasteurização é feita

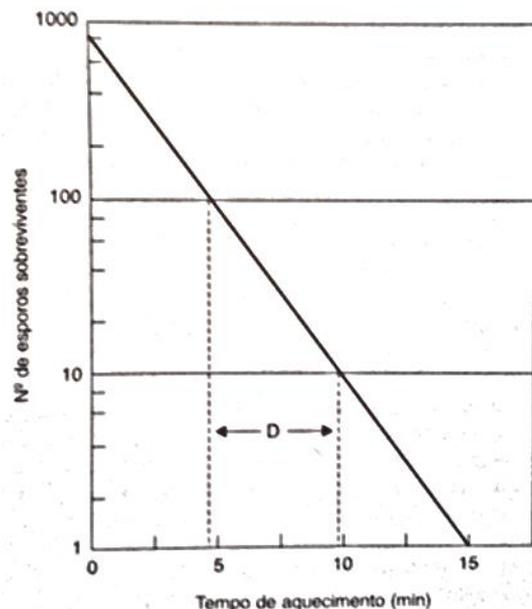
geralmente em dois binômios: em baixa temperatura por tempo prolongado ou em alta temperatura por tempo reduzido (Nobre e Lima, 2011).

### Pasteurização LTLT (Low Temperature, Long Time)

Segundo Lewis e Heppell (2000), a pasteurização LTLT (*Low Temperature, Long Time* ou em português, Baixa Temperatura e Tempo Longo) é o tratamento térmico mais antigo utilizado em leites e derivados. Ele é feito normalmente em batelada, processo que demanda enchimento do equipamento, aquecimento, manutenção da temperatura por um tempo mínimo, esvaziamento e limpeza. Quando esse tratamento é utilizado na indústria de laticínios, a temperatura é mantida entre 63°C e 65,6°C por 30 minutos.

A escolha do binômio temperatura-tempo é feito de acordo com a microbiota presente na matéria prima. A taxa de destruição de microrganismos é uma reação de primeira ordem, ou seja, uma mesma porcentagem de microrganismos irá morrer se mantida uma determinada temperatura mínima por um determinado intervalo de tempo, independentemente do número presente no começo. Isso é conhecido como ordem logarítmica de morte e é descrito pela curva da taxa de letalidade (Fellows, 2006).

Um exemplo dessa curva é ilustrado na Figura 2.1.

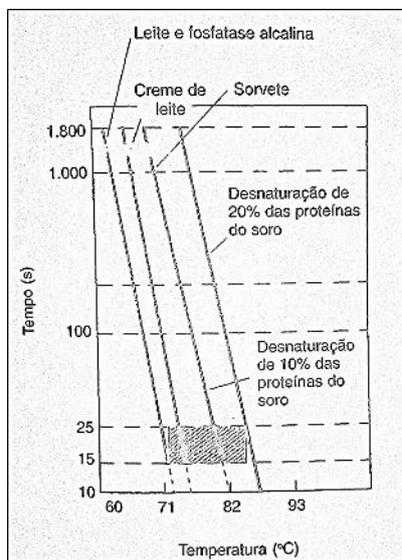


**Figura 2.1:** Exemplo de curva de taxa de letalidade.

FONTE: Fellows, 2006

O valor D, ilustrado na Figura 2.1 é o tempo necessário para destruir 90% dos microrganismos. Nesse caso, esse valor é de 5 minutos para uma determinada temperatura. Diferentes espécies microbianas possuem diferentes valores para D.

Entretanto, valores maiores de temperatura causam uma destruição mais rápida dos microrganismos. Curvas de D versus temperatura são chamadas curvas de tempo de destruição térmica (TDT), cuja inclinação é denominada valor z. Esse gráfico pode ser visto na Figura 2.2 para leite e derivados.



**Figura 2.2:** Gráfico TDT para leite, derivados e proteínas.  
FONTE: Fellows, 2006

Pode-se observar nessa figura que manter o leite aquecido por 1800 segundos em aproximadamente 60°C possui o mesmo efeito do aquecimento por 15 segundos em 71°C e o valor z para esse tipo de alimento é aproximadamente 10°C. Observa-se também que a desnaturação de proteínas possui curvas acima das curvas de letalidade dos microrganismos, indicando que a morte celular ocorre antes da desnaturação proteica.

### Pasteurização HTST (High Temperature, Short Time)

Os métodos de aquecimento HTST são os mais aplicados quando se trata de tecnologia de alimentos, pois eles são os que causam o menor dano nas características do alimento, por minimizar o tempo de contato entre o produto e o equipamento. A pasteurização HTST pode ser utilizada em poucos segundos de aplicação de calor e, como mostrado na Figura 2.2, tem a mesma equivalência do aquecimento em menor temperatura por vários minutos. Essa rapidez com a qual ocorre esse tratamento requer uma agitação muito eficiente do equipamento, de modo que todo produto seja mantido em determinada temperatura durante aqueles segundos de aplicação e esse é o grande desafio dos tratamentos HTST (Richardson, 2000).

Segundo Fellows, para o leite de origem animal, os binômios típicos de pasteurização HTST são:

- 71,8°C por 15 segundos;
- 88°C por 1 segundo;
- 94°C por 0,1 segundo;
- 100°C por 0,01 segundo.

### 2.2.3 Outros tipos de tratamentos térmicos

Novas tecnologias têm sido empregadas na indústria para promover o tratamento térmico de alimentos, com o objetivo de reduzir custos e danos às características desejáveis dos alimentos. Entre elas podemos citar o aquecimento por frequência de rádio, processamento por micro-ondas, infravermelho, aquecimento ôhmico, entre outros (Richardson, 2001). Dos tratamentos baseados apenas no binômio tempo-temperatura, podemos destacar o processo asséptico de temperatura ultra-alta (UHT) como tecnologia amplamente utilizada na indústria dos laticínios.

#### UHT (Ultra High Temperature)

Alguns alimentos possuem em sua microbiota bactérias termorresistentes, às vezes produtoras de esporos, que sobrevivem às temperaturas de pasteurização (Silva *et al*, 2012). O processo UHT, feito em temperaturas mais altas por tempos mais curtos, é possível quando o produto é esterilizado antes de ser envasado em um ambiente estéril em embalagens previamente esterilizadas. As grandes vantagens do processamento UHT são:

- eliminação da microbiota patogênica passível de se multiplicar;
- vida de prateleira de, no mínimo, seis meses sem refrigeração;
- menor perda de nutrientes em relação aos métodos convencionais.

Na Tabela 2.4 é apresentada a perda percentual de alguns nutrientes presentes no leite de origem animal depois de submetidos ao tratamento UHT e ao tratamento convencional.

**Tabela 2.4:** Perda (%) de nutrientes pelo processamento do leite após a esterilização UHT e após pasteurização.

| <b>Nutriente</b>          | <b>UHT</b> | <b>Pasteurização</b> |
|---------------------------|------------|----------------------|
| Tiamina                   | 10         | 35                   |
| Ácido ascórbico           | 25         | 90                   |
| Vitamina B12              | 10         | 90                   |
| Ácido fólico              | 10         | 50                   |
| Ácido pantotênico         | 0          | 0                    |
| Biotina                   | 0          | 0                    |
| $\beta$ -caroteno         | 0          | 0                    |
| Piridoxina                | 10         | 50                   |
| Vitamina D                | 0          | 0                    |
| Desnaturação de proteínas | 12 a 40    | 87                   |
| Lisina                    | -          | 10                   |
| Cistina                   | -          | 13                   |
| Valor biológico           | -          | 6                    |

ADAPTADO DE: Fellows, 2006.

Enquanto que a pasteurização trabalha com temperaturas brandas, o processamento UHT trabalha com temperaturas mais elevadas (no Reino Unido, o tratamento térmico para o leite é regulamentado em 1 segundo a 135°C). Isso muitas vezes requer equipamentos pressurizados que devem estar sempre estéreis. Deve-se trabalhar com embalagens estéreis e com mão de obra qualificada, o que torna esse processo mais caro que os tratamentos convencionais.

### 2.3 Propriedades físico-químicas dos alimentos

Um objetivo contínuo dos fabricantes de alimentos é buscar melhorias no processamento que retenham ou criem qualidades sensoriais ou reduzam os danos causados pelo processamento. Essas alterações podem ser analisadas quantitativamente através de análises físico-químicas. Os parâmetros comumente analisados são umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas.

#### 2.3.1 Umidade

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. A umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Na realidade, não é somente a água a ser removida, mas outras substâncias que se volatilizam nessas condições. O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado

de resíduo seco. O aquecimento direto da amostra a 105°C é o processo mais usual (Zenebon *et al*, 2008).

### 2.3.2 Cinzas

A cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NO<sub>2</sub>. A cinza é constituída principalmente de K, Na, Ca e Mg (em grandes quantidades) e Al, Fe, Cu, Mn e Zn (em menores quantidades). Segundo Cecchi (2003), estão presentes nos cereais em alta concentração Ca, P, Fe, Na, Mg e Cu. O teor de cinzas totais varia conforme o tipo de alimento. Para nozes, o teor de cinzas varia entre 1,7% e 3,6%.

### 2.3.3 Lipídeos

Lipídeos são gorduras e substâncias gordurosas presentes no alimento. São componentes insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Essas gorduras são ácidos graxos livres, mono, di e triacilgliceróis, fosfolipídeos, entre outros. O teor de gordura varia bastante de acordo com o tipo de alimento. Leite fresco de origem animal possui em torno de 3,7% de lipídeos. Em cereais, o teor de gorduras varia entre 3% e 5% (Cecchi, 2003).

### 2.3.4 Proteínas

As proteínas possuem função nutricional, são responsáveis por grande parte das propriedades organolépticas e da textura do alimento. A quantificação de proteínas é feita normalmente pelo método de Kjeldahl, no qual o que é medido de fato é a quantidade de nitrogênio total presente e, através de um fator de conversão, se determina a quantidade de proteínas. Em média, as proteínas possuem 16% de nitrogênio. Para este caso, o fator de conversão é de 6,25 (Cecchi, 2003).

$$16g N \rightarrow 100g \text{ proteínas}$$

$$n g N \rightarrow x g \text{ proteínas}$$

$$x = \frac{n \cdot 100}{16} = n \cdot 6,25 g \text{ proteínas}$$

Alguns alimentos, entretanto, possuem um fator de conversão específicos, pois fogem muito da média. No caso de oleaginosas, esse fator é de 5,46 (Zenebon *et al*, 2008).

### 2.3.5 Carboidratos

Os carboidratos possuem diversas funções nos alimentos: são fontes de nutrientes, adoçantes naturais, matéria-prima para produtos fermentados (ex. açúcar na fermentação do mosto da uva e obtenção do vinho), responsáveis pela reação de escurecimento em muitos alimentos, entre outros. A determinação de carboidratos é normalmente feita por diferença, ou seja, subtraindo-se os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos de 100% (Cecchi, 2003).

## 2.4 Microbiologia em leites vegetais

Os microrganismos podem desempenhar papéis muito importantes nos alimentos, sendo possível classificar os microrganismos em três grupos, dependendo do tipo de interação entre eles e o alimento: (1) microrganismos causadores de deterioração nos alimentos (alteração da cor, sabor, odor, textura e aspecto); (2) microrganismos patogênicos, refletindo condições precárias de higiene durante a produção, processamento, armazenamento, distribuição ou manuseio e (3) microrganismos presentes no alimento que causam alterações benéficas, modificando suas características originais de forma a transformá-lo em um novo alimento (Silva *et al.*, 1997).

Os microrganismos evidenciam um comportamento bastante variável em relação ao intervalo de pH em que apresentam crescimento. Em geral, as bactérias crescem com maior rapidez (pH ótimo) na faixa de 6,0 a 8,0; as leveduras entre 4,5 e 6,0 e os fungos entre 3,5 e 4,0 (ICMSF, 1980).

O pH de todas as nozes, inclusive da castanha de caju, é próximo ao neutro. Isso torna-as, em teoria, suscetíveis ao crescimento de vários tipos de microrganismos durante o seu desenvolvimento. Na prática, as cascas funcionam como uma efetiva barreira para a entrada de microrganismos durante a maturação das nozes. A baixa atividade de água da maioria das nozes inibe a deterioração bacteriana e a produção de toxinas. No entanto, a contaminação desses frutos pode ocorrer após a colheita, principalmente após a retirada das cascas (ICMSF, 2005).

Segundo pesquisas feitas por Câmara (2010), Lima *et al* (2011) e Rodrigues *et al* (2012), não há presença de *Salmonella sp.* em castanhas de caju industrializadas ou

processadas artesanalmente. Também não há presença de *Salmonella sp.* em manteiga de castanha de caju.

A Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece que sejam determinados, na água, para aferição de sua potabilidade, a presença de coliformes totais e termotolerantes, de preferência *Escherichia coli* (microrganismos indicadores), e a contagem de bactérias heterotróficas. Esses parâmetros são os mais comuns de serem analisados em alimentos quando se trata de segurança alimentar e determinação da eficiência de um tratamento térmico.

#### 2.4.1 *Microrganismos indicadores*

O número e tipos de microrganismos presentes nos alimentos produzidos podem ser usados para avaliar com segurança a qualidade microbiológica dos mesmos. Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração do alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento e armazenamento (Franco e Landgraf, 2008).

Os indicadores de contaminação fecal, tradicionalmente aceitos, pertencem a um grupo de bactérias denominadas coliformes. Denomina-se de bactérias do grupo coliforme bacilos gram-negativos, em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos que fermentam a lactose a 35-37°C, produzindo ácido, gás e aldeído em um prazo de 24-48 horas. São também oxidase-negativos e não formam esporos. O principal representante desse grupo de bactérias chama-se *Escherichia coli* (FUNASA, 2004).

A contagem de microrganismos indicadores (coliformes totais e *E. coli*) é normalmente feito pelo método do Número Mais Provável. Esse método é utilizado quando se espera baixo número do microrganismo alvo (<100/g) ou então quando, devido ao processamento sofrido pelo alimento, as células não se encontram em condições fisiológicas de formar colônias (MAPA, 2003).

#### 2.4.2 *Bactérias heterotróficas*

A Contagem Padrão de Bactérias é muito importante durante o processamento de alimentos, visto que permite avaliar a eficiência das várias etapas do tratamento utilizado para controle microbiológico. A contagem é feita diretamente na placa de Petri e esse

valor deve ser multiplicado pelo fator de diluição (por exemplo, uma contagem de 30 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) deve ser multiplicado por 100, caso a amostra tenha sido diluída em proporção 1:100, resultado em 3.000 UFC/g (MAPA, 2003).

É importante, também, conhecer a densidade de bactérias, tendo em vista que um aumento considerável da população bacteriana pode comprometer a detecção de organismos coliformes. Embora a maioria dessas bactérias não seja patogênica, pode representar riscos à saúde, como também, deteriorar a qualidade do alimento, provocando odores e sabores desagradáveis (FUNASA, 2006).

#### 2.4.3 *Staphylococcus aureus*

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma síndrome caracterizada por náuseas, vômitos, diarreia, mal-estar e debilidade geral. Os sintomas começam a manifestar-se de uma a seis horas após o consumo do alimento, sendo raramente mortal, mas pode levar à desidratação grave e posterior choque. Esses sintomas são devidos a diversos polipeptídeos antígenicamente distintos que atuam como toxinas eméticas: as enterotoxinas estafilocócicas. Alimentos processados são possíveis de causar uma intoxicação mesmo após destruição de elevada população de *S. aureus*, devido à termorresistência das enterotoxinas (ICMSF, 1988).

### **3 Materiais e Métodos**

A estrutura a seguir apresenta as etapas seguidas durante o trabalho, a fim de avaliar a contribuição do tratamento térmico no aumento da vida de prateleira do leite vegetal de castanha de caju por pasteurização LTLT.

Os tratamentos térmicos foram realizados em escala laboratorial, através de banhos da água. Para confirmar a eficiência do tratamento, análises microbiológicas foram realizadas, comparando o leite cru (sem tratamento) com o leite tratado. A qualidade do leite após o tratamento foi avaliada através de análises físico-químicas do leite cru e do tratado.

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi composta por castanha de caju, obtidas de um mesmo lote, a fim de minimizar discrepâncias nos resultados das análises.

#### **3.1 Obtenção do leite de castanha de caju**

Para a preparação de uma amostra do leite vegetal, são necessários 100 g de castanhas. Elas foram previamente hidratadas com água em baixa temperatura (aproximadamente 4°C) por 12 horas. Passado esse tempo, a água de hidratação foi escoada e as castanhas foram lavadas com água filtrada.

Uma prática comum na indústria alimentícia é congelar a matéria-prima para utilizá-la posteriormente. Portanto, as castanhas foram mantidas congeladas em temperatura aproximada de -18°C em freezer por sete dias, antes de dar prosseguimento à extração do leite.

As castanhas hidratadas e congeladas foram então cominuídas com água morna (aproximadamente 40°C) filtrada, utilizando-se um liquidificador caseiro da marca Phillips com potência de 600W. A concentração de castanhas utilizada foi de 10% - concentração comumente utilizada na indústria de leites vegetais. A cominuição é mantida por um período de 3 minutos, até a obtenção de uma solução homogênea. O leite de castanha de caju é mostrado na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Aspecto do leite de castanha-de-caju após cominuição das castanhas

### 3.2 Avaliações piloto

Por ser um produto muito novo, existem poucas pesquisas feitas a respeito da microbiota presente no leite de castanha de caju. Nas análises microbiológicas, as diluições das amostras devem ser feitas de maneira que o crescimento dos microrganismos não seja muito alto, a ponto de não poder ser feita a leitura. Ainda, é possível que os resultados para coliformes sejam mascarados pela grande presença de bactérias heterótrofas.

Para buscar qual a melhor diluição para as futuras análises, foram feitas avaliações piloto, anteriores à execução da pasteurização. Nessas análises, duas amostras foram utilizadas:

- leite de castanha de caju cru (sem tratamento térmico);
- leite de castanha de caju aquecido até 62°C em fogão doméstico comum, seguido de resfriamento em banho de gelo.

Os parâmetros analisados foram:

- contagem de heterotróficos após 24h;
- contagem de heterotróficos após 48h;
- coliformes totais;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*.

Optou-se por não fazer a análise para presença de *Salmonella sp.*, pois a mesma não costuma estar presente na castanha-de-caju.

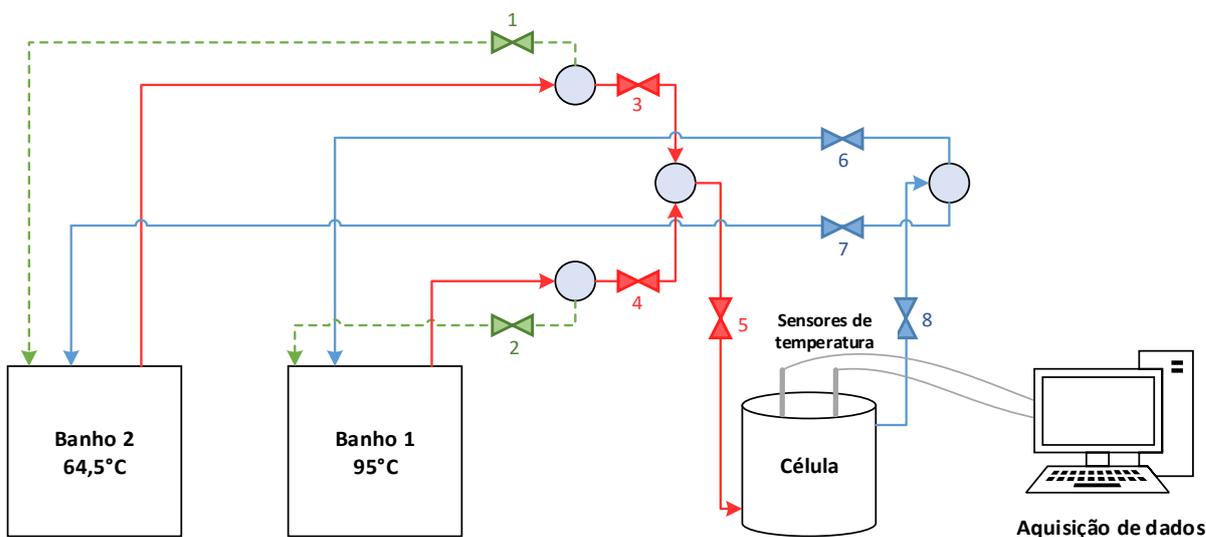
Conforme os resultados apresentados nas análises de sondagem, optou-se por analisar futuramente apenas os parâmetros que mostraram algum resultado positivo.

### 3.3 Tratamento térmico

A pasteurização LTLT foi realizada utilizando-se dois banhos-água agitados de escala de laboratório (Linha Alpha, LAUDA). O primeiro banho, mantido em 95°C, teve a função de aquecer a amostra da temperatura ambiente até aproximadamente 60°C. O segundo banho foi mantido em 64,5°C e teve como objetivo fazer o aquecimento final de 60°C até 63,5°C e manter a amostra nessa temperatura por 30 minutos. A escolha desse binômio baseou-se no binômio já utilizado na indústria de laticínios de origem animal, alimento muito semelhante ao leite vegetal estudado nesse trabalho.

O segundo banho foi configurado para se manter 1°C acima da temperatura que se deseja manter, pois existe uma perda de calor para o ambiente. Na

Figura 3.2 é ilustrado um esquema que representa os dois banhos, no qual as correntes vermelhas representam as saídas de cada banho, as correntes azuis as correntes após passar pela célula de aquecimento e as verdes tracejadas, as correntes de *by-pass*.



**Figura 3.2:** Esquema representativo dos banhos-água utilizados

A amostra do leite vegetal foi colocada na célula de aquecimento (Figura 3.3) encamisada, pela qual é passado o fluido aquecido dos banhos. A amostra foi mantida em agitação para evitar a formação de um gradiente de temperatura no interior da célula.



**Figura 3.3:** Célula de aquecimento.

A etapa de aquecimento foi realizada com as válvulas 1, 4, 5, 6 e 8 abertas e o restante fechadas. Essa configuração permite que apenas o fluido do banho 1 esteja percorrendo a célula, enquanto que o banho 2 se mantém ligado em um circuito de *by-pass*. A temperatura da amostra foi acompanhada através de dois sensores de temperatura conectados a um computador onde é feita a aquisição dos dados. Quando se observou que a temperatura da amostra atingiu 60°C, acionou-se então o banho 2, mantendo-se as válvulas 2, 3, 5, 7 e 8 abertas e as demais fechadas – o que mantém o banho 1 ligado em *by-pass*.

A coleta da amostra crua (sem o tratamento térmico) foi feito logo após a preparação da matéria-prima. O experimento foi realizado então em triplicada e, após cada batelada, foi coletada uma amostra do leite pasteurizado em tubos tipo Falcon de 50 ml. As amostras foram então encaminhadas para a análise microbiológica.

Todo sistema de aquecimento executado no LATEPA (Laboratório de Tecnologia e Processos em Alimentos) está ilustrado na Figura 3.4.



**Figura 3.4:** Banhos-água e célula de aquecimento.

### 3.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas a seguir foram realizadas no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) segundo a Instrução Normativa 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003).

#### 3.4.1 Contagem padrão de bactérias heterotróficas

O método de semeadura em superfície foi utilizado para a contagem de colônias de bactérias heterotróficas (Figura 3.5). Foi transferido para uma placa de Petri contendo o ágar PCA (*Plate Count Agar*), 0,1ml de cada amostra de leite vegetal utilizando um conjunto de pipeta e ponteira. A amostra foi então inoculada pelo método de espalhamento em superfície da placa utilizando uma alça de Drigalski de vidro previamente esterilizada em chama de bico de Bunsen.

Foram realizados três ensaios com a amostra de leite vegetal pasteurizado e um ensaio da amostra de controle (leite cru, sem tratamento). As placas contendo PCA e a amostra foram então incubadas em posição invertida por 48h à 37°C.



**Figura 3.5:** Método de semeadura em superfície para contagem de heterotróficos.

#### 3.4.2 Coliformes totais

Para a análise da presença de coliformes totais, foi utilizado o método de fermentação de tubos múltiplos. Esse método se divide em duas etapas: o teste presuntivo, no qual se avalia a possível presença dos coliformes. Caso esse teste dê positivo, é realizado o teste confirmatório, que, como já diz o nome, confirma a presença de coliformes e fornece um resultado quantitativo.

#### Teste presuntivo

Foram tomados nove tubos de ensaio divididos em 3 grupos de 3 tubos contendo 10 ml de caldo lactosado e um tubo de Duhran. Três desses tubos continham caldo lactosado de concentração dupla e seis caldo lactosado de concentração simples. No primeiro grupo de 3 tubos (com caldo lactosado duplo), foram inoculados 10 ml da

amostra em cada tubo (diluição 1:1). No segundo grupo, foram inoculados 1 ml da amostra em cada tubo (diluição 1:10). No terceiro grupo, foram inoculados 0,1 ml da amostra em cada tubo (diluição 1:100). No caso da amostra de controle (leite cru), foi realizada uma diluição seriada até  $10^{-2}$  em água peptonada antes da inoculação nos tubos.

Os tubos foram fechados com algodão e seu conteúdo foi homogeneizado com um *shaker* para tubos de ensaio. Os tubos foram então incubados por 24h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . O resultado positivo se dá através da observação de gás nos tubos de Duhran e a turvação do meio.

### Teste confirmativo

Para cada tubo com resultado positivo no teste presuntivo, tomou-se um tubo com 10 ml de meio Verde Brilhante e um tubo de Duhran. Com uma alça de platina, previamente flambada e fria, foi retirada de cada tubo positivo uma alíquota de amostra e inoculada no tubo correspondente contendo o meio Verde Brilhante. Este procedimento chama-se repicagem.

Os tubos foram identificados com o volume de amostra inoculado inicialmente (10, 1 ou 0,1 ml). Esses tubos foram novamente incubados por 24h a  $35^\circ\text{C}$ . O resultado positivo se dá por turvação do meio e formação de gás no tubo de Duhran.

Os resultados quantitativos são expressos em NMP (Número Mais Provável)/ml de amostra. Para se determinar o NMP, verifica-se a combinação formada pelo número de tubos positivos que apresentaram as diluições 1:1; 1:10 e 1:100 no Teste Confirmatório. Por exemplo, caso 3 tubos de diluição 1:1, 1 tubo de diluição 1:10 e nenhum tubo de diluição 1:100 deram positivo, diz-se que o resultado deu 3-1-0 e o resultado para esse caso é de 4,3 NMP/ml. A tabela completa de NMP para conjuntos de três tubos é apresentada no Anexo A.

Um fluxograma da análise de coliformes totais pode ser observado na Figura 3.6.

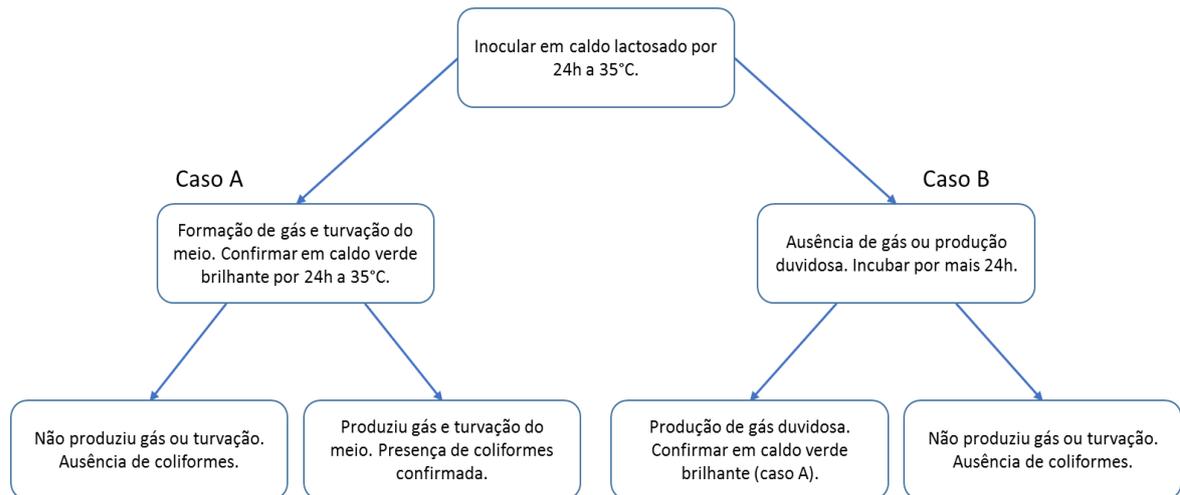


Figura 3.6: Fluxograma para análise de coliformes totais.

### 3.4.3 *Escherichia coli*

A presença de *E. coli* foi investigada de maneira similar ao teste confirmatório de coliformes totais. As amostras positivas no caldo Verde Brilhante do teste confirmatório foram inoculadas em placas com meio Eosina Azul de Metileno (EMB). As placas foram incubadas a 37°C por 48h, a presença de cor verde metálica após incubação evidencia a presença da *E. coli* e a determinação do NMP é dado pela mesma tabela utilizada no teste confirmatório para coliformes totais. Um esquema representativo dessa análise é ilustrado na Figura 3.7.

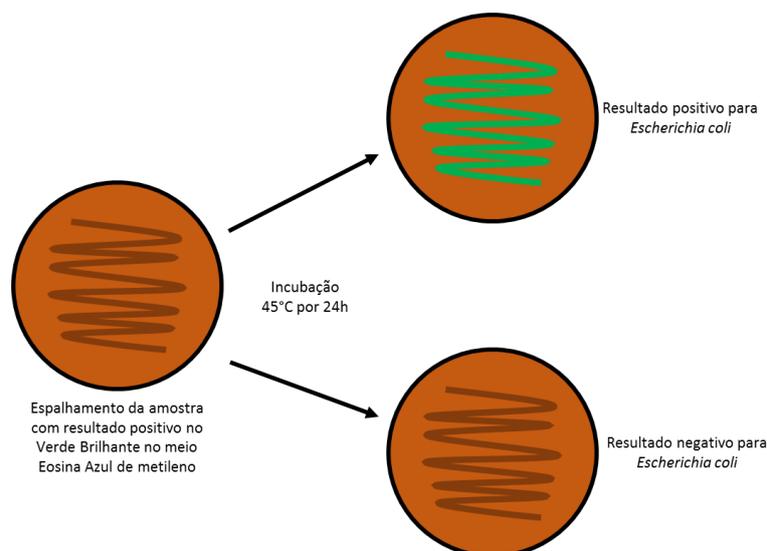


Figura 3.7: Esquema representativo da análise de *E. coli* em meio Eosina Azul de Metileno (EMB).

### 3.5 Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS (ICTA). No total, 6 parâmetros foram analisados: umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos (por diferença).

#### 3.5.1 Determinação de umidade

A análise é feita através da remoção de água de uma alíquota do leite vegetal em estufa aquecida. Pesou-se uma massa de aproximadamente 3g de amostra, colocou-se em estufa aquecida a 105°C por 3 horas e pesou-se a cápsula novamente. A diferença de massa inicial e final é a água evaporada. O cálculo da umidade é dado por:

$$\text{Umidade (\%, m/m)} = \left( \frac{M - m}{M} \right) \times 100$$

Onde:

M – massa em gramas de amostra;

m – massa em gramas de amostra seca.

A Figura 3.8 abaixo mostra as cápsulas de alumínio com a amostra de leite vegetal. O valor para a umidade é uma média da umidade da amostra das seis cápsulas.



**Figura 3.8:** Cápsulas com a amostra antes da etapa de aquecimento em estufa.

#### 3.5.2 Determinação de cinzas

Na análise de cinzas, foram pesadas 5 g de amostra em um cadinho de porcelana (Figura 3.9). Os cadinhos foram então levados para uma mufla com temperatura entre 500 e 600°C, onde foram mantidos por tempo suficiente até o peso da cinza ser constante. O cálculo do teor de cinza é dado por:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m}{M} \times 100$$

Onde:

m – massa de cinzas obtida após queima na mufla;

M – massa total de amostra presente no cadinho de porcelana.

A Figura 3.9 abaixo mostra a amostra nos cadinhos de porcelana. O teor de cinzas foi dado pela média do teor de cinza presente em cada um dos cadinhos.



**Figura 3.9:** Cadinhos de porcelana contendo a amostra antes do aquecimento na mufla.

### 3.5.3 Determinação de lipídeos

A determinação de lipídeos foi feita pelo método de Bligh e Dyer (Bligh e Dyer, 1949). O método se baseia na extração dos lipídeos por clorofórmio e quebra das ligações de lipídeos e proteínas por metanol. Na Figura 3.10 abaixo é representado a última etapa da análise, que é a separação do clorofórmio para posterior medição do teor de lipídeos.



**Figura 3.10:** Decantação e filtração do sistema clorofórmio + metanol + amostra e coleta do clorofórmio com lipídeos.

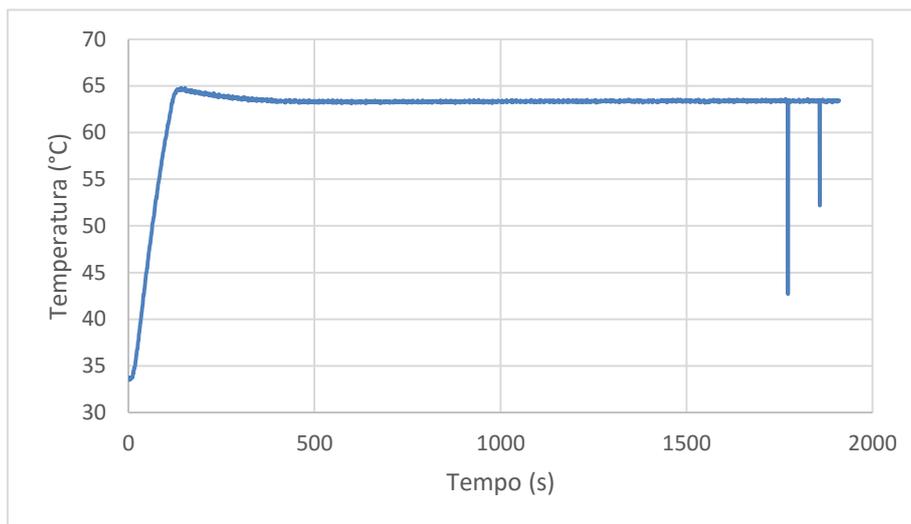
#### 3.5.4 *Determinação de proteínas*

O teor de proteínas foi feito pelo medido pelo método de Kjeldahl. O que foi determinado de fato é o teor de nitrogênio orgânico presente na amostra e esse valor foi convertido para teor de proteínas por um fator de conversão de 5,46.

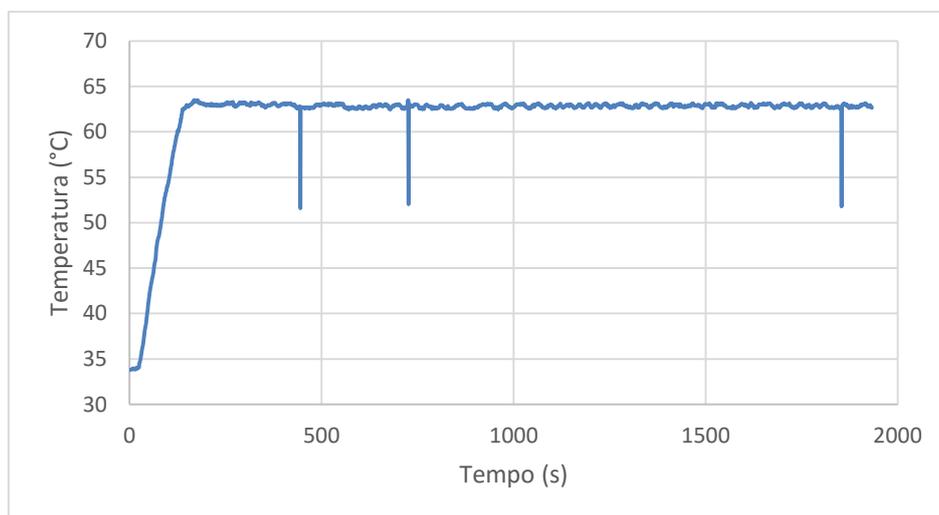
## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Tratamentos térmicos

Através do aquecimento com banho de água foi possível manter a temperatura de aproximadamente 63,5°C por 30 minutos. Na Figura 4.1 e Figura 4.2 são mostrados dois dos seis perfis de aquecimento realizados nos dias 09/06 e 23/06.



**Figura 4.1:** Um dos perfis de aquecimento da pasteurização do leite de castanha de caju realizados em triplicata no dia 09/05/2016.



**Figura 4.2:** Um dos perfis de aquecimento da pasteurização do leite de castanha de caju realizados em triplicata no dia 23/05/2016.

Os pontos fora do patamar de aquecimento são erros de leitura do software utilizado para a aquisição de dados.

## 4.2 Análises microbiológicas

### 4.2.1 Avaliações piloto

Três avaliações piloto foram realizadas com o objetivo de determinar qual a diluição mais adequada para as amostras de controle e as amostras tratadas. Na Tabela 4.1 estão registrados os resultados da primeira análise, feita no dia 11/04/2016. Nesta tabela, as amostras A e B se referem às amostras controle, sem nenhum tratamento térmico, analisadas sem fazer nenhuma diluição. As amostras C, D, E e F se referem às amostras do leite tratadas com aquecimento em fogão doméstico.

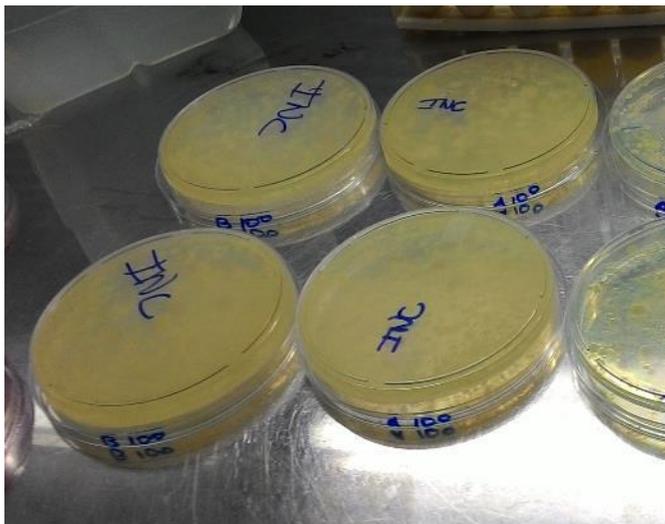
**Tabela 4.1:** Resultados da primeira análise de sondagem.

| Amostras                           | Contagem de Heterotróficos | Contagem de Heterotróficos | Coliformes totais | <i>Escherichia coli</i> | Contagem de <i>Staphylococcus</i> |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|                                    | Log 10 (UFC/ml) 24 h       | Log 10 (UFC/ml) 48 h*      | Log 10 NMP/ml     | Log 10 NMP/ml           | Log 10 (UFC/ml) 24 h              |
| <b>A (diluição 10<sup>0</sup>)</b> | 4,8                        | 5,6                        | 2                 | 2                       | 1                                 |
| <b>B (diluição 10<sup>0</sup>)</b> | 4,7                        | 5,6                        | 2                 | 2                       | 0,7                               |
| <b>C</b>                           | 1,8                        | ND                         | 0,36              | 0,36                    | 0                                 |
| <b>D</b>                           | 1,7                        | ND                         | 0,63              | 0,63                    | 0,7                               |
| <b>E</b>                           | 1,5                        | ND                         | 0,63              | 0,63                    | 0                                 |
| <b>F</b>                           | 2,1                        | ND                         | 0,97              | 0,63                    | 0,7                               |

\*retirada nova alíquota da amostra mantida em refrigeração e semeadura em diluição mais alta;  
ND - Não determinado

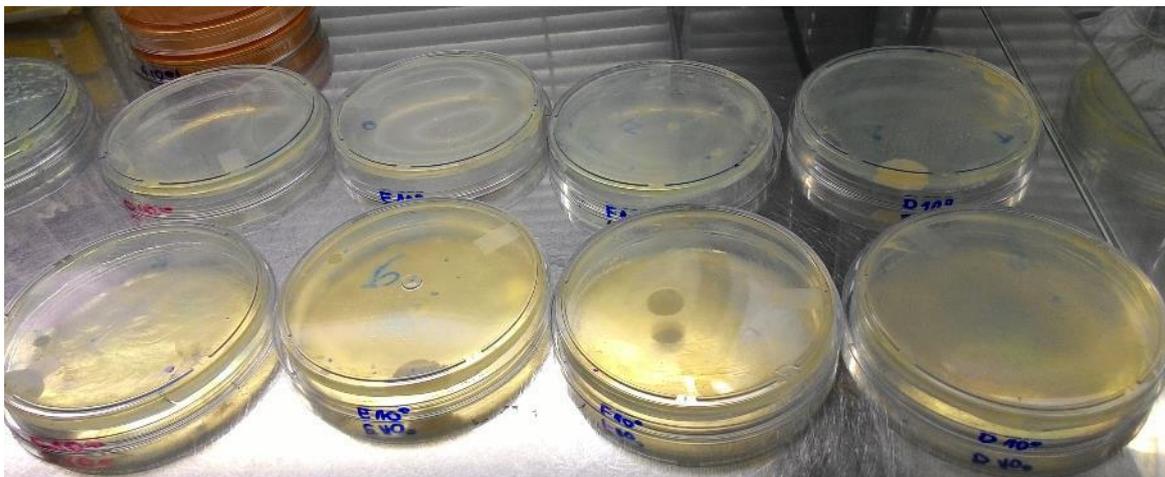
Observa-se na Tabela 4.1 que o tratamento térmico realizado em fogão doméstico já contribuiu significativamente para a redução da microbiota presente, tanto na contagem de microrganismos heterotróficos, quanto no Número Mais Provável de coliformes totais e *Escherichia coli*. A contagem de *Staphylococcus aureus* foi muito baixa – considera-se nesse caso que ausência do parâmetro para as amostras analisadas.

Na Figura 4.3 pode-se observar que o crescimento bacteriano para as amostras controle foi muito alto após 48h de incubação.



**Figura 4.3:** Contagem de heterotróficos nas amostras de controle.

As amostras tratadas com aquecimento em fogão doméstico tiveram um crescimento difuso após 48h, com colônias de diferentes tamanhos, variando entre uma amostra e outra. Portanto, sua contagem se deu como “não-determinada”. A Figura 4.4 mostra o crescimento bacteriano nas amostras tratadas após 48h.



**Figura 4.4:** Crescimento de heterotróficos nas amostras C, D, E e F após 48h.

A análise de coliformes totais e fecais ficou prejudicada pela alta concentração da amostra controle. Não foi possível observar se houve ou não formação de gás no interior dos tubos de Duhran nos tubos contendo caldo lactosado duplo na proporção de 1:1, conforme a Figura 4.5.



**Figura 4.5:** Análise presuntiva de coliformes totais e formação de precipitado nos tubos de diluição 1:1.

A ausência de *Staphylococcus* pode ser observada na Figura 4.6, que mostra a placa contendo ágar sal manitol e a ausência de crescimento bacteriano.



**Figura 4.6:** Ausência de *Staphylococcus* na amostra controle.

Visto que era necessário fazer diluições na amostra do leite cru (sem tratamento térmico), outras duas avaliações piloto foram realizadas antes de iniciar as análises do leite pasteurizado para definir qual diluição era a mais adequada. A contagem em placas ideal varia na bibliografia – alguns autores recomendam entre 25 e 250 colônias e outros recomendam entre 30 e 300 colônias. No caso da contagem por NMP, é recomendável que existam resultados positivos e negativos nas diferentes diluições – todos tubos positivos ou todos tubos negativos indicam problemas na diluição da amostra (Tortora *et al.*,2012).

As outras duas avaliações piloto tiveram como objetivo acertar a diluição da amostra controle (de leite cru). Na amostra A, o leite cru foi diluído em água peptonada

em uma relação 1:10 e então foi inoculado 1 ml dessa amostra em duas placas com meio PCA pelo método de espalhamento. As amostras B e C, também de leite cru, foram diluídas em uma proporção 1:100 e as mesmas foram inoculadas em placas com meio PCA. Após o período de incubação de 48h, fez-se a contagem de colônias e um valor médio da contagem das duas placas inoculadas foi utilizado como valor final. A Tabela 4.2 mostra os resultados obtidos.

**Tabela 4.2:** Contagem de colônias em meio PCA da amostra de leite cru feitas em duplicata.

| Amostra | Diluição  | Contagem de colônias | Média |
|---------|-----------|----------------------|-------|
| A       | $10^{-1}$ | 202<br>162           | 182   |
| B       | $10^{-2}$ | 41<br>43             | 42    |
| C       | $10^{-2}$ | 56<br>70             | 63    |

Nota-se que todos valores de contagem ficaram dentro do padrão aceitável. O resultado para o crescimento de coliformes totais e fecais também foi aceitável nas duas diluições, pois forneceu tubos positivos e negativos no teste de fermentação em tubos múltiplos. Optou-se por utilizar a diluição  $10^{-2}$  no leite cru pela maior facilidade na contagem.

#### 4.2.2 Análise do leite pasteurizado

Devido à ausência de *Staphylococcus* nas avaliações preliminares, optou-se por não fazer essa análise nas amostras do leite vegetal pasteurizado. A contagem bacteriana foi feita após 48h de incubação. A amostra A é a amostra controle (leite cru, sem tratamento) e as amostras B, C e D são amostras do leite vegetal pasteurizado, em triplicata. Os resultados são mostrados na Tabela 4.3 e na

Tabela 4.4.

**Tabela 4.3:** Resultados das análises microbiológicas da pasteurização realizada no dia 09/06.

| AMOSTRA                        | Contagem de Heterotróficos<br>Log 10 (UFC/mL) | Coliformes totais<br>Log 10 (NMP/ml) | <i>Escherichia coli</i><br>Log 10 (NMP/ml) |
|--------------------------------|---|--------------------------------------|--|
| A (diluição 10 <sup>-2</sup> ) | 4,47  | 3,3                                  | 3,3  |
| B (diluição 10 <sup>0</sup> )  | 1,54  | 0                                    | 0  |
| C (diluição 10 <sup>0</sup> )  | 2,09  | 0                                    | 0  |
| D (diluição 10 <sup>0</sup> )  | 1,65  | 0                                    | 0  |

**Tabela 4.4:** Resultados das análises microbiológicas da pasteurização realizada no dia 23/06.

| AMOSTRA                        | Contagem de Heterotróficos<br>Log 10 (UFC/mL) | Coliformes totais<br>Log 10 (NMP/ml) | <i>Escherichia coli</i><br>Log 10 (NMP/ml) |
|--------------------------------|---|--------------------------------------|--|
| A (diluição 10 <sup>-2</sup> ) | 3,4   | 3                                    | 3  |
| B (diluição 10 <sup>0</sup> )  | 1,2   | 0                                    | 0  |
| C (diluição 10 <sup>0</sup> )  | 1,6   | 0                                    | 0  |
| D (diluição 10 <sup>0</sup> )  | 1,8   | 0                                    | 0  |

Levando em consideração que os resultados são expressos em escala logarítmica, pode-se observar uma redução drástica de Unidades Formadoras de Colônias das amostras pasteurizadas em relação à amostra sem nenhum tratamento. Na análise do dia 09/06, houve uma redução de 29.000 UFC/ml para 68 UFC/ml nas amostras pasteurizadas (em média). Na análise do dia 23/06, houve uma redução de 2.450 UFC/ml para 38 UFC/ml nas amostras pasteurizadas.

Um padrão estabelecido pela Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde determina que, para água ser considerada potável, ela deve conter no máximo 500 UFC/ml, o que mostra que a pasteurização lenta é eficiente para tornar a bebida potável, em termos de crescimento de bactérias heterotróficas.

A ausência de coliformes totais e fecais nas amostras pasteurizadas também é um indício da eficiência do processo, que eliminou a carga de coliformes que estavam presentes no leite cru devido à, provavelmente, uma contaminação nas próprias

castanhas de caju ou então nos equipamentos utilizados para obtenção do leite e do próprio aquecimento, visto que nenhum dos equipamentos foi previamente esterilizado.

### 4.3 Análise Físico-Química

O resultado das análises físico-químicas está mostrado na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Comparação da composição centesimal da amostra de leite cru e do leite pasteurizado.

|                     | Leite cru | Leite pasteurizado |
|---------------------|-----------|--------------------|
| <b>Cinzas</b>       | 0,25%     | 0,17% ± 0,05%      |
| <b>Umidade</b>      | 89,13%    | 90,50% ± 0,2%      |
| <b>Lipídeos</b>     | 5,68%     | 4,70% ± 0,1%       |
| <b>Proteínas</b>    | 2,38%     | 2,30%              |
| <b>Carboidratos</b> | 2,59%     | 2,33%              |

Pode-se observar uma grande semelhança na composição centesimal do leite vegetal antes e após a pasteurização. A única diferença se deu na fração de lipídeos – uma queda de aproximadamente 1% na composição. Essa perda de lipídeos pode ser justificada pelas reações de oxidação que ocorrem naturalmente, tanto em gorduras saturadas como insaturadas, formando substâncias voláteis com odor e sabor indesejáveis. O calor acelera essas reações, um dos motivos pelos quais tecnologias de tratamento térmico rápido são preferíveis (Araújo, 2001). Essa diferença pode ter também se dado por uma possível perda de material na coleta das amostras para a análise microbiológica – parte do material pode ter ficado aderido nas paredes da célula de aquecimento do sistema.

## **5 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros**

A pasteurização lenta mostrou-se eficiente na remoção de grande parte da carga microbiológica presente no leite cru. Isso indica que a deterioração do produto por microrganismos será mais lenta após o tratamento. A presença de coliformes no leite cru indica más condições de higiene do armazenamento ou processamento das castanhas de caju ou até a possível presença de patógenos. O tratamento foi eficaz também na inativação dos coliformes – não sendo observada sua presença nas amostras tratadas. Esse resultado é positivo principalmente para pequenos produtores, que podem iniciar a produção dessa bebida em pequena escala, utilizando equipamentos simples de pasteurização.

As características físico-químicas, com exceção dos lipídeos (queda de 1% na composição centesimal), se mantiveram praticamente inalteradas – o que indica que a pasteurização pouco alterou as características do leite vegetal fresco.

O aquecimento realizado nas avaliações piloto indicam que talvez não haja necessidade de manter o aquecimento por 30 minutos, visto que esse tratamento já conseguiu diminuir bastante a carga microbiológica do leite cru. Por isso é válido o estudo da pasteurização variando apenas o tempo de aquecimento.

Como trabalhos futuros, sugere-se realizar a pasteurização rápida, pois, segundo a literatura, esse tipo de tratamento é menos agressivo para o alimento e mais usado em indústrias de grande porte. Aliado ao tratamento térmico, poderia se utilizar algum aditivo químico, como por exemplo o ácido láctico, que pudesse contribuir ainda mais com o aumento da vida de prateleira do leite vegetal. Para a análise dos resultados, é de extrema importância fazer o teste de vida de prateleira de fato, mantendo o leite em ambiente refrigerado e realizando as análises microbiológicas diariamente, para verificar a deterioração progressiva do leite. É necessário também fazer uma análise sensorial do produto para avaliar se a perda de lipídeos foi por oxidação. A ocorrência de oxidação pode ser confirmada sensorialmente.

## 6 Referências

1. AMERICAN HEART ASSOCIATION. Know Your Fats, 2014. Disponível em: <[http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/PreventionTreatmentofHighCholesterol/Know-Your-Fats\\_UCM\\_305628\\_Article.jsp#.V2YA6PkrKUK](http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/PreventionTreatmentofHighCholesterol/Know-Your-Fats_UCM_305628_Article.jsp#.V2YA6PkrKUK)>. Acesso em: 07 jun. 2016.
2. ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos – Teoria e Prática. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2ª ed., 2001.
3. AZANHA, A.B.; FARIA, J. A. F. Use of Mathematical Models for Estimating the Shelf-life of Cornflakes in Flexible Packaging. *Packaging Technology and Science*; n. 18, p. 171–178, 2005.
4. BOLLAND, M. J.; LEUNG, W.; TAI, V.; BASTIN, S.; GAMBLE, G. D.; GREY, A.; REID, I. A. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. 351, <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.h4580>, 2015.
5. CÂMARA, C. R. Indicadores de qualidade de amêndoas de castanha de caju em pedaços durante o processo industrial. Tese de Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, 2010.
6. CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2 ed, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
7. DÜRR, J. W. Leite: Produção de leite conforme Instrução Normativa nº 62. 4. ed. Brasília: SENAR, p. 28-29, 2012.
8. ENIG, M. Coconut Oil & Coconut Milk: Scientific Paper Abstracts. *Indian Coconut Journal*, 1995.
9. FELLOWS, P.J. Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e prática. Tradução: Florencia Cladera Oliveira et al, 2 ed, Porto Alegre: Artemed, 2006.
10. FENG, Z.; XINGYUN, P.; XIAODI, S.; SHUNTANG, G. Effects of high-temperature pressure cooking and traditional cooking on soymilk: Protein particles formation and sensory quality. *Food Chemistry*, n. 209 p. 50–56, 2016.
11. FESKANICH, D.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A. Milk, Dietary Calcium, and Bone Fractures in Women: A 12-Year Prospective Study. *American Journal of Public Health*, vol. 87, n. 6, 1997.
12. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

13. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Ministério da Saúde. Manual prático de análise de água. 2ª ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006.
14. GYESZLY, S. W.; Total System Approach to Predict Shelf Life of Packaged Food Products. Food Packaging Technology, ASTM STP 1113, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 46-50, 1991.
15. HENRIKSEN, J. Milk for health and wealth. Rural Infrastructure and Agro-Industries Division Food and Agriculture Organization of the United Nations, n. 6, p. 1-2, 2009.
16. INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 3. Microbial Ecology of Foods. Food Commodities. v. 2. New York: Academic Press, 1980.
17. LEWIS, M.; HEPPEL, N. Continuous Thermal Processing of Foods: Pasteurization and UHT Sterilization. Aspen Publishers, Inc., 2000.
18. LIMA, J. R.; GARRUTI, D. S.; BRUNO, L. M. Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of cashew nut butter made from different kernel grades-quality. LWT - Food Science and Technology, n. 45, p. 180-185, 2012.
19. LUDWIG, D. S.; WILLET, W. C. Three Daily Servings of Reduced-Fat Milk: An Evidence-Based Recommendation? JAMA Pediatrics, vol. 167, n. 9, 2013.
20. MANASSERO, C. A.; VAUDAGNA, S. R.; SANCHO, A. M.; AÑÓN, M. C.; SPERONI, F. Combined high hydrostatic pressure and thermal treatments fully inactivate trypsin inhibitors and lipoxygenase and improve protein solubility and physical stability of calcium-added soymilk. Innovative Food Science and Emerging Technologies, n. 35, p. 86-95, 2016.
21. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária; Instrução Normativa Nº 62 - Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, 2003.
22. NOBRE, J. A.; LIMA, D. M. Tecnologia do Processamento de Alimentos: Projeto Formare. São Paulo: Grupo Ibmecc Educacional, 2011.
23. RICHARDSON, P. Thermal Technologies in Food Processing. Washington DC: Woodhead Publishing Limited, 2001.
24. RODRIGUES, A. M.; CALVET, R. M.; SILVA, M.; FILHO, F.; MONTE, A. M.; PEREYRA, C. M.; MURATORI, M. C.; NÓBREGA, F. C.; PEREIRA, M. M. Qualidade microbiológica de

- castanhas de caju (*Anacardium occidentale*, L.) industrializadas e processadas artesanalmente. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(2):415-9.
25. SILVA, G.; SILVA, A. M.; FERREIRA, M. P. Produção Alimentícia: Processamento de leite. Recife: EDUFRPE, 2012.
26. VEGARA, S.; MARTÍ, N.; MENA, P.; SAURA, D.; VALERO, M. Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. *LWT - Food Science and Technology*, n. 54, p. 592-596, 2013.
27. WONG, V. Soy Milk Fades as Americans Opt for Drinkable Almonds. *Business Week*, 2013.
28. ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

**Anexo A**

Tabela de NMP e limites a 95% de confiança para várias combinações de resultados positivos quando três tubos são usados para diluição (10mL; 1mL e 0,1mL).

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

(FONTE: MAPA, 2003)