



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ELISA BARISON GRAGNANI

**COCONUT WATER PROCESSING BY
HIGH ISOSTATIC PRESSURE TECHNOLOGY**

*PROCESSAMENTO DE ÁGUA DE COCO POR
TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA*

CAMPINAS

2016

ELISA BARISON GRAGNANI

COCONUT WATER PROCESSING BY
HIGH ISOSTATIC PRESSURE TECHNOLOGY

*PROCESSAMENTO DE ÁGUA DE COCO POR
TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA*

*Dissertation presented to the School of Food
Engineering of University of Campinas in
partial fulfilment of the requirements for the
degree of Master in Food Technology.*

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestra em Tecnologia de Alimentos.*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cristianini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ELISA
BARISON GRAGNANI, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. MARCELO CRISTIANINI

**CAMPINAS
2016**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131012/2013-14

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

G759c Gragnani, Elisa Barison, 1990-
Coconut water processing by high isostatic pressure technology / Elisa Barison Gragnani. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Marcelo Cristianini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Água de coco. 2. Alta pressão. 3. Enzimas. 4. Microrganismos. 5. Vida de prateleira. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Processamento de água de coco por tecnologia de alta pressão isostática

Palavras-chave em inglês:

Coconut water

High pressure

Enzymes

Microorganisms

Shelf life

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Carmen Cecilia Tadini

Marcelo Cristianini

Juliano Lemos Bicas

Data de defesa: 26-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Marcelo Cristianini (DTA/FEA-UNICAMP) - Orientador

Carmen Cecilia Tadini (DEQ/POLI-USP) – Membro titular

Juliano Lemos Bicas (DCA/FEA-UNICAMP) – Membro titular

Alfredo de Almeida Vitali (PESQUISADOR - CAMPINAS) – Membro suplente

Priscilla Efraim (DTA/FEA-UNICAMP) – Membro suplente

Ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

RESUMO

A água de coco é uma bebida isotônica natural que tem apresentado relevante e crescente demanda no mercado. A água de coco é atualmente processada por meio de processos térmicos, que, apesar de serem capazes de inativar enzimas e microrganismos, provocam efeitos deletérios nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos especialmente dos alimentos termosensíveis, que é o caso da água de coco. Desta forma, é necessário buscar novos métodos de processamento da água de coco a fim de aumentar a qualidade deste produto. O processamento por alta pressão isostática (HIP – High Isostatic Pressure) é um método de grande potencial para o caso de alimentos termosensíveis e consiste em colocar o alimento em uma câmara cuja pressão é elevada até o nível desejado por injeção de fluido ou compressão da câmara por ação de um pistão. A água de coco foi processada em um equipamento com câmara de 2 litros em diferentes condições de pressão (100-600 MPa), temperatura (25-60°C) e tempo (3-30min) para investigar o efeito da HIP nas enzimas polifenoloxidase (PPO - Polyphenoloxidase) e peroxidase (POD - Peroxydase). Também foi investigada inativação dos microrganismos *Lactobacillus fructivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* em diferentes pressões (200-500 MPa) por 2 min a 25 °C. Os resultados mostram que as três variáveis (pressão, tempo e temperatura) tem um efeito positivo na atividade relativa da POD, demonstrando que quanto maior a pressão, temperatura e tempo de processo, maior a ativação da POD. A PPO apresentou alterações de atividade imediatamente após o processamento, mas estes efeito foram reversíveis dentro de 24 horas de estocagem. Os diferentes microrganismos estudados apresentaram diferentes níveis de resistência à pressão. Contudo, não foi observado crescimento microbiano no teste de vida de prateleira com amostras processadas a 600MPa, 25°C, 3min. Além disso, o teste de análise sensorial não revelou qualquer diferença entre as amostras controle e processada, demonstrando o alto potencial da tecnologia HIP para processamento de água de coco.

ABSTRACT

Coconut water is a natural isotonic beverage which shows a relevant and growing market demand. Coconut water is currently processed by thermal processes. Although thermal processes are efficient in the inactivation of enzymes and microorganisms, they cause deleterious effects on sensory and nutritional properties of foods, especially thermal sensitive foods, which is the case of coconut water. Hence, it is necessary to search for new processing methods for coconut water in order to improve this products quality. One interesting method for food processing is high isostatic pressure processing (HIP), which consists in placing the product in a fluid-filled chamber whose pressure is elevated either by fluid injection or reduction of the chamber volume by a piston. Coconut water was processed in a 2 litter high pressure equipment in different conditions of pressure (100-600 MPa), temperature (25-60 °C) and processing time (3-30 min) in order to investigate the effect of HIP on the enzymes polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD). Also, microbiologic inactivation was tested for the microorganisms *Lactobacillus fructivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* in the pressure range of 200 to 500 MPa for 2 min at 25 °C. Results show that all three variables (pressure, time and temperature) have a positive effect on relative activity of POD, showing that the higher the pressure and temperature and the longer the time, the higher the relative activity. PPO showed activity modifications immediately after processing, but this effects were reversible within 24 hour storage. The studied microorganisms showed different pressure resistance levels. However, shelf life testing showed no microorganism growth for a 600 MPa, 25 °C, 3min processing. Also, sensory analysis results indicates no difference between control and processed samples, showing a high potential for HIP processing of coconut water.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
Capítulo 1. Revisão Bibliográfica e Objetivos.....	11
1.1	Introdução..... 12
1.2	Água de Coco: Propriedades, mercado e processamento 15
1.3	Tecnologias de Processamento Não-Térmico 20
1.4	Processamento por Alta Pressão Isostática 21
1.5	Inativação Enzimática por HIP 24
1.6	Inativação de Microrganismos por HIP 28
1.7	Objetivos..... 34
1.8	Referências Bibliográficas..... 35
Chapter 2. Effects of High Isostatic Pressure on Coconut Water Polyphenoloxidase (PPO) and Peroxidase (POD).....	42
2.1	Introduction..... 45
2.2	Materials and Methods 47
2.2.1	Coconut water samples..... 47
2.2.2	HIP equipment and processing conditions 47
2.2.3	Enzymatic activity 48
2.2.4	Statistical Analysis 50
2.3	Results and Discussion 50
2.4	Conclusions..... 66
2.5	References..... 67
Chapter 3. Effects of High Isostatic Pressure on Coconut Water Microbial Contaminants.....	68
3.1	Introduction..... 71
3.2	Materials and Methods 74
3.2.1	Coconut water samples..... 74
3.2.2	Microbiology methods 74
3.2.3	HIP equipment and processing conditions 76
3.3	Results and Discussion 77
3.4	Conclusions..... 82
3.5	References..... 83
Chapter 4. Sensory Analysis and Shelf Life Study of High Pressure Processed Coconut Water.....	89
4.1	Introduction..... 91
4.2	Materials and Methods 93
4.2.1	HIP Equipment..... 93
4.2.2	Coconut water samples and Process Conditions 93
4.2.3	Sensory analysis 94

4.2.4	Shelf Life	95
4.2.5	Physico-chemical analysis	95
4.2.6	Microbiology methods	95
4.2.7	Statistic Analysis.....	96
4.3	Results and Discussion	97
4.3.1	Sensory analysis	97
4.3.2	Shelf Life	98
4.4	Conclusion.....	103
4.5	References.....	104
<u>DISCUSSÃO GERAL</u>		<u>107</u>
<u>CONCLUSÃO GERAL</u>		<u>110</u>
Appendix		111

INTRODUÇÃO GERAL

Água de coco é a parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucífera*), excluído o endosperma, não diluído, não fermentado, não concentrado e obtido por processo tecnológico adequado. (BRASIL, 2009). Na Reunião do *Codex Alimentarius*, a água de coco foi enquadrada nos padrões para suco de fruta, sendo portanto, regularizada através dos Padrões Gerais para Sucos e Néctares de Frutas (FAO/WHO, 2005).

A água de coco verde tem apresentado um grande apelo popular para ser usada na alimentação, nutrição e saúde humana, na medicina e na biotecnologia (EMBRAPA, 2002). A demanda nacional para o consumo de água de coco é bastante significativa, tendo a comercialização do produto crescido de 94 milhões de litros/ano em 2011 para 152 milhões de litros/ano em 2014 (DATAMARK, 2015). A demanda para exportação do produto para os EUA, Comunidade Europeia e Japão também tem crescido, dado que a água de coco tem grande potencial para competir no mercado das bebidas isotônicas (ARAGÃO et al., 2001).

Tradicionalmente, a água-de-coco é comercializada dentro do próprio fruto, o que implica em dificuldades relacionadas ao transporte, armazenamento e perecibilidade do produto. Para que a comercialização da água de coco seja possível em locais afastados das regiões produtoras, é necessária a industrialização desta a fim de reduzir o volume e peso de transporte e estender sua vida de prateleira (ROSA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

O prolongamento da vida de prateleira da água de coco depende da estabilização da mesma a partir de métodos de conservação. Tais métodos devem levar em consideração a inibição da atividade enzimática e a garantia da estabilidade microbiológica da água após abertura do fruto, além de manter, o máximo possível, suas características sensoriais originais (ARAGÃO et al., 2001; ROSA et al., 2000).

Um dos processos de conservação mais amplamente utilizados é o tratamento térmico. No entanto, ao mesmo tempo em que oferece benefícios quanto ao aumento de estabilidade e vida de prateleira, o tratamento térmico pode causar alterações químicas e físicas que refletem em alterações de propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos (CAMPOS et al., 2003). No caso de sucos de frutas, o tratamento térmico tende a gerar alterações indesejadas de cor e perda de aromas e vitaminas (CHOI et al., 2005).

O processamento térmico da água de coco é particularmente problemático pelo fato de a água de coco ser um produto termosensível.

Atualmente, a tendência no consumo de alimentos está cada vez mais direcionada a produtos naturais, saudáveis e minimamente processados. No caso de suco de frutas, por exemplo, a tendência é na direção de sucos com sabor fresco e integridade de sabor e vitaminas, o mais próximo possível dos sucos feitos em casa (TEREFE, 2014; CAMPOS et al., 2003).

Considerando as alterações causadas pelo processamento térmico e a preferência do consumidor por produtos que conservem suas propriedades sensoriais e nutricionais originais (produto fresco), tecnologias de processamento não térmico tem recebido grande atenção (WEEMAES et al. (A), 1998; CAMPOS et al., 2003).

O processamento de alimentos por tecnologia de alta pressão isostática (HIP – High Isostatic Pressure) é um processo não térmico que consiste em submeter o produto a altas pressões (acima de 100 MPa) com o objetivo de inativar micro-organismos e enzimas. A vantagem do processamento a alta pressão é que, ao mesmo tempo em que é capaz de reduzir/eliminar a atividade microbiana e enzimática, preserva moléculas pequenas como vitaminas e compostos voláteis, responsáveis por sabor, aroma e valor nutricional dos alimentos (CAMPOS et al., 2003).

Tendo em vista as potencialidades do tratamento a alta pressão no processamento para inativação de microrganismos e enzimas em alimentos termosensíveis e que, até o presente momento, não foram publicados trabalhos explorando a aplicação do processamento HIP em água de coco, o objetivo deste projeto foi estudar o efeito de diferentes condições de pressão, tempo e temperatura durante o processamento a alta pressão isostática da água de coco em relação à inativação das enzimas POD e PPO e redução de contagem dos microrganismos *L. fructivorans*, *S. cerevisiae* e *Escherichia coli*. Além disso, foram investigados os efeitos sobre propriedades sensoriais do produto e sua vida de prateleira.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

A água-de-coco é uma solução isotônica natural, ácida, estéril, de baixo valor calórico e contém sais minerais, açúcares, vitaminas e proteínas em sua composição. A água de coco tem apresentado um grande apelo popular para ser usada na alimentação, nutrição e saúde humana, na medicina e na biotecnologia (EMBRAPA, 2002).

A demanda nacional para o consumo de água de coco é bastante significativa, tendo a comercialização do produto crescido de 94 milhões de litros/ano em 2011 para 152 milhões de litros/ano em 2014 (DATAMARK, 2015). A demanda para exportação do produto para os EUA, Comunidade Europeia e Japão, tem crescido, dado que a água de coco apresenta grande potencial para competir no mercado das bebidas isotônicas (ARAGÃO et al., 2001).

Tradicionalmente, a água-de-coco é comercializada dentro do próprio fruto, o que implica em dificuldades relacionadas ao transporte, armazenamento e perecibilidade do produto. Para que a comercialização da água de coco seja possível em locais afastados das regiões produtoras, é necessária a industrialização desta a fim de reduzir o volume e peso de transporte e estender sua vida de prateleira (ROSA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

O prolongamento da vida de prateleira da água de coco depende da estabilização da mesma a partir de métodos de conservação. Tais métodos devem levar em consideração a inibição da atividade enzimática e a garantia da estabilidade microbiológica da água após abertura do fruto, além de manter, o máximo possível, suas características sensoriais originais (ARAGÃO et al., 2001; ROSA et al., 2000).

Um dos processos de conservação mais amplamente utilizados é o tratamento térmico por ser capaz de aumentar a estabilidade do alimento, eliminando micro-organismos e inativando enzimas que possam catalisar reações bioquímicas indesejadas. No entanto, ao mesmo tempo em que oferece benefícios quanto ao aumento de estabilidade e vida de prateleira, o tratamento térmico pode causar alterações químicas e físicas que refletem em alterações de propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos (CAMPOS et al., 2003). No caso de sucos de frutas, o tratamento térmico tende a gerar alterações indesejadas de cor e perda de aromas e vitaminas (CHOI et al., 2005).

O processamento térmico da água de coco é particularmente problemático pelo fato de a água de coco ser um produto termosensível e do valor z (diferença de temperatura necessária para produzir uma variação de dez vezes na velocidade de destruição de referência) da degradação química (sensorial) ser menor que o z da inativação das enzimas POD e PPO. Com isso, procura-se utilizar processos que empreguem menor temperatura e maior tempo de retenção para esterilização comercial da água de coco (informação verbal)¹.

Atualmente, a tendência no consumo de alimentos está cada vez mais direcionada a produtos naturais, saudáveis e minimamente processados. No caso de suco de frutas, por exemplo, a tendência é na direção de sucos com sabor fresco e integridade de sabor e vitaminas, o mais próximo possível dos sucos feitos em casa (TEREFE, 2014; CAMPOS et al., 2003).

Considerando as alterações causadas pelo processamento térmico e a preferência do consumidor por produtos que conservem suas propriedades sensoriais e nutricionais originais (produto fresco), tecnologias de processamento não térmico tem recebido grande atenção (WEEMAES et al. (A), 1998; CAMPOS et al., 2003). Podemos citar como exemplos de métodos alternativos de conservação, o uso de radiação (MATSUI, 2006), pulso elétrico (RAMOS et al., 2006), alta pressão (RASTOGI et al., 2007) e microfiltração (CABRAL et al., 2002).

O processamento de alimentos por tecnologia de alta pressão isostática (HIP – High Isostatic Pressure) é um processo não térmico que consiste em submeter o produto a altas pressões (acima de 100 MPa) com o objetivo de inativar micro-organismos e enzimas. A vantagem do processamento a alta pressão é que, ao mesmo tempo em que é capaz de reduzir/eliminar a atividade microbiana e enzimática, preserva moléculas pequenas como vitaminas e compostos voláteis, responsáveis por sabor, aroma e valor nutricional dos alimentos (CAMPOS et al., 2003).

O processamento a alta pressão é especialmente interessante para produtos derivados de frutas (sucos, pastas e geleias) como alternativa ao tratamento térmico devido à presença de açúcares nos sucos de fruta que, durante o processamento térmico,

¹ Marcio Scucuglia – Campinas (2014)

podem caramelizar ou participar de reações de escurecimento não-enzimático (DOSUALDO, 2007).

Tendo em vista as potencialidades do tratamento a alta pressão no processamento para inativação de microrganismos e enzimas em alimentos termosensíveis e que, até o presente momento, não foram publicados trabalhos explorando a aplicação do processamento HIP em água de coco, o objetivo deste projeto foi estudar o efeito de diferentes condições de pressão, tempo e temperatura durante o processamento a alta pressão isostática da água de coco em relação à inativação das enzimas POD e PPO e redução de contagem dos microrganismos *L. fructivorans*, *S. cerevisiae* e *Escherichia coli*. Além disso, foram investigados os efeitos sobre propriedades sensoriais do produto e sua vida de prateleira.

1.2 ÁGUA DE COCO: PROPRIEDADES, MERCADO E PROCESSAMENTO

Água de coco é a parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucífera*), excluído o endosperma, não diluído, não fermentado, não concentrado e obtido por processo tecnológico adequado (BRASIL, 2009). Na Reunião do *Codex Alimentarius*, a água de coco foi enquadrada nos padrões para suco de fruta, sendo portanto, regularizada através dos Padrões Gerais para Sucos e Néctares de Frutas (FAO/WHO, 2005).

A água de coco verde tem apresentado um grande apelo popular para ser usada na alimentação, nutrição e saúde humana, na medicina e na biotecnologia (EMBRAPA, 2002). A demanda nacional para o consumo de água de coco é bastante significativa, tendo a comercialização do produto crescido de 94 milhões de litros/ano em 2011 para 152 milhões de litros/ano em 2014 (DATAMARK, 2015). A demanda para exportação do produto para os EUA, Comunidade Europeia e Japão também tem crescido, dado que a água de coco tem grande potencial para competir no mercado das bebidas isotônicas (ARAGÃO et al., 2001). No Brasil, a cultura do coqueiro é empregada quase que exclusivamente para a alimentação humana e o consumo do produto dobrou do ano 2000 a 2006. Em função dessa tendência de crescimento do mercado, grandes empresas tem investido em água de coco. A PepsiCo e a Coca-Cola, por exemplo, adquiriram, respectivamente, as empresas Amacoco e ZICO beverages, produtoras de água de coco (CARVALHO et al., 2006).

A maturação completa do coco geralmente se dá dentro de 11 a 12 meses e a água de coco começa a se formar em torno do 2º mês após a abertura natural da inflorescência, atingindo valor máximo por volta do 5º ao 7º mês, sendo este o período recomendado para a colheita (ROSA et al., 2000). Após a colheita, o fruto deve ser estocado em local fresco e seco, podendo ser consumido dentro de um período máximo de dez dias, após o qual se iniciam processos de deterioração que comprometem, principalmente, a fração líquida (ROSA et al.; ABREU et al., 2000). A Figura 1.1 ilustra as etapas de desenvolvimento do coco.

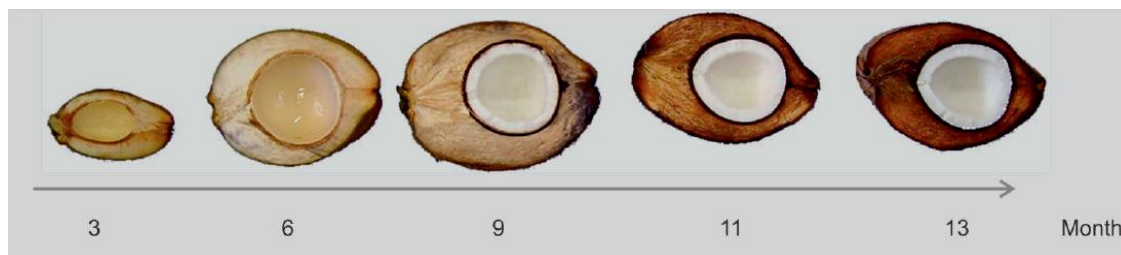


Figura 1.1 Etapas de desenvolvimento do fruto do coqueiro (Fonte: PAIN, 2012).

O coco verde com 6 a 7 meses de idade contém, por fruto, cerca de 400 mL de água, que apresenta propriedades nutritivas, tendo destaque seu alto teor de potássio.

A composição e as propriedades físico-químicas da água de coco são dependentes tanto de seu grau de maturação como de condições geográficas (clima e solo) (LUKAS, 2013). Em comparação com outros componentes da água de coco, a composição de açúcares representa a maior variação química durante a maturação.

Os níveis de açúcares e sólidos totais, bem como a acidez total, aumentam até o sexto mês de desenvolvimento e depois diminuem (MURASAKI, 2005). No início da maturação, a água de coco apresenta predominantemente açúcares redutores, com a glicose e frutose representando 40 % e 55 % do conteúdo de açúcares totais, respectivamente. Ao longo da maturação, aumenta o conteúdo de açúcares não redutores, sendo que a sacarose representa, ao fim da maturação, cerca de 40 % do conteúdo de açúcares totais (PAIN, 2012).

Além da variedade do coco e seu grau de maturação, as condições de cultivo também afetam a composição da água de coco. Como exemplo de condições de cultivo que afetam a composição da água de coco, podemos citar suplementação nitrogênio-fósforo-potássio, grau de salinidade da água de irrigação e condições climáticas (MARINHO, 2006; PAIN, 2012; SILVA, 2006; TEIXEIRA, 2005).

A Tabela 1.1 ilustra as principais propriedades físico-químicas da água de coco verde da variedade anão verde com 7 meses de idade. Sabe-se, no entanto, que os valores estão sujeitos a uma variação natural. O pH da água de coco, por exemplo, pode variar na faixa de 4,0 a 5,6 em função da maturação (MAGALHÃES et al., 2005).

Tabela 1.1 Caracterização físico-química da água-de-coco anão verde com 7 meses de idade

Sacarose (mg/100mL)	280
Glicose (mg/100mL)	2378
Frutose (mg/100mL)	2400
P (mg/100g)	7,40
Ca (mg/100g)	17,10
Na (mg/100g)	7,05
Mg (mg/100g)	4,77
Mn (mg/100g)	0,52
Fe (mg/100g)	0,04
K (mg/100g)	156,86
Acidez (%v/p)	1,11
pH	4,91
Sólidos totais (g/100g)	5,84
Total soluble solids content (°B)	5,00
Vitamina C (mg/100mL)	1,2
Proteína (mg/100g)	370
Valor calórico (Kcal/100g)	27,51

Fonte: Adaptado de ROSA et al., 2000

Tradicionalmente, a água-de-coco é comercializada dentro do próprio fruto, o que implica em dificuldades relacionadas ao transporte, armazenamento, perecibilidade e padronização do produto. Para que a comercialização da água de coco seja possível em locais afastados das regiões produtoras, é necessária a industrialização desta a fim de reduzir o volume e peso de transporte e estender sua vida de prateleira (ROSA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

A água existente no interior do fruto é estéril e se mantém assim contanto que o fruto não apresente nenhuma lesão que possibilite a entrada de microrganismos. Contudo, durante o processo de extração e envase desse líquido, podem ocorrer

contaminações microbiológicas e alterações bioquímicas, que inviabilizam sua posterior comercialização. Além disso, quando exposta ao oxigênio (ao ar), a água de coco desenvolve uma cor rosada, atribuída à presença das enzimas polifenoloxidase e peroxidases presentes, que podem causar, além de alterações sensoriais, perdas nutricionais nessa bebida (EMBRAPA, 2005).

Os cocos, após serem removidos das árvores, podem ser mantidos por até dez dias em temperatura ambiente sem haver deterioração. Depois disto, o produto se torna impróprio para consumo devido à fermentação. Porém, quando a água é retirada do fruto, ela se deteriora em apenas um dia se houver contato com a parte externa contaminada por microrganismos. Reddy et al. (2007) reportaram contaminações de até 10^6 UFC/mL em um método tradicional de extração da água.

Assim, o problema de conservação da água de coco inicia-se logo após a abertura do fruto e o prolongamento da vida de prateleira do produto depende da estabilização do mesmo a partir de métodos de conservação que levem em consideração a inibição da ação enzimática e a garantia da estabilidade microbiológica, além de manter, o máximo possível, suas características sensoriais originais (ARAGÃO et al., 2001; ROSA et al., 2000).

Há diversos métodos de conservação da água de coco. Entre as mais utilizadas destacam-se a refrigeração, congelamento, pasteurização e esterilização. Todos esses métodos envolvem uma etapa de tratamento térmico, exceto o envase direto sob refrigeração, que proporciona ao produto uma vida de prateleira curta (máximo de três dias) (EMBRAPA, 2000).

A água de coco envasada é obtida a partir de processos tecnológicos que preservam, tanto quanto possível, as características naturais da bebida. Podem ser feitas as correções dos parâmetros como teor de sólidos solúveis totais e acidez, podendo-se também usar aditivos que prolongam a vida de prateleira. Podem ser aplicados tratamentos térmicos a médias e altas temperaturas, refrigeração ou congelamento (ARAGÃO et al., 2001; ROSA et al., 2002).

A água de coco esterilizada, segundo o Regulamento Técnico do Ministério da Agricultura, é a bebida obtida da parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera*), por meio de processo tecnológico, que foi submetida a um processo adequado de esterilização “comercial” (BRASIL, 2002).

No caso da água de coco envasada refrigerada podem ser aplicados tratamentos auxiliares (formulação e pasteurização) capazes de aumentar a vida de prateleira do produto, permitindo maior flexibilidade na comercialização do produto. A aplicação de tratamentos auxiliares permite estender a vida de prateleira do produto para até seis meses, como é o caso da pasteurização, recomendada no caso da água de coco envasada refrigerada para maior segurança microbiológica (EMBRAPA, 2000).

A conservação da água de coco por congelamento ainda é bastante representativa. Assim como no caso da água de coco envasada refrigerada, é recomendada a pasteurização para reduzir os níveis de contaminação, embora seja comercializada a água de coco congelada sem prévio tratamento térmico (EMBRAPA, 2000).

A única forma de processamento empregada atualmente que permite a conservação da água de coco em temperatura ambiente é a esterilização. Na etapa de esterilização, o produto é submetido a temperaturas na faixa de 140 °C a fim de atingir esterilidade comercial. Embora o tempo de tratamento térmico nesta faixa de temperatura seja curto (poucos segundos), ocorrem efeitos deletérios sobre as características de sabor e aroma da água de coco (EMBRAPA, 2000).

Campos et al. (1996) relatam que o tratamento térmico para inativação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, na água de coco verde, só é eficiente acima de 90 °C e que a partir de 90 segundos de exposição do produto a esta temperatura ocorrem problemas sensoriais relacionados às mudanças no aroma e sabor da água de coco. Como são necessários tempos de 550 e 310 segundos a 90 °C para completa inativação da polifenoloxidase e peroxidase, respectivamente, o tratamento térmico a 90 °C possivelmente causará alterações sensoriais à água de coco.

É importante destacar que o sabor da água de coco comercializada esterilizada em temperatura ambiente é bastante diferente da água de coco verde in natura, não somente devido ao tratamento térmico, mas pelo fato de ser proveniente de cocos maduros de variedades gigantes e/ou híbridos, subproduto das atividades de exploração da amêndoa de cocos secos e não de coco verde (EMBRAPA, 2000).

Considerando, portanto, o aumento da demanda por água de coco verde, a consequente necessidade de industrialização/conservação da mesma e os efeitos negativos sobre as propriedades sensoriais da água de coco, é um tema de grande

interesse a busca por métodos de processamento não térmicos para processamento de água de coco.

1.3 TECNOLOGIAS DE PROCESSAMENTO NÃO-TÉRMICO

O prolongamento da vida de prateleira de produtos alimentícios depende da aplicação de processos de conservação tais como congelamento, desidratação ou pasteurização (MATSER et al., 2004).

Há diversos métodos de conservação atualmente aplicados à água de coco. Entre as mais utilizadas destacam-se a refrigeração, congelamento e esterilização. Todos esses métodos envolvem uma etapa de tratamento térmico (EMBRAPA, 2000).

O processamento térmico é um dos métodos mais utilizados para preservação de produtos alimentícios por ser capaz de aumentar a estabilidade destes, eliminando micro-organismos e inativando enzimas que possam catalisar reações bioquímicas indesejadas. No entanto, ao mesmo tempo em que oferece benefícios quanto ao aumento de estabilidade e vida de prateleira, o tratamento térmico pode causar alterações químicas e físicas que refletem em alterações de propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos (CAMPOS et al., 2003). No caso de sucos de fruta, por exemplo, o tratamento térmico tende a gerar alterações de cor e perda de aromas e vitaminas (CHOI et al., 2005). Entre os sucos de fruta, a água de coco é particularmente termosensível (REDDY et al., 2007; CAMPOS et al., 1996).

Considerando os efeitos indesejáveis causados pelo processamento térmico e a preferência do consumidor por produtos minimamente processados que conservem propriedades sensoriais e nutricionais originais (BIGGNON, 1997; MARTIN et al., 2002), tecnologias de processamento não térmico que apresentem impacto reduzido sobre a qualidade dos alimentos se destacam como métodos de processamento alternativos (MATSER et al., 2004; WEEMAES et al., 1998; CAMPOS et al., 2003).

Podemos citar como exemplos de métodos alternativos de conservação o uso de radiação (MATSUI, 2006), microfiltração (CABRAL et al., 20002) e pulso elétrico (RAMOS et al., 2006).

No caso específico da aplicação de métodos de processamento não térmicos em água de coco, podemos citar o estudo do uso da filtração por membrana para redução de atividade enzimática realizada por Magalhães et al. (2005) no qual foi obtida atividade relativa de 23 % para PPO e 0 % da POD após filtração em membrana de 20 kDa. Também foi estudada a aplicação do processamento não térmico DPDC (*Dense Phase Carbon Dioxide*) para água de coco e obtido um produto com propriedades sensoriais indistinguíveis do produto fresco e com vida de prateleira de nove semanas em temperatura de 4°C (DAMAR et al., 2006).

1.4 PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO ISOSTÁTICA

O processamento de alimentos por tecnologia de alta pressão isostática consiste em submeter o produto a altas pressões (acima de 100 MPa) durante poucos segundos com o objetivo de inativar microrganismos e enzimas (CAMPOS et al., 2003). A pressurização é feita em um espaço confinado onde um fluido (usualmente água) age como meio transmissor de pressão. Tal pressão é aplicada isostaticamente, permitindo que a forma original de alimentos sólidos seja mantida (MARTIN et al., 2006).

O tratamento HIP pode ser aplicado por compressão direta ou indireta. No processo de compressão direta, o volume da câmara de tratamento é reduzido pela ação de um pistão. No caso da compressão indireta, uma bomba injeta fluido na câmara de compressão, elevando a pressão até o valor desejado. Em ambos os processos de pressurização é possível o controle de temperatura (MARTIN et al., 2006).

O uso de altas pressões para processamento de alimentos foi proposto inicialmente por Hite em 1899, que demonstrou que a deterioração do leite podia ser retardada pela aplicação de alta pressão (HITE, 1899).

A primeira linha de produtos produzidos por tecnologia de alta pressão foi lançada no Japão em 1990 pela companhia *Meidi-Ya*. A linha de produtos incluía geleias de morango, kiwi e maçã (HORI et al., 1992; DUMOULIN, 1998). As geleias, já embaladas nos recipientes plásticos finais eram tratadas em uma prensa *Mitsubishi Heavy Industry (Japan)* de 50 L a 400 MPa por 20 min.

A companhia francesa Ulti em 1994 foi a pioneira européia no uso da tecnologia HIP lançando sucos cítricos pasteurizados a 400MPa em prensa de 15L produzida pela ACB Alstom.

Em 1997, a companhia americana *Fresherized Foods* (antiga *Avomex*) – hoje a maior indústria de produtos tratados por HIP em número de equipamentos e volume de produção – iniciou com uma planta no México a produção de produtos de abacate (TONELLO, 2011).

Atualmente, o método HIP já é aplicado em escala comercial para pasteurização de uma grande variedade de produtos alimentícios, como ostras, presunto, sucos e produtos a base de abacate (MATSER et al., 2004; MARTIN et al., 2002). Até 2011, eram 60 as indústrias comercializando mais de 250 produtos tratados por HIP. Desses produtos, 14% eram representados por sucos e bebidas (TONELLO 2011) – Figura 1.2.

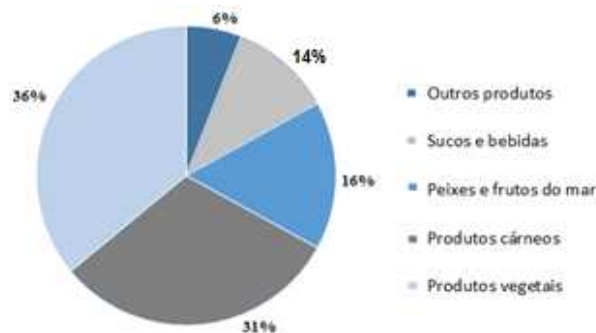


Figura 1.2 Distribuição de equipamentos industriais de alta pressão isostática em função da classe de produto processado (Fonte: Adaptado de BALA, 2008; TONELLO, 2011).

Equipamentos de alta pressão comerciais tem volumes de câmara variando de 30 até mais de 600 L e podem custar de USD\$500.000 a USD\$2,5 milhões dependendo da capacidade do equipamento e grau de automação. Desta forma, a amortização do equipamento é responsável por cerca de 60% do custo de processamento. Em 2008, o custo de produção girava em torno de USD\$0,8/kg a USD\$2,2/kg, incluindo custo e depreciação (TONELLO et al., 2011).

Avanços técnicos permitiram que o custo de investimento de um equipamento de 600 MPa fosse reduzido a um terço em 10 anos. Ainda assim, o processamento por HIP apresenta alto custo em comparação com outros métodos de processamento

disponíveis para pasteurização/esterilização. Entretanto, sua aplicação é viável para a produção de produtos de alto valor agregado e no caso de produtos que são degradados pelo processamento convencional, térmico (MARTIN et al., 2002; PURROY et al., 2011).

A elevação de pressão até 600 MPa se dá em torno de 2,5 min. Um ciclo típico (sem “*holding time*”) é de cerca de 4 min, incluindo entrada do produto, fechamento, enchimento e pressurização da câmara, despressurização e retirada do produto. Considerando um *holding time* de 3 min (resultando em um ciclo de 7 min, ou seja, 8 ciclos por hora), conclui-se que um equipamento de 55 L é capaz de processar 440 L/h e um equipamento de 420 L capaz de processar 3360 L/h. Contudo, deve-se levar em consideração que o volume de produção por hora dependerá da eficiência volumétrica, isto é, da porcentagem do volume da câmara que é possível preencher, efetivamente, dependendo principalmente das propriedades da embalagem (TANELLO et al., 2011).

A Figura 1.3 apresenta estimativas de custos de processamento para diferentes tipos de produtos alimentícios comparando equipamentos de 55 e 420L.

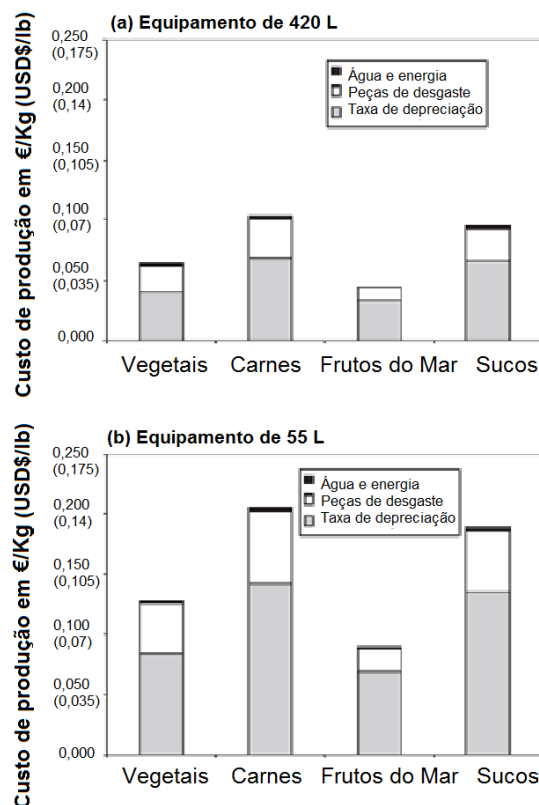


Figura 1.3 Custos de produção de diferentes tipos de produtos alimentícios em equipamentos de alta pressão de (a) 420L e (b) 55L (Fonte: Adaptado de TANELLO et al., 2011).

Diferente do tratamento térmico, o processamento por alta pressão é homogêneo, quase instantâneo e independente da geometria do produto ou equipamento, facilitando o aumento de escala laboratorial para escala de produção (TORRES et al., 2004).

Além de ser capaz de eliminar micro-organismos deterioradores e patogênicos (TORRES et al., 2004; CONSIDINE et al., 2008) e inativar enzimas (MATSER et al., 2004; CAMPOS et al., 2003), o tratamento a alta pressão isostática apresenta um baixo nível de alterações sensoriais (cor, textura e sabor) em comparação com tecnologias convencionais de processamento por aplicar temperaturas reduzidas por curtos intervalos de tempo durante o processamento (MATSER et al., 2004). Estudos de avaliação sensorial comprovaram que produtos processados por HIP frequentemente apresentam propriedades sensoriais indistinguíveis do produto original fresco (TORRES et al., 2004).

Devido à alta barorresistência apresentada por esporos bacterianos e algumas enzimas, a combinação do tratamento HIP com outras tecnologias de conservação se tornou uma tendência na área (WEEMAES et al., 1998). Exemplos de técnicas combinadas à alta pressão para inativação enzimática ou de microrganismos seriam a adição de bacteriocinas (JOFRE, 2008; GARRIGA, 2002), lactato de potássio (JOFRE et al., 2008), a alteração de pH (LOPEZ et al., 2008) e o tratamento térmico brando (ZIMMERMANN et al., 2013; TEREFE et al., 2009).

A combinação de alta pressão isostática com altas temperaturas já foi estudada para inativação de microrganismos resistentes (BARRAUD et al., 2004; ROBERTS et al., 1996) assim como para inativação de enzimas, como, por exemplo, a pectinesterase (NIENABER et al., 2001), lipoxigenase (INDRAWATI et al., 2000), poligalacturonase (FACHIN et al., 2002) e também polifenoloxidase (BUCKOW et al., 2009).

1.5 INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA POR HIP

Quando exposta ao oxigênio, a água de coco desenvolve uma cor rosada, atribuída à presença das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidases (POD) presentes,

que podem causar, além de alterações sensoriais, perdas nutricionais nessa bebida (EMBRAPA, 2005).

A polifenoloxidase (o-difenol oxigênio oxidoredutase (E.C.1.10.3.1)) pertence ao grupo das enzimas oxidoredutases e possui em seu centro ativo íons cobre que agem como cofatores capazes de catalisar duas reações distintas em presença de oxigênio: A hidroxilação de monofenóis a difenóis e a oxidação de o-difenóis a orto-quinonas. A reação de escurecimento prossegue através da oxidação não enzimática, ocorrendo, por fim, a polimerização das quinonas a pigmentos de coloração escura. Quimicamente são polímeros amorfos, insolúveis e altamente estáveis, que podem interagir com outros constituintes do meio, particularmente proteínas, formando complexos coloridos (MATSUI et al., 2006; CARVALHO et al., 2006). A PPO de água de coco apresenta peso molecular de 73,8 kDa e temperatura e pH ótimos de 25°C e 6,0, respectivamente (CAMPOS et al., 1996; MAGALHAES et al., 2005).

Devido às reações secundárias nas quais as quinonas estão envolvidas, formando cadeias poliméricas complexas, a determinação da atividade da PPO se torna um desafio. Além das moléculas poliméricas formadas por reações secundárias, outras enzimas com propriedades semelhantes à PPO também podem interferir na análise de atividade da PPO (MURASAKI, 2004).

As peroxidases (hidrogênio peróxido oxidoredutase (E.C.1.11.1.7)) são enzimas catalisadoras de reações de oxirredução que utilizam o peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons para catalisar a oxidação de compostos fenólicos (DUARTE et al., 2002). A peroxidase (POD) catalisa reações que estão associadas à deterioração de diversos nutrientes como o ácido ascórbico e também com o sabor dos alimentos (CARVALHO et al., 2006). A POD de água de coco tem peso molecular estimado de 49,2 kDa e temperatura e pH ótimos de 35°C e 5,5, respectivamente (CAMPOS et al., 1996; MAGALHAES et al., 2005).

É interessante destacar que o pH da água de coco é favorável à atividade das enzimas POD e PPO já que os pHs ótimos de atividade dessas enzimas situam-se próximos da faixa de variação de pH da água de coco (5,0 – 5,2) (CAMPOS et al., 1996).

As peroxidases são frequentemente encontradas na forma de isoenzimas nos tecidos vegetais. Murasaki (2004) estudou a cinética de inativação térmica da POD e PPO

da água de coco verde e sugere a presença de, no mínimo, duas isoenzimas de POD e PPO com diferentes termoestabilidades.

A inativação enzimática durante o processamento HIP ocorre em função de alterações nas estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, que são mantidas por interações hidrofóbicas, hidrofílicas e iônicas. As estruturas secundárias, mantidas por pontes de hidrogênio, somente são afetadas em pressões maiores do que 700 MPa. No caso de perda da estrutura secundária, a desnaturação proteica é irreversível. As estruturas primárias (ligações covalentes) praticamente não são afetadas pela aplicação de pressão (TEREFE, 2014).

As alterações nas estruturas proteicas promovidas pelo processamento a alta pressão são governadas pela lei de *Le Chatelier*, onde reações acompanhadas de redução de volume são favorecidas em condições de alta pressão.

Como a pressurização é capaz de alterar a estrutura de enzimas, o tratamento HIP pode tanto inativar quanto ativar as enzimas. Matser et al. (2000), por exemplo, descrevem aumento de atividade da polifenoloxidase em cogumelos mediante tratamento a 600 MPa. O aumento da atividade da PPO em função do tratamento HIP também já foi descrito para maçã e cenoura a pressões intermediárias (300 a 500 MPa) (ANESE et al., 1999).

Embora possa ocorrer a ativação enzimática em decorrência do processamento a alta pressão isostática, a inativação enzimática é muito mais recorrente. O estudo da inativação de PPOs por meio do tratamento a alta pressão já foi realizado para diversas frutas. PPOs de maçã, uva, abacate e pera, por exemplo, apresentaram redução de atividade, em temperatura ambiente, a partir de 600, 700, 800 e 900 MPa, respectivamente (WEEMAES et al., 1998 - A). Palazon et al. (2004) estudaram a inativação de PPO de morango, conseguindo inativação da enzima por tratamento a 400 MPa por 15 min a temperaturas na faixa de 18-22°C. Para o purê de tomate, um processamento a 200 MPa e 20 °C por 15 min levou à redução de 10% na atividade da PPO (CANO et al., 1998).

PPOs de diferentes origens vegetais apresentam diferentes níveis de resistência à pressão após o tratamento HIP (BUCKOW et al., 2009; PALOU et al., 1999). No entanto, as PPOs tendem a apresentar alta barorresistência: Palou et al. (2000) observaram uma atividade relativa de 70% em PPO de banana utilizando pressão de 689

MPa por 10 min a 21°C. Palazon et al. obtiveram uma atividade relativa de 70% para PPO de framboesa mediante tratamento a temperatura ambiente de 800 MPa por 15 min. Para o caso da batata, Gomes et al. (1996) descreveram uma atividade relativa de 40% da PPO após tratamento a 800 MPa por 10 min a temperatura ambiente.

A aplicação do processamento HIP já foi bastante estudada também para as POD, tendo em vista, assim como no caso das PPO, a redução de escurecimento enzimático em frutas e produtos de frutas. Cano et al. ainda em 1998, modelaram o comportamento da interação de pressão (50-400 MPa) e temperatura (20-60°C) em purê de morango e suco de laranja, buscando determinar condições ótimas de processamento. Observou-se redução da atividade da POD em purê de morango em processos até 300 MPa (20°C, 15 min). No entanto, o processamento em pressões maiores que 300 MPa promoveu um ligeiro aumento de atividade da POD nas condições já citadas de temperatura e tempo. Ainda em relação à POD de purê de morango, notou-se que o aumento de temperatura até 45°C e de pressão até 280 MPa levam à redução da atividade da enzima. Em temperaturas abaixo de 45°C, porém, foram obtidas taxas de inativação menores para as mesmas pressões. O processamento utilizando 230 MPa e 43°C resultou na maior inativação encontrada dentre das condições testadas (CANO et al., 1998).

No caso da POD em suco de laranja, observou-se redução da atividade quando aplicadas pressões até 400 MPa (temperatura ambiente por 15 min). Nessas condições, obteve-se redução de 25% da atividade inicial. Quanto à combinação de pressão e temperatura, observou-se que a inativação enzimática até 400 MPa foi potencializada pela temperatura (32°C). No entanto, temperaturas de 32 a 60°C causaram redução da inativação (efeito antagônico) (CANO et al., 1998).

Palazon et al. (2004) também estudaram a inativação da peroxidase de morangos utilizando diferentes condições de pressão (400, 600 e 800 MPa) e tempo (0, 5, 10 e 15 min). Seus resultados mostram que nem sempre o aumento de temperatura ou tempo de processo levam a uma maior inativação. Da mesma forma, Anese et al. (1994), estudando a inativação da POD de cenouras por alta pressão em diferentes condições de pressão e pH, demonstraram que não há proporcionalidade entre intensidade da pressão aplicada e a inativação enzimática, além de haver influência do pH nas taxas de inativação obtidas para uma mesma pressão.

Para o caso de enzimas barorresistentes, assim como para o caso de microrganismos, é interessante combinar o tratamento a alta pressão com outros métodos de inativação, como, por exemplo, tratamentos térmicos brandos (WEEMAES et al., 1998(C)) A combinação de pressão e temperatura já foi utilizada para a inativação de polifenoloxidasas de diversas origens vegetais. Buckow et al. (2009), por exemplo, estudaram a cinética de inativação de PPOs de maçã em diversas condições de pressão (0,1-700 MPa) e temperatura (20-80°C). Terefe et al. (2009) também combinam tratamentos térmicos brandos (20 – 60°C) com o uso de alta pressão isostática (300 – 600 MPa), modelando o comportamento da PPO de morango em tais condições a fim de obter condições para redução da atividade da PPO em morango sem levar a perdas sensoriais e nutricionais.

Além das PPOs, o tratamento HIP, em conjunto com um tratamento térmico brando (até 60°C) é capaz de inativar outras enzimas indesejáveis em alimentos como, por exemplo, pectinesterases (NIENABER et al., 2001), lipoxigenases (INDRAWATI et al., 2000) e poligalacturonases (FACHIN, 2002).

Conforme mostrado por Anese e colaboradores (1995), pode haver variação da atividade relative de polifenoloxidase e peroxidase de maçãs e cenouras, respectivamente, após processamento HIP, podendo ser observada maior ou menor atividade do que a observada logo após o processamento. Este mesmo efeito de alteração da atividade relative enzimática durante o armazenamento também foi observado por Gibriel et al. (1997) no caso de tratamento térmico de peroxidases de cenoura, espinafre e damasco.

1.6 INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR HIP

A aplicação de pressões elevadas em células microbianas é capaz de causar diversas alterações estruturais e fisiológicas tais como inibição de enzimas e da síntese proteica, alteração da estrutura da parede e membrana celular (CONSIDINE et al., 2008), compressão dos vacúolos gasosos, separação da membrana e parede celulares (PATTERSON, 2005) e dissociação das subunidades ribossomais (ABE, 2007). Os danos

à membrana celular alteram sua permeabilidade, causando alterações do pH (MATSER et al., 2004) e vazamento de material intracelular (CONSIDINE et al., 2008).

O efeito do processamento a alta pressão sobre micro-organismos é dependente de propriedades tanto do meio quanto dos próprios micro-organismos:

Coloração-gram: Em geral, as bactérias gram-positivas são mais resistentes à pressão do que bactérias gram-negativas (SMELT, 1998). Tal fato se deve à maior rigidez da parede celular das bactérias gram-positivas (CAMPOS et al., 2003).

Fase de crescimento: Bactérias nas fases de crescimento estacionária e lag apresentam maior resistência a pressão do que bactérias em fase log (CONSIDINE et al., 2008; CAMPOS et al., 2003).

Composição do meio: Os substratos disponíveis no meio podem ter grandes efeitos sobre a resposta dos micro-organismos ao tratamento por alta pressão. Meios mais ricos proporcionam maior proteção por serem capazes de fornecer vitaminas essenciais e aminoácidos (BLACK et al., 2007).

Forma esporulada: Bactérias na forma vegetativa apresentam maior sensibilidade à pressão do que na forma esporulada, podendo resistir a tratamentos de até 1000 MPa (CAMPOS et al., 2003). Sabe-se que a germinação de esporos pode ser induzida por aumentos em temperatura (BLACK et al., 2005) ou tratamentos a pressões brandas (200-400 MPa) (WEEMAES et al., 1998 (C); SMELT et al., 1998), reduzindo sua resistência à pressão e temperatura em tratamentos subsequentes.

pH: Baixos pHs tendem a aumentar a sensibilidade de patógenos ao tratamento por alta pressão (ALPAS et al., 2000). Sabe-se que o pH de uma solução ácida decresce em função do aumento de pressão. Assim, quando a pressão é liberada, ocorre a reversão para o pH original. O papel da reversão do pH na morte dos micro-organismos durante o tratamento por alta pressão ainda não está definido (CONSIDINE et al., 2008).

Atividade de água (a_w): quase sempre, baixas atividades de água (a_w) proporcionam às células um efeito protetor contra a pressão. Porém, microrganismos injuriados pela pressão são geralmente mais sensíveis em baixas atividades de água (CAMPOS et al., 2003).

Temperatura: A temperatura empregada durante o HIP tem grande impacto na eficácia do método para eliminação de micro-organismos (HOGAN et al., 2005). Uma maior inativação é observada quando são usadas temperaturas diferentes da temperatura ambiente (mais altas ou mais baixas) (CONSIDINE et al., 2008).

Apesar das variações de resistência dependentes de condições celulares e do meio, é possível determinar faixas de pressão capazes de eliminar classes distintas de micro-organismos. Pressões entre 200 e 300 MPa são capazes de eliminar formas vegetativas de eucariotos, como leveduras e fungos. Para eliminação de células bacterianas vegetativas, são necessárias pressões na faixa de 300 a 600 MPa. A maioria dos esporos de leveduras e fungos são facilmente inativados por pressões de 400 MPa. Contudo, no caso de esporos bacterianos podem ser necessárias pressões maiores que 1000 MPa para inativação (SMELT, 1998). A Tabela 1.2 ilustra os diferentes perfis de resistência à alta pressão isostática apresentada por alguns microrganismos de interesse em alimentos.

Tabela 1.2 Barorresistência de diferentes microrganismos de interesse em alimentos

Microrganismo	Pressão (MPa)	D (min)	T (°C)	Substrato	Referência
<i>Clostridium pasteurianum</i>	700	2,4	60 °C	n.i.	Maggi et al., 1995
<i>Clostridium pasteurianum</i>	800	3,4	60 °C	n.i.	Maggi et al., 1995
<i>Citrobacter freundii</i>	230	14,7	20 °C	n.i.	Charles et al., 1992a
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	414	2,17	25 °C	n.i.	Ananth et al., 1998
<i>Salmonella senftenberg</i>	414	1,48	2 °C	n.i.	Ananth et al., 1998
<i>Listeria innocua</i> ²	400	3,12	2 °C	n.i.	Gervilla et al., 1997
<i>Listeria innocua</i> ²	400	4	25 °C	n.i.	Gervilla et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> ³	200	211,8	20 °C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> ³	250	15	20 °C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> ³	300	3,7	20 °C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Staphylococcus aureus</i> ³	350	2,6	20 °C	n.i.	Erkmen et al., 1997
<i>Listeria innocua</i>	400	7,35	2 °C	n.i.	Ponce et al., 1998
<i>Listeria innocua</i>	400	8,23	20 °C	n.i.	Ponce et al., 1998
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	150	84,4	4 °C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	250	46,0	4 °C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	300	26,6	4 °C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	350	13,9	4 °C	leite cru	Mussa et al., 1999
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	500	0,02*	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	350	0,64*	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ⁴	500	0,07**	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ⁴	350	1,27**	n.i.	suco de laranja	Parish, 1998a

¹ Scott A
² 910 CECT
³ ATCC 27690
⁴ ascósporos
* z = 106 MPa
** z = 123 MPa
n.i.: não informado
^a apud Tewari et al., 1999

Fonte: DOSUALDO, 2007

Diversos trabalhos já foram realizados com a aplicação de alta pressão em sucos para redução da carga microbiana. Bull e colaboradores (2004) estudaram a aplicação de alta pressão em suco de laranja, obtendo redução da carga microbiana (bactérias aeróbias, fungos e leveduras) a níveis não detectáveis processando o suco a 600 MPa a 20 °C por 1 min. Já Bayindirli et al. (2004), estudaram a eliminação de microrganismos patogênicos (*S. aureus*, *E. coli* O157:H7 e *S. enteritidis* FDA) em sucos de maçã, laranja, damasco e amarela, obtendo redução da contagem a níveis não detectáveis em todos os sucos utilizando as condições de pressão de 350 MPa e temperatura de 40 °C durante 5 min de processamento.

Zimmermann et al. (2013) exploraram a combinação do processamento HIP com tratamentos térmicos brandos buscando modelar a inativação do microrganismo *B. coagulans*. Em seu trabalho, os autores utilizaram pressões entre 300 e 600 MPa e temperaturas de 50 a 60°C. Processos de 300 MPa combinados com temperaturas de 50 e 60°C apresentaram reduções de 2 e 2,4 ciclos logarítmicos, respectivamente após 15

min de tratamento. Para processos de 600 MPa e 50 ou 60°C, também por 15 min, foram obtidas reduções logarítmicas de 3,1 e 5,7, respectivamente.

Como a água existente no interior do coco é estéril, sua contaminação ocorre após abertura do fruto, pelo contato com ambiente, equipamentos e manipuladores. Por isso, os principais microrganismos contaminantes da água de coco são bolores, leveduras e bactérias presentes no ambiente de produção (DOSUALDO, 2007). É importante ressaltar que, uma vez contaminada, a água de coco é rapidamente degradada, não só por conter pH, osmolaridade e teor de açúcares adequados, mas também por conter substâncias que promovem o crescimento e divisão celular, como por exemplo mio-inositol e diversas citocininas, uma grande classe de fitormônios (PAIN 2012).

Entre as leveduras mais frequentemente associadas à degradação de sucos de fruta está a *Saccharomyces cerevisiae* (BELTRAN et al., 2005) Além deste microrganismo, bactérias do gênero *Lactobacillus* são encontradas frequentemente como contaminantes de diversos produtos alimentícios e em produtos derivados de frutas, em especial.

Dada a importância da *S. cerevisiae* como contaminante em sucos e outros produtos de frutas, diversos estudos investigam a eliminação deste contaminante por alta pressão isostática. Basak et al. (2002) estudaram a redução da contagem de *S. cerevisiae* em suco de laranja natural e concentrado, observando maiores taxas de Inativação para o suco natural do que para o concentrado (confirmando a importância do meio na barorresistência de microrganismos) e apresentando a cinética de inativação desse microrganismo em pressões variando de 100 a 400 MPa. O autor obteve redução de 3 ciclos logarítmicos na contagem de *S. cerevisiae* com tratamento a 250 MPa por 20 min em temperatura de 20 °C.

Da mesma forma que as leveduras (em específico a *S. cerevisiae*), a inativação de *Lactobacillus* por alta pressão isostática também tem sido bastante estudada. Ulmer et al. (2000) investigaram a ocorrência de injúrias sub-letais, atividade metabólica e contagem do microrganismo *L. plantarum* TMW1.460 em cerveja mediante processamento a alta pressão isostática (200 – 600 MPa). A 600 MPa, apenas o tempo de pressurização (rampa de pressurização) já foi suficiente para levar a contagem inicial (10^2 UFC/mL) a níveis abaixo do detectável.

Como diferentes matrizes podem proporcionar aos microrganismos maior ou menor proteção ao tratamento a alta pressão isostática, é importante investigar a inativação dos microrganismos na matriz de interesse. O único estudo publicado até o momento sobre a inativação de microrganismos em água de coco foi feito por Lukas et al. (2013). Neste trabalho, foi estudada a inativação de três microrganismos patogênicos em água de coco (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*) após tratamentos de 400, 500 e 600MPa por 120s e temperatura inicial de 4°C. Lukas et al. observaram que nas condições de 500 e 600 MPa obtém-se 6 ciclos de redução logarítmica dos 3 microrganismos, mas a 400MPa atinge-se 4 ciclos de redução para *E. coli* e *S. typhimurium* e 3 ciclos para *L. monocytogenes*.

1.7 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi estudar o efeito do processamento de água de coco verde sob alta pressão isostática em diferentes condições de pressão, tempo e temperatura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enzimas: Avaliar o efeito do processamento a alta pressão isostática sobre a atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) por meio da construção de superfícies de resposta. O modelo experimental foi construído utilizando pressões de 100 a 600 MPa, tempos de 3 a 30 min e temperaturas de 25 a 60 °C.
- Microrganismos: Avaliar a inativação dos microrganismos *Lactobacillus fructivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* durante o processamento a alta pressão isostática mediante diferentes condições de pressão (200-600 MPa) por 2 min a 25 °C.
- Vida de prateleira: Estudar a vida de prateleira por avaliação de pH, acidez, teor de sólidos totais, contagem de coliformes termorresistentes, bolores e leveduras e contagem total de mesófilos aeróbios, a cada 15 dias por 3 meses.
- Análise sensorial: Avaliar, por meio de teste afetivo, as diferenças significativas (em relação aos parâmetros dulçor, acidez e aspecto global) e qual o grau destas diferenças entre as amostras fresca e processada a alta pressão.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. (2007) Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. **Biosci Biotechnol Biochem** 71: 700151–7001511.
- ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; RAY, B. (2000) Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure sensitive strains of food-borne pathogens. **Int J Food Microbiol** 60: 33–42.
- ANESE, M.; NICOLI, M.C.; AGLIO, G.D.; LERICI, C. R. - Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities - **Journal of Food Biochemistry** 18 (1995) 285-293
- ARAGAO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M. de O. Água-de-coco. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2001. 32p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 24)
- AUGUSTO, P.E.D.; TRIBST, A.A.L.; CRISTIANINI, M. Thermal Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a model liquid food - **Journal of Food Process Engineering**, v.34, p. 1013-1027 (2009)
- BALASUBRAMANIAM, V.M. (BALA); FARKAS, D.; TUREK, E. J. – Preserving Food Through High Pressure Processing – Food Technology 62.11 (2008): 32-38. – Disponível em: <http://www.promatecfoodventures.com/doc/FoodTechnology_1108feat_preservingfoods.pdf>
- BARRAUD, C.C.; GAUBERT, A.; MASSON, P.; VIDAL, D. – Combined Effects of High Hydrostatic Pressure and Temperature for Inactivation of *Bacillus anthracis* Spores - **Applied and Environmental Microbiology**, Jan. 2004, p. 635–637
- BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S.; PIETTE, J.P.G. - High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice - **Innovative Food Science & Emerging Technologies** 3, p.233-231 (2002)
- BAYINDIRLI, A.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F.; HIZAL, M. - Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices - **Food Control** 17 (2006) 52–58
- BELTRÁN, J.G.; CÁNOVAS, G.V.B. - Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in Apple Juice by Ultraviolet Light - **Journal of Food Process Engineering** 28 (2005) 437–452
- BIGNON, J. Cold Pasteurizes Hiperbar for the Stabilization of Fresh Fruit Juices. **Fruit Processing**, v.6, n.2, p. 46-48, 1997
- BLACK, E.P.; KOZIOL-DUBE, K.; GUAN, D.; WEI, J.; SETLOW, B.; CORTEZZO, D.E.; HOOVER, D.G.; SETLOW, P. (2005) Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via

activation of nutrient receptors by high pressure. **Appl Environ Microbiol** 71: 5879–5887.

BRASIL. **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. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm >. Acesso em: 05. abr.2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BUCKOW, R.; WEISS, U.; KNORR, D - Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains - **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 10 (2009) 441–448

BULL, M. K.; ZERDIN, K. Z.; HOWE, E.; GOICOECHEA, D.; PARAMANANDHAN, P.; STOCKMAN, R.; SELLAHEWA, J.; SZABO, E. A.; JOHNSON, R. L.; STEWART, C.M. - The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 5 (2004) 135–149

CABRAL, L. M. C. Estabilização da água de coco verde por meio de filtração com membranas. - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Comunicado técnico 47** - ISSN 0103-5231 (2002). Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/estabilizacaodeaguadecoco_000fdsu6jvd02wx5eo0a2ndxyfl0r8fv.pdf

CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inactivation on Flavour Quality of Green Coconut water - **Journal of Food Processing and Preservation** v.20, n.26, p. 487-500, 1996

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L; CRISTIANINI, M. The use of High Pressure Teechnology in Food Processing - **Brazilian Journal of Food Technology** v.6, n.2, p. 351-357, 2003

CANO, M.P.; HERNÁNDEZ, A. - High-Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Tomato Puree - **J. Agric. Food Chem.** 1998, 46, 266-270

CANOVAS, B.G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. - **Nonthermal Preservation of Foods**. 1.ed. New York: Marcel Decker, 1997. 276p.

CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; JUNIOR, G.A.M. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento - **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina v.27, n.3, p. 437-452 (2006)

CHOI, L. H., & NIELSEN, S. S. (2005). The effect of thermal and non-thermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability - **Journal of Food Quality**, v. 28, p. 13-29

CONSIDINE, K.M.; KELLY, A.L.; FITZGERLD, G.F.; HILL, C.; SLEATOR, R.D. High pressure processing: Effects on Microbial Food Safety and Food Quality – **FEMS Microbiol Lett**, v. 281, p. 1-9 (2008)

DAMAR, S. (Tese de Doutorado) **Processing of Coconut Water with High Pressure Carbon Dioxide Technology** – University of Florida (2006)

DATAMARK - Supplier of corporate information on Brazil
(<http://www.datamark.com.br/>)

DOSUALDO, G.L. **Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na Redução da Carga Microbiana e da Atividade Enzimática da Água de Coco**, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2007

DUARTE, A.C.P.; COELHO, M.A.Z.; LEITE, S. G. F. Identification on Peroxidase and Tyrosinase in Green Coconut Water – **Cienc. Tecnol. Alim.**, v. 3, n.5, p. 266-270 (2002)

DUMOULIN, M. 1998. Evolution des produits hautes pressions au Japon. **Industries Alimentaires et Agricoles**. Septembre:3-8.

EMBRAPA – Informação tecnológica (Coleção Agroindústria Familiar) , 2005 – Disponível em:
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11868/2/00076150.pdf>

EMBRAPA, 2002 Coco: Pós-colheita / editor técnico Wilson Menezes Aragão; Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, SE). — Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 76p.; il.; (Frutas do Brasil; 29). Inclui bibliografia. ISBN 85-7383-146-4
http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00070000.pdf

FACHIN, D.; VAN LOEY, A.; INDRAWATI; LUDIKHUYZE, L.; HENDRICKX, M. - Thermal and High-Pressure Inactivation of Tomato Polygalacturonase: A Kinetic Study - **JOURNAL OF FOOD SCIENCE** Vol. 67, Nr. 5, 2002

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) – CODEX STAN 247-2005 – General Standard for Fruit Juices and Nectars – Disponível em:
<http://www.justice.gov.md/file/Centrul%20de%20armonizare%20a%20legislatiei/Baza%20de%20date/Materiale%202010/Legislatie/Codex%20Stan%20247-2005.pdf>

GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; COSTA, S.; MONFORT, J.M.; HUGAS, M - Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage – **Food Microbiology**, 2002, 19,509-518

GIBRIEL, A.Y.; EL-SHRIGI, A.F.; KANDIL, S.H.; EL-MANSY, H.A. - Effect of pH, Sodium Chloride and Sucrose on Heat-inactivation and Reactivation of Peroxidases in Certain Foods – **f. Sci. Fd Agric.** 29, 261-266 (1978)

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; BROECK, I.V.D; WEEMAES, C. Effects of High Pressure on Enzymes Related to Food Quality – **Trends in Science & Technology**, v.9, p.193-203 (1998)

HERNANDO S'AIZ, A., T'ARRAGO MINGO, S., PURROY BALDA, F., TONELLO SAMSON, C. 2008. Advances in design for successful commercialization of high pressure processing. **Food Australia** 60(4):154–156.

HITE, B.H. (1899) The Effect of Pressure in the Preservation of Milk - **West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin** 58, 15±35

HOGAN, E.; KELLY A. L.; SUN, D. W. (2005) High pressure Processing of foods: an overview. **Emerging Technologies for Food Processing** (Sun Da Wen, ed), pp. 3–31. Academic Press.

HORI, K., MATANABE, Y., KANEKO, M., SEKIMOTO, T., SUGIMOTO, Y., YAMANE, T. 1992. The development of high pressure processor for food industries. In: **High Pressure and Biotechnology**, edited by Claude, B., Rikimaru, H., Karel, H., and Patrick, M. Colloque INSERM, Paris: John Libbey Eurotext Ltd., pp. 499–507.

INDRAWATI, I.; LINDA R. L.; LOEY A. M.; HENDRICKX M. E. Lipoxygenase Inactivation in Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Due to High Pressure Treatment at Subzero and Elevated Temperatures - **J. Agric. Food Chem.**, V. 48, p. 1850–1859 (2000)

JOFRE, A.; AYMERICH, T; GARRIGA, M. - Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham - **Food Control** 19 (2008) 634–638

LUKAS, A. R. (2013). **Use of High Pressure Processing to Reduce Foodborne Pathogens in Coconut Water**. Tese apresentada para a obtenção do título de mestre em ciência e tecnologia de alimentos do Instituto Politécnico e Universidade Estadual de Virginia.

MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. - Conservação de Água de Coco Verde por Filtração com Membrana - **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(1): 72-77, jan.-mar. 2005

MARINHO, F.J.L.; GHEYI, H.R.; FERNANDES, P.D.; HOLANDA J.S.; FERREIRA NETO, M., Cultivo de coco 'Anão Verde' irrigado com águas salinas, *Pesqui. Agropecu. Bras.* 41 (2006) 1277–1284.

MARTÍN, M. F.S.; CÁNOVAS, G. V. B.; SWANSON, B. G. (2002): Food Processing by High Hydrostatic

MATSER, A.M.; KREBBERS, B.; BERG, R.W.V.D; BARTELS, P.V. Advantages of High Pressure Sterilization on Quality of Food Products - **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 79-85 (2004)

MATSUI, K. N. (A) **Inativação das Enzimas Presentes na Água de Coco Verde (*Cocos nucifera* L.) por Processo Térmico Através de Microondas**, Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade de São Paulo - São Paulo , 2006

MATSUI, K.N.; GRANADO, L.M.; OLIVEIRA, P.V., TADINI, C.C. (B) Peroxidase and Polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions - **LWT** v.40 p. 852-859, 2007

MURASAKI, N. C. (Dissertação de Mestrado) **Cinética de Inativação Térmica da Peroxidase e da Polifenoloxidase Presentes na Água de Coco Verde por Processo Térmico Contínuo** – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (2005)

NIENABER, U.; SHELLHAMMER, T.H. - High-Pressure Processing of Orange Juice: Combination Treatments and a Shelf Life Study - **JOURNAL OF FOOD SCIENCE**—Vol. 66, No. 2, 2001

NOGUEIRA, A.L.C.; SOUZ, G.C.; ALVES, O.M.; DOMINGOS, M.S.C.; MARQUES, L.F.; COSTA, T.L.; PAIXÃO, F.J.R. Avaliação Sensorial de Água de Coco (*Cocos nucifera* L) *in natura* e processada - **Revista de Biologia e Ciências da Terra** v.4, n.2, 2º semestre, 2004

OLIVEIRA, H. J. S.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; CARDOSO, M. G.; TEIXEIRA, J. E. C.; GUIMARÃES, N. C. C. Carbohydrate measurements on four brands of coconut water. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.27, n.5, p.1063- 1067, 2003.

PAIN, J. P., DIOP, N., DORNIER, M., & PRADES, A. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, 2012, vol. 67, p. 87–107.

PALAZON, A.G.; SUTHANTHANGJAI, W.; KAJDA, P.; ZABETAKIS, I. - The effects of high hydrostatic pressure on b-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*) - **Food Chemistry** 88 (2004) 7–10

PALOU, E.; SALGADO, C.H.; MALO, A.L.; CANOVAS, G.V.B.; SWANSON, B.G.; CHANES, J.W. - High pressure-processed guacamole - **Innovative Food Science & Emerging Technologies** 1 (2000). 69 -75

PARISH, M.E. High Pressure Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, 18(1):57-65,1998.

PATTERSON MF (2005) A review: microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology** 98: 1400–1409.

PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extracts - **Archives of biochemistry**, v.19, p. 47-63 (1948)

Pressure, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42:6, 627-645

PURROY, B. F.; TONELLO, C.; PEREGRINA, R.; de CELIS, C. Industrial High Pressure Processing of Avocado Products: Emerging Trends and Implementation in New Markets. In: World Avocado Congress, VII, 2011, Cairns – Disponível em <http://www.congresomundialdelaguacate2011.com/userfiles/file/Congress%20Proceedings v3.pdf>

RAMOS, A. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; STRINGHETA P. C.; CHAVES J. B. P.; GOMES, J. C. Aplicação de Campos Elétricos Pulsados de Alta Intensidade na Conservação de Alimentos – *Ceres*, v. 53, p. 425-438 (2006)

RANASINGHE, C. S; WIMALASEKARA, R.; JAYASEKARA, C. (1999) Effect of Storage Temperature and Wrapping Treatments on the Keeping Quality of Tender King Coconut. *Cocos* 13: 16-22

RASTOGI, N. K; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D - Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods - **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47:69–112 (2007)

REDDY, K.V.; DAS, M.; DAS, S.K. - Nonthermal Sterilization of Green Coconut Water for Packaging - **Journal of Food Quality** 30 (2007) 466–480

ROBERTS, C.M.; HOOVER, D.G. - Sensitivity of Bacillus Coagulans Spores to Combinations of High Hydrostatic Pressure, Heat, Acidity and Nisin - **Journal of Applied Bacteriology** 1996, 81, 363-368

ROSA, M.F.; ABREU, F.A.P. Água de coco: métodos de conservação. Fortaleza: **Embrapa CNPAT/SEBRAE-CE**, 2000. 40p. (Documentos 37)

SILVA R.A., CAVALCANTE L.F., HOLANDA J.S., PEREIRA W.E., MOURA M.F., FERREIRA NETO M., Fruits quality of green dwarf coconut fertirrigation with nitrogen and potassium, *Rev. Bras. Frutic.* 28 (2006) 310–313

SMELT, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends Food Science and Technology** 9: 152–158.

TEIXEIRA L.A.J., BATAGLIA O.C., BUZETTI S., FURLANI JR. E., DOS SANTOS ISEPON J., NPK fertilization on Dwarf Green coconut (*Cocos nucifera* L.) – Yield and fruit quality, *Rev. Bras. Frutic.* 27 (2005) 120–123.

TEREFE, N.S.; MATTHIES, K.; SIMONS, L.; VERSTEEG, C. - Combined high pressure-mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria × ananassa*) - **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 10 (2009) 297–307

TONELLO, C. (2011). Case Studies on High-Pressure Processing of Foods. **Nonthermal Processing Technologies for Food**.

TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial Opportunities and Research Challenges in the High Pressure Processing of Foods - **Journal of Food Engineering**, v.67, p. 95-112 (2005)

ULMER, H.M.; GANZLE, M.G.; VOGEL, R.F. Effects of High Pressure on Survival and Metabolic Activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460 - **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, N°9 p. 3966–3973 (2000)

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.; BROECK, I.V.D.; HENDRICKX, M. (A) High pressure Inactivation of Polyphenoloxidases - **Journal of Food Science** v.63, n.5, 1998

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.R.; BROECK, I.V.; HENDRICKX, M.E. (B) Effect of pH on Pressure and Thermal Inactivation of Avocado Polyphenoloxidase: A Kinetic Study - **J. Agric. Food Chem.** 1998, 46, 2785-2792

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.R.; BROECK, I.V.; HENDRICKX, M.E. (C) Kinetics of Combined Pressure-Temperature Inactivation of Avocado Polyphenoloxidase - **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 60, No. 3, November 5, 1998

ZIMMERMANN, M.; SCHAFFNER, D. W.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature - **LWT - Food Science and Technology** (2013) 1-6

CHAPTER 2

Effects of High Isostatic Pressure on Coconut Water Polyphenoloxidase (PPO) and Peroxidase (POD)

Authors: Elisa Barison Gragnani^a, Marcelo Cristianini^{a*}

Affiliations:

a Department of Food Technology (DTA), School of Food Engineering (FEA), University of Campinas (UNICAMP), Monteiro Lobato, 80. PO Box 6121, 13083–862, Campinas, S.P. Brazil.

*Author for Correspondence. Address Monteiro Lobato, 80, School of Food Engineering, University of Campinas, Postal code: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil, Phone: +55 19 3521-7592; fax +55 19 3521-4008

E-mail: olecram@unicamp.br

Article to be submitted to the *Innovative Food Science and Emerging Technologies*

ABSTRACT

Coconut water is a juice whose demand has been growing quickly for being naturally isotonic. Current processing of coconut water involves thermal processes, which are effective in the inactivation of enzymes and microorganisms. However, thermal process also causes deleterious effects on sensory and nutritional properties of foods, especially thermal sensitive foods, which is the case of coconut water. Therefore, investigating the application of non-thermal methods of processing is interesting in the case of coconut water, in order to improve this products quality. High isostatic pressure processing (HIP) is a non-thermic processing method which consists in pressurizing the product in a chamber filled with fluid. Pressure may be elevated by fluid injection or reduction of the chamber volume by a piston. Coconut water was processed in a 2 litter high pressure equipment in different conditions of pressure (100-600MPa), temperature (25-60°C) and processing time (3-30min). Response surface methodology was used to determine the effects of these parameters on relative activity of the enzymes polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD), which are of great technologic relevance. Results show that all three variables (pressure, time and temperature) have a positive effect on relative activity of POD in the studied range, showing that the higher the pressure and temperature and the longer the time, the higher the relative activity. PPO showed activity modifications after the HIP processing which were reversible within 24 hours storage. The conditions of higher predicted activation of PPO and POD were, respectively, P=600MPa, T=28°C, t=30 min and P=600, T=60°C, t=30min, with relative activity of 120% for PPO and 208.7% for POD.

Keywords: Coconut water; High pressure; Enzymes

RESUMO

A água de coco é uma bebida isotônica natural que tem apresentado relevante e crescente demanda no mercado. A água de coco é atualmente processada por meio de processos térmicos, que, apesar de serem capazes de inativar enzimas e microrganismos, provocam efeitos deletérios nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos especialmente dos alimentos termosensíveis – que é o caso da água de coco. Desta forma, é necessário buscar novos métodos de processamento da água de coco a fim de aumentar a qualidade deste produto. O processamento por alta pressão isostática (HIP) é um método de grande potencial para o caso de alimentos termosensíveis e consiste em colocar o alimento em uma câmara cuja pressão é elevada até o nível desejado por injeção de fluido ou compressão da câmara por ação de um pistão. A água de coco foi processada em um equipamento com câmara de 2 litros em diferentes condições de pressão (100-600 MPa), temperatura (25-60°C) e tempo (3-30min). A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar o efeito dos parâmetros pressão, temperatura e tempo na atividade relativa das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), que são de grande importância tecnológica. Os resultados mostram que as três variáveis (pressão, tempo e temperatura) tem um efeito positivo na atividade relativa da POD na região estudada, demonstrando que quanto maior a pressão, temperatura e tempo de processo, maior a ativação da POD. A PPO apresentou alterações de atividade em função do processamento a alta pressão que foram reversíveis após 24 horas de estocagem. As condições de maior ativação da PPO e POD foram, respectivamente, P=600MPa, T=28°C, t=30 min e P=600, T=60°C, t=30min, com atividades residuais de 120% para PPO e 208.7% para POD.

Palavras-Chave: Água de coco; Alta pressão; Enzimas

2.1 INTRODUCTION

Coconut water (CW) is a natural isotonic beverage composed mainly of sugars and minerals. CW national and international demand has been growing rapidly, especially in the sector of isotonic beverages (ARAGÃO et al., 2001, DATAMARK, 2015).

The liquid inside the coconut shell is sterile and isolated from any contact with oxygen. Nevertheless, from the moment the coconut is opened, coconut water is exposed to oxygen and to microorganisms. The contact of coconut water with oxygen implies in rapid oxidation due to two natural enzymes, polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD), which promotes color, flavor and nutritional value losses (EMBRAPA, 2005).

Polyphenoloxidase (E.C.1.10.3.1) is classified as oxidoreductase and is capable of catalysing 2 distinct reactions in presence of oxygen: Hydroxylation of monophenols to diphenols and oxidation of o-diphenols to ortho-quinones. The browning reaction continues by non-enzymatic oxidation, leading to quinones polymerization and generating dark coloured pigments (MATSUI et al., 2006; CARVALHO et al., 2006). Coconut water PPO has molecular weight of 73.8 kDa and ideal temperature and pH of 25°C and 6.0, respectively (CAMPOS et al., 1996; MAGALHAES et al., 2005).

Peroxidase (E.C.1.11.1.7) catalyses redox reactions in the presence of hydrogen peroxide, oxidizing phenolic compounds in coconut water (DUARTE et al., 2002). Peroxidase is associated to deterioration of nutrients, such as ascorbic acid, and foods flavor (CARVALHO et al., 2006). Coconut water POD has an estimated molecular weight of 49.2 kDa and ideal temperature and pH of 35°C and 5.5, respectively (CAMPOS et al., 1996; MAGALHAES et al., 2005).

Because of the natural oxidative effects PPO and POD and of the microbiological contamination, coconut water must undergo industrial processing in order to achieve product's stability. Besides, industrialization allows volume and weight reduction (ROSA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

The currently applied methods to extend CW shelf life are thermal processes. Although thermal processing is effective in inactivating microorganisms and enzymes, thermos-sensitive products such as CW may undergo negative chemical alterations which have an impact on products sensory and nutritional properties (CAMPOS et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2005).

Non thermal processing technologies arise as an option for processing of thermo-sensitive products. High Isostatic Pressure (HIP) processing is an alternative non-thermal method where the product is placed in a fluid-filled chamber and subjected to high pressure. This technology is capable of inactivating microorganisms and enzymes causing minimum alteration on flavour, aroma and nutritional value (CAMPOS et al., 2003).

Considering the potential of HIP for processing of thermo-sensitive products, such as CW, the present paper investigated the effect of the parameters pressure (P), temperature (T) and time (t) on relative activity of the enzymes PPO and POD during HIP processing using response surface methodology.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 COCONUT WATER SAMPLES

Coconut water was extracted from 6 coconuts with 7-month maturation originated from the Espírito Santo state of Brazil, using an inox coconut opener. Water from the 6 coconuts were blended, filtered in plastic strainer and stored in 60mL fractions in a vacuum sealed flexible plastic bag (Solupack® FCYVEDA - Coextruded multilayer film from polyolefin and polyamides, EVOH and its copolymers - Oxygen barrier = 3 cm³/m²/day / water vapour barrier = 8 g/m²/day) at -18°C for no more than 1 month.

The obtained coconut water blend was characterized by measurement of pH (4.9 ± 0.02), total soluble solids content (5.6 ± 0.07 °B) and total titratable acidity (5.3 ± 0.4) according to the below described methodologies.

Coconuts were from dwarf coconut palms (*Cocos nucifera*) originally from Espírito Santo State (Brazil), harvested after 7 month maturation.

2.2.2 HIP EQUIPMENT AND PROCESSING CONDITIONS

HIP process was carried in 2L HIP equipment with temperature control and maximum operation pressure of 690MPa (Avure Technologies, UK). Water was used as pressure conducting media and compression was indirect, by fluid injection.

A three variable central composite rotational design was used to determine the effects of pressure (100-600MPa), processing time (3-30 min) and temperature (25-60°C) on the activity of POD and PPO. The variables levels used in the experimental design are specified in Table 2.1.

Table 2.1: Levels used in the central composite rotational experimental design

	Levels				
Variables	-1.68	-1	0	1	1.68
Pressure (MPa)	100.0	201.4	350.0	499.0	600.0
Temperature (°C)	25.0	32.1	42.5	52.9	60.0
Time (min)	3.0	8.5	16.5	24.5	30.0

For each point in the experimental design, the enzyme activities of POD and PPO were accessed 0, 24 and 48 hours after processing to determine if there were any alterations in measured activities. Samples were stored at 4°C. Central point testing was performed in triplicate. All conditions analysed and the results obtained for each enzyme are shown in “Appendix III” section.

An adiabatic heating of 3°C each 100MPa was considered in order to reach the desired temperature in the moment the chamber and samples achieved the programmed pressure.

The duration of the process was defined as the interval where pressure reached the desired pressure. That is, intervals of pressurization and depressurization are not considered as part of process duration. Intervals of pressurization can be found on the “Appendix II” section of this thesis. Depressurization intervals were negligible (in the order of 5 seconds).

2.2.3 ENZYMATIC ACTIVITY

For both POD and PPO, 1 unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme needed to increase absorbance in a rate of 0.001 per minute (DUARTE, 2002).

Relative activity was defined $100 \cdot A/A_0$ where A is the relative activity after processing and A_0 the activity of the non-processed control sample.

- **Polyphenoloxidase (PPO)**

PPO activity was assayed spectrophotometrically by Ponting (1948) adapted method.

A tube containing 2.3 mL phosphate buffer 0.2 mol/L (pH 6.0) and 0.7 mL catechol aqueous solution 0.2 mol/L had its temperature stabilized at 25 °C for 10 min. A tube with 2mL of coconut water was also stabilized at 25 °C for 10 min. After temperature stabilization, 1 mL of coconut water was added to the first tube and absorbance was measured at 425 nm in 15 seconds intervals for 8 min.

The analysis was performed in triplicate for each sample and the activity calculated by Equation 1, where α is the slope of the plotted curve with A_{425} against time in the range of 1 to 4 min and DF is the dilution factor of coconut water in the reaction (DF=4).

$$Activity = \frac{\alpha}{0,001} * DF \quad \textbf{Equation 1}$$

- **Peroxidase (POD)**

POD activity was assayed spectrophotometrically by Fehrmann (1948) adapted method.

A tube containing 2.3 mL phosphate buffer 0.2 mol/L (pH 5.5) and 0.2 mL of hydrogen peroxide (0.1 %) had its temperature stabilized at 35°C for 10 min. Other two tubes, one containing 2 mL of coconut water and other 2mL of alcoholic guaiacol solution (0.05 %) were also stabilised at 35 °C for 10 min. After temperature stabilization, 0.5 mL of the guaiacol solution and 1 mL of coconut water were added to the first tube and absorbance was measured at 470 nm in 15 sec intervals for 8 min.

The analysis was performed in triplicate for each sample and the activity calculated by equation 2, where β is the slope of the plotted curve of absorbance against

time in the range of 6 to 9 min and DF is the dilution factor of coconut water in the reaction (DF=4).

$$Activity = \frac{\beta}{0,001} * DF \quad \text{Equation 2}$$

2.2.4 STATISTICAL ANALYSIS

The obtained results were analysed in the software STATISTICA™ and the effects of the variables and their interactions on the relative activity of POD and PPO were estimated considering a level of significance of 5%.

A variance analysis (ANOVA) was also performed to validate the obtained models by the F-test.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

A table showing the measurements of PPO and POD activities in the experimental points is available in the “Appendix III” section.

Results show that all three variables (pressure, time and temperature) have a positive effect on relative activity of POD 0h after processing (within the studied range), meaning that the higher the pressure and temperature and the longer the time, the higher the relative activity.

Generally, pressure leads to enzymes inactivation. A 600MPa, 5 min process at room temperature, for example, was capable of inactivating up to 35% of Camarosa strawberry PPO (SILVA et al., 2003) while the inactivation of PPO from apple, grape, avocado and pear at room temperature became noticeable only at 600, 700, 800 and 900 MPa respectively (WEEMAES et al., 1998). However, pressure-induced activation of enzymes has also been observed. Matser et al., for example, observed increase in PPO activity of mushrooms in a 600MPa process at room temperature. Authors attribute enzyme activation to two different phenomena: Transition from latent form to active form and/or pressure-induced membrane damage and resulting leakage of enzyme and substrate from vegetable tissues (MATSER, 2000; SONG 2002).

Among the experimental points, the highest POD activation (relative activity=164%) was achieved at the condition where P=499 MPa; T=52.59 °C; t=24.5 min, and the maximum inactivation (relative activity=92.45%) at P=350 MPa; T=42.5 °C;

$t=3$ min. However, the constructed model allows the prediction of the points with maximum activation and inactivation in the whole modelled interval, and not only among the experimental points. The condition of higher predicted activation was $P=600$ MPa; $T=60^{\circ}\text{C}$; $t=30$ min, with relative activity of 208.7% and the condition with minimum predicted inactivation was an experimental point at $P=350$ MPa; $T=42.5^{\circ}\text{C}$; $t=3$ min, with relative activity of 96%. The obtained surfaces for POD relative activity at 0h (immediately after processing) are illustrated in Figures 2.1, 2.2 and 2.3 and are valid within a 95% level of statistical significance.

The surface in Figure 2.1 clearly shows the second order effects of pressure and temperature on POD relative activity, which are also shown in the Pareto chart in Figure 2.4. The interaction effect of time and temperature is interestingly observed in Figure 2.3 by the change in the slope of the line segment joining the points of minimum and maximum times at 25°C and the slope of the line segment joining the points of minimum and maximum times at 60°C .

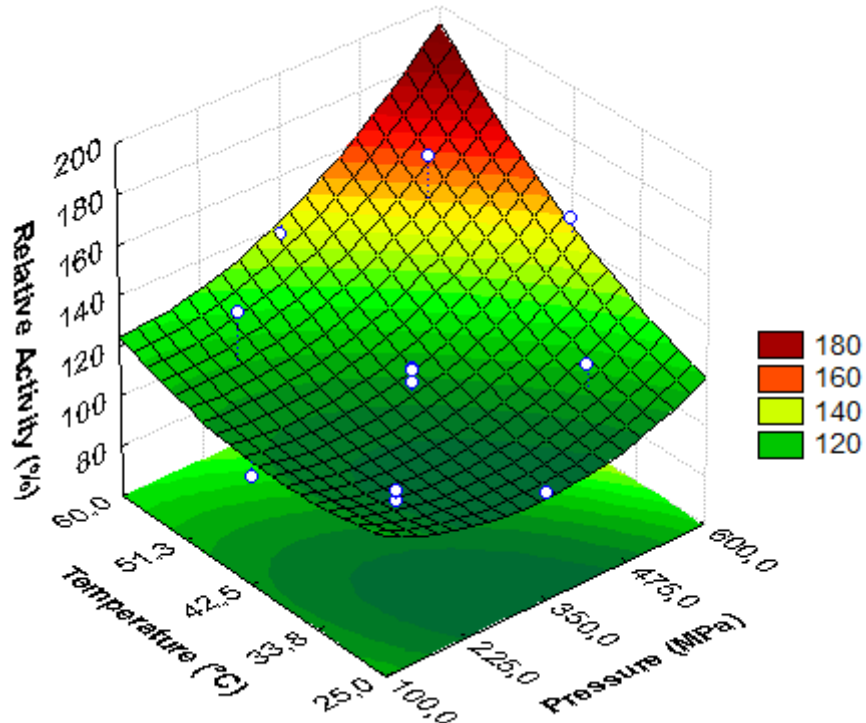


Figure 2.1. Response surface of the relative activity of POD 0h after processing as a function of pressure and temperature with fixed time of 16.5 min (central point).

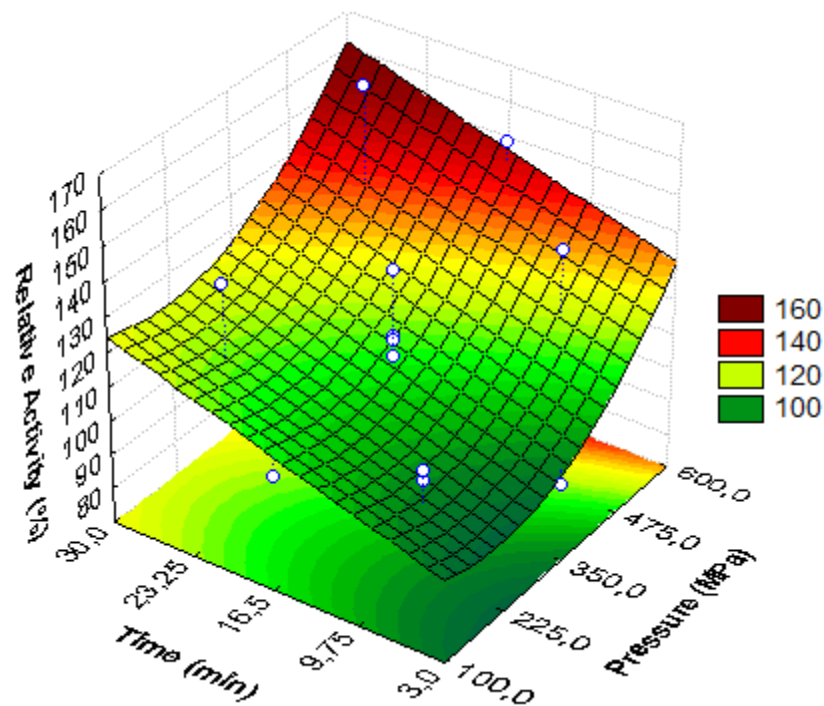


Figure 2.2. Response surface of the relative activity of POD 0h after processing as a function of pressure and time with fixed temperature of 42.5°C (central point).

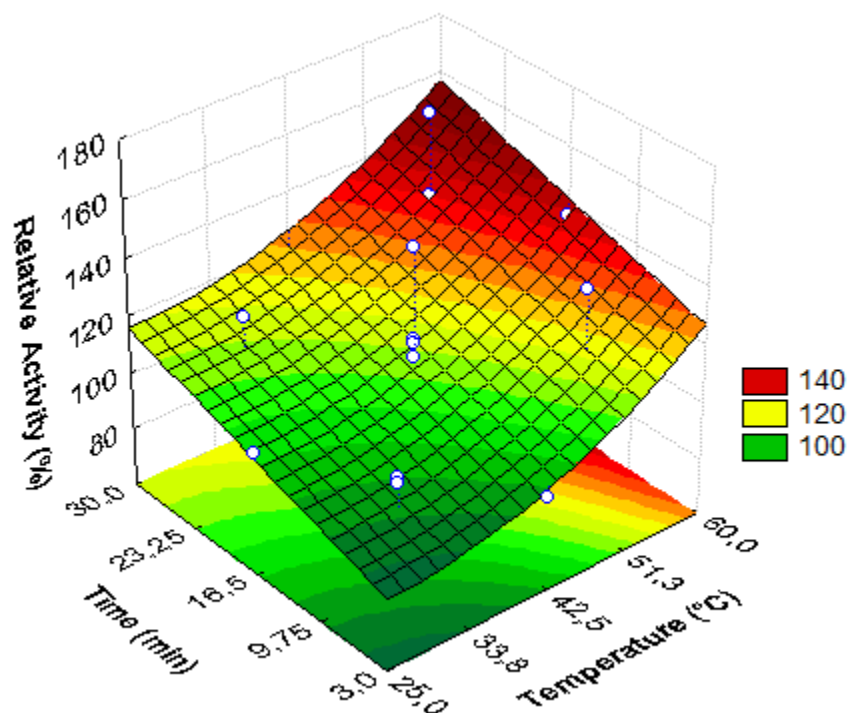


Figure 2.3. Response surface of the relative activity of POD 0h after processing as a function of temperature and time with fixed pressure of 350MPa (central point).

The ANOVA table obtained for the modelling of POD relative activity 0h after processing is given in Table 2.2.

Table 2.2. ANOVA table for the modelling of POD relative activity 0h after processing (SQ: Sum of squares; DF: Degrees of freedom; MS: Mean square; Fcalc: Calculated value of F) – $R^2=0.92129$

	SQ	DF	MS	Fcalc	p-value
Regression	5583.21	2	2791.60	73.37	3.8E-08
Residue	532.69	14	38.05	4.14	
Lack of fit	512.07	12	42.66		
Pure error	20.61	2	10.31		
TOTAL	6115.89	16			

The tabled F value for a 5% significance level is 3.74, indicating the model is valid for a 5% significance level.

The Pareto Chart for this model can be seen in Figure 2.4 and shows the standardized effects of the different variables that had a statistically valid effect. The linear effect of temperature is the highest among the observed effects and is followed by linear pressure and time effects, in this order of importance. Second order effect of pressure and temperature and combined effect of time and temperature are the lowest among the identified significative effects.

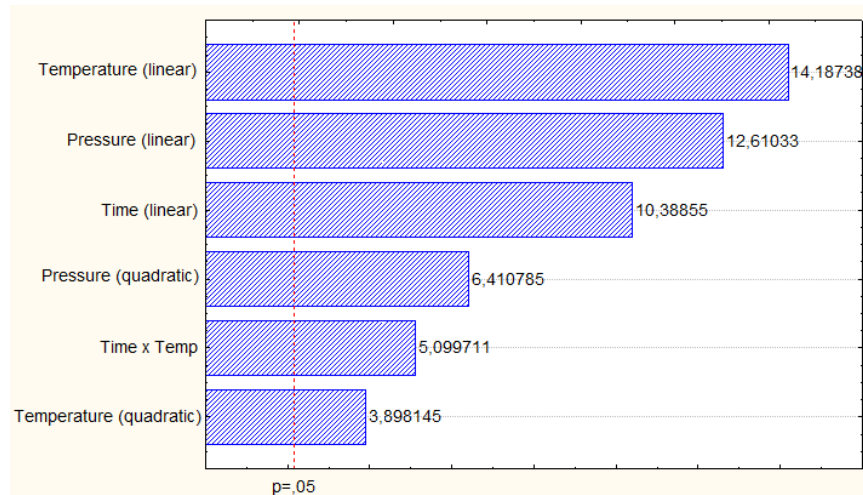


Figure 2.4. Pareto Chart showing standardized effects of the variables considered for modelling the relative activity of POD 0h after processing. The red line is the t-value for $\alpha=5\%$

The plotting of predicted versus observed values is of great use for observing the accuracy of the obtained model. From Figure 2.5 it can be noted that the line fitting the points is very close to the function $x=y$ (that is, predicted value=observed value), indicating a good prediction of the experimental model.

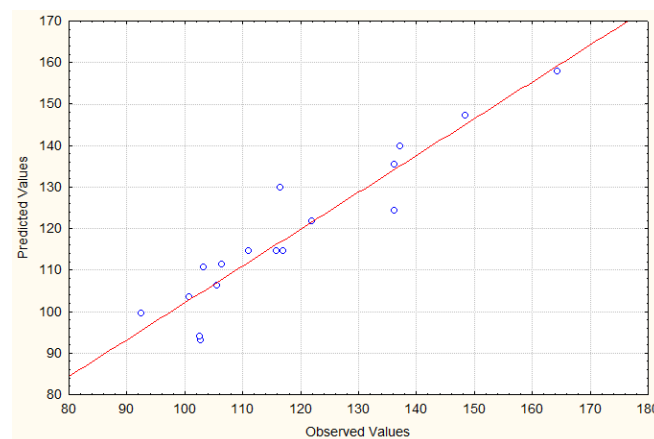


Figure 2.5. Plot of observed (points) vs. predicted (line) values of POD relative activities 0h after processing.

At 24h after processing, the modelling of relative activities of POD resulted in surfaces similar to the ones obtained for 0h, where all three variables (pressure, temperature and time) show positive effects on POD relative activity. Surfaces are valid within a 95% statistical significance and are shown in Figures 2.6, 2.7 and 2.8.

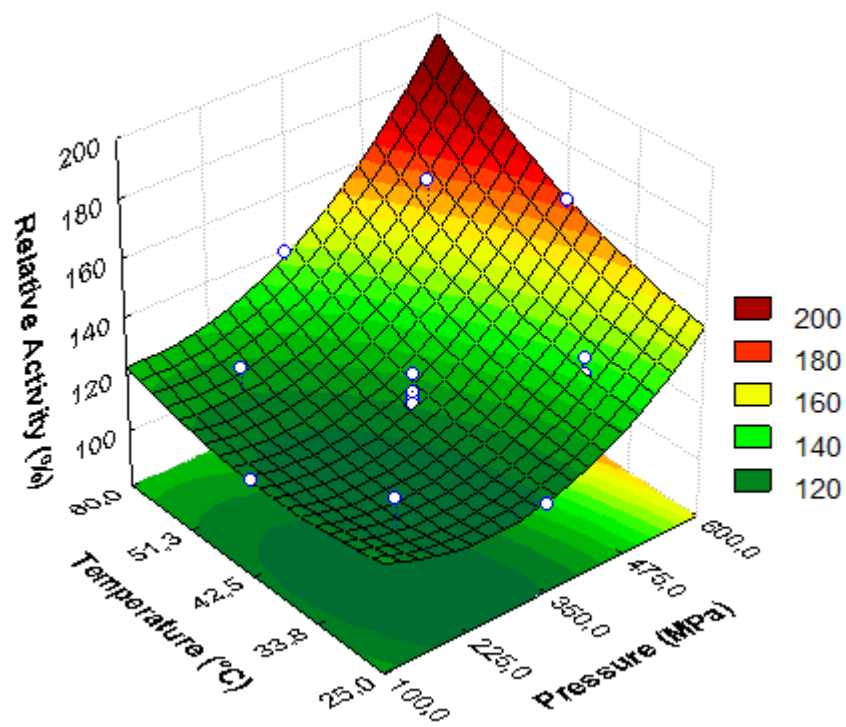


Figure 2.6. Response surface of the relative activity of POD 24h after processing as a function of temperature and pressure with fixed time of 16.5 min (central point).

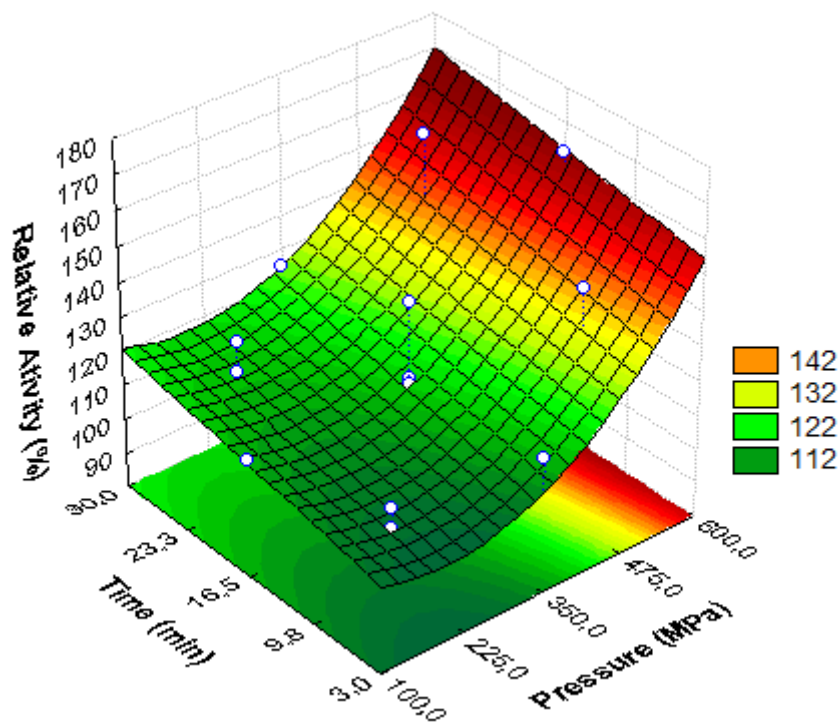


Figure 2.7. Response surface of the relative activity of POD 24h after processing as a function of pressure and time with fixed temperature of 42.5°C (central point).

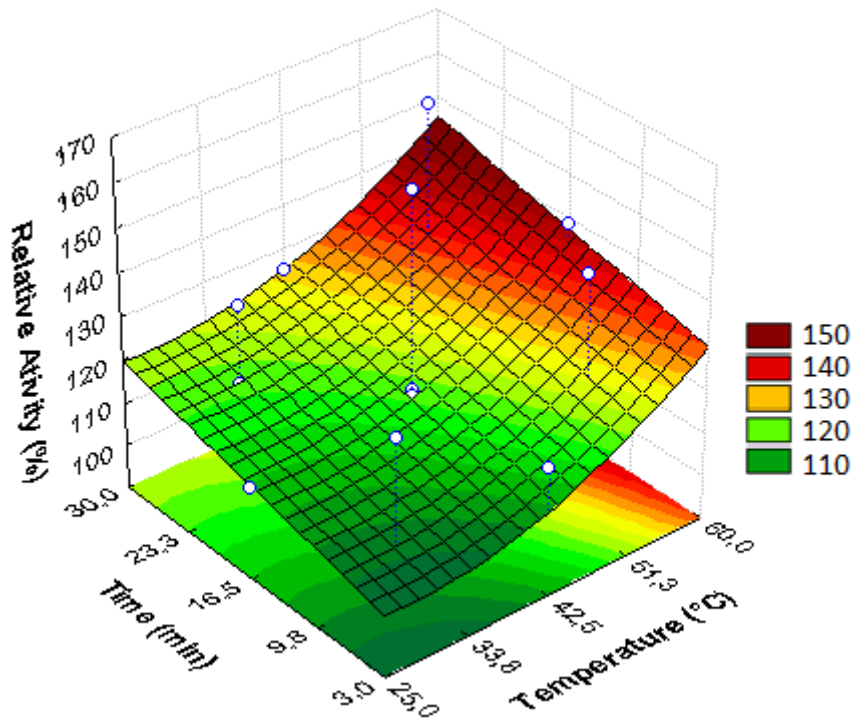


Figure 2.8. Response surface of the relative activity of POD 24h after processing as a function of time and temperature with fixed pressure of 350MPa (central point).

The ANOVA table for the modelling of POD relative activity 24h after processing is given in Table 2.3.

Table 2.3. ANOVA table for the modelling of POD relative activity 24h after processing (SQ: Sum of squares; DF: Degrees of freedom; MS: Mean square; Fcal: Calculated value of F) – $R^2=0.88899$

	SQ	DF	MS	Fcal	p-value
Regression	4356,204	3	1452.068	34.70323	1.8E-06
Residues	543,952	13	41.84245	0.165749	
Lack of fit	259,401	11	23.58195		
Pure error	284,550	2	142.2752		
TOTAL	4900,156	16			

It can be noticed from the surfaces in Figures 2.6, 2.7 and 2.8 and from the Pareto charts (Figures 2.4 and 2.10) that alterations in the magnitude of variables effects occurred in a small scale, not sufficient to promote great differences between the models at time 0 and 24. This indicates the alterations caused by these variables during the process were not reversible within 24 hours.

The chart of predicted vs observed value for POD activity 24h after processing is illustrated in Figure 2.9 and the Pareto Chart on Figure 2.10, showing the effects of standardized variables considered by the model.

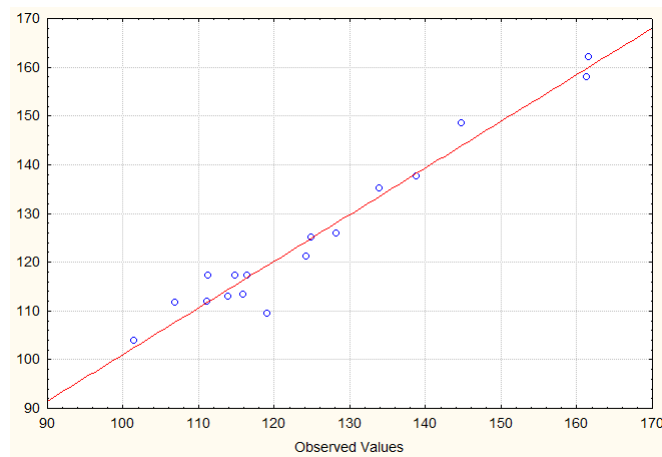


Figure 2.9. Plot of observed (points) vs. predicted (line) values of POD relative activities 24h after processing.

On Figure 2.9 it is observed that the curve fitting the predicted vs observed points approaches the $x=y$ curve, indicating the model has high predictive capacity. The model R^2 equals 0.88899, which is another indicator of the model high predictive capacity.

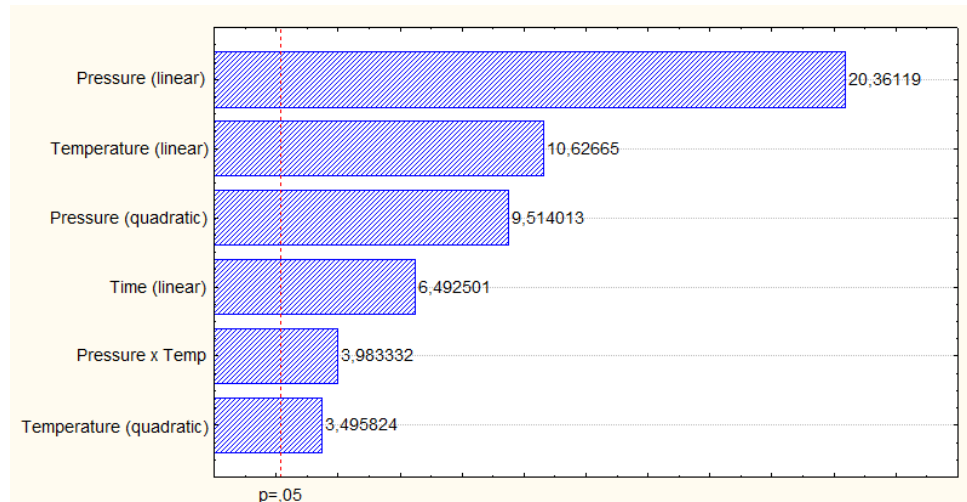


Figure 2.10. Pareto Chart showing standardized effects of the variables considered for modelling the relative activity of POD 24h after processing. The red line is the t-value for $\alpha=5\%$

The Pareto Chart illustrated on Figure 2.10 shows that pressure affects POD activity 24h after processing linearly and is the most important effect when compared to other statistically valid effects considered in the modelling. Second order effect of temperature is the less influent effect on POD activity 24h after processing.

Surfaces obtained for POD activity 48 hours after processing are shown in figures 2.11, 2.12 and 2.13. The ANOVA table and the chart of predicted vs observed value for this model are shown respectively in Table 2.4 and in Figure 2.14. In figure 2.15 the Pareto Chart is shown for the 48h after processing model with the standardized effects of statistically significant variables.

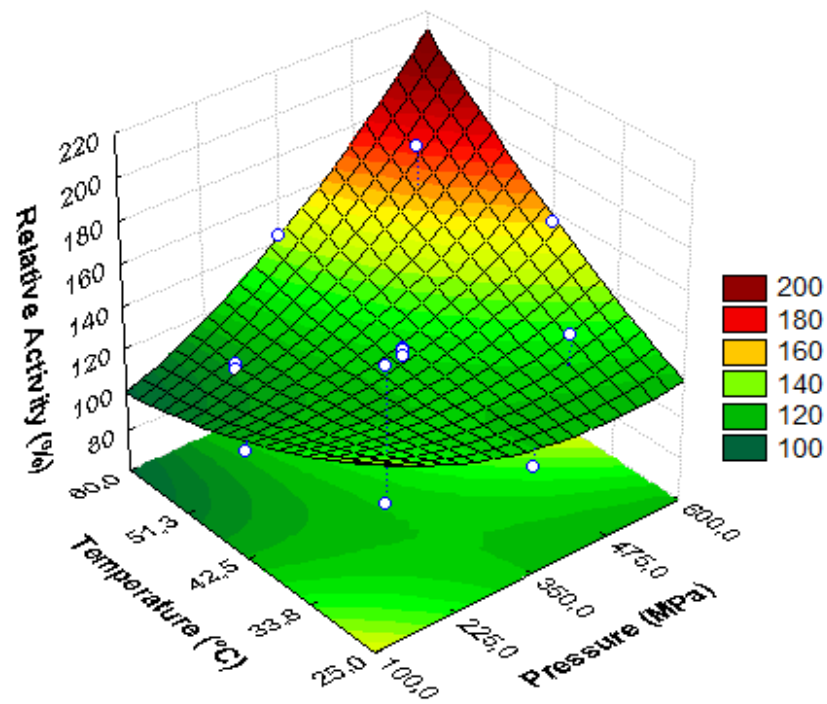


Figure 2.11. Response surface of the relative activity of POD 48h after processing as a function of temperature and pressure with fixed time of 16.5 min (central point).

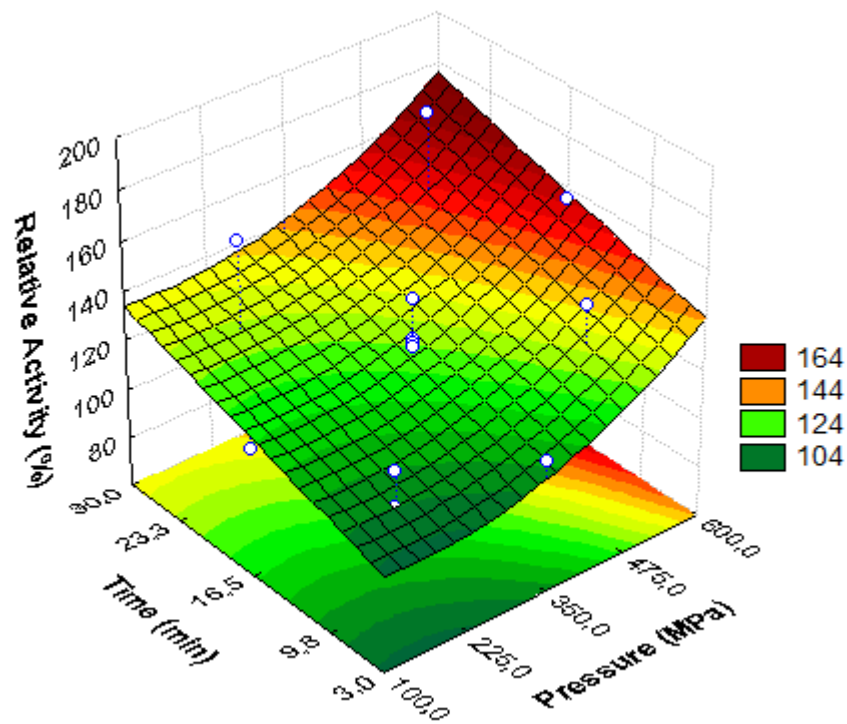


Figure 2.12. Response surface of the relative activity of POD 48h after processing as a function of pressure and time with fixed temperature of 42.5°C (central point).

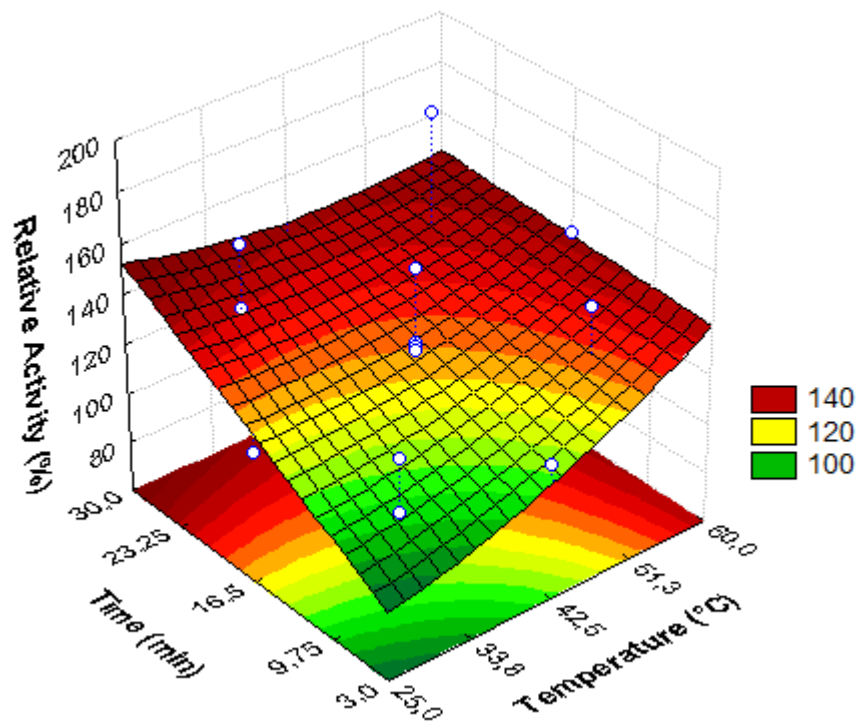


Figure 2.13. Response surface of the relative activity of POD 48h after processing as a function of time and temperature with fixed pressure of 350MPa (central point).

Table 2.4. ANOVA table for the modelling of POD relative activity 48h after processing (SQ: Sum of squares; DF: Degrees of freedom; MS: Mean square; Fcal: Calculated value of F) – $R^2=0.88899$

	SQ	DF	MS	Fcal	p-value
Regression	5966.41	2	2483.20	27.63	1,4E-05
Residues	1511.32	14	107.95	44.50	
Lack of fit	1505.69	12	125.47		
Pure error	5.639	2	2.82		
TOTAL	7477.74	16			

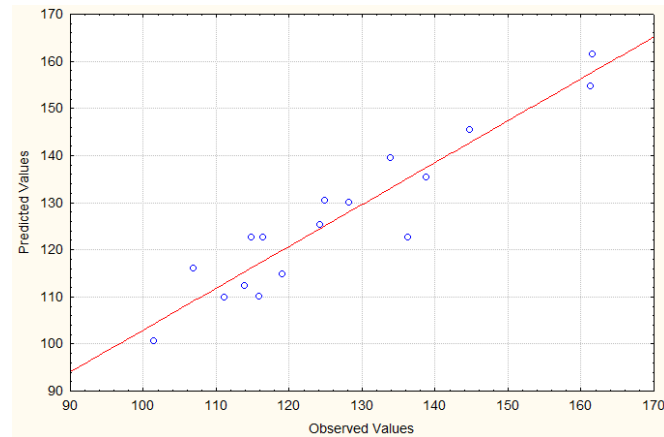


Figure 2.14. Plot of observed (points) vs. predicted (line) values of POD relative activities 48h after processing.

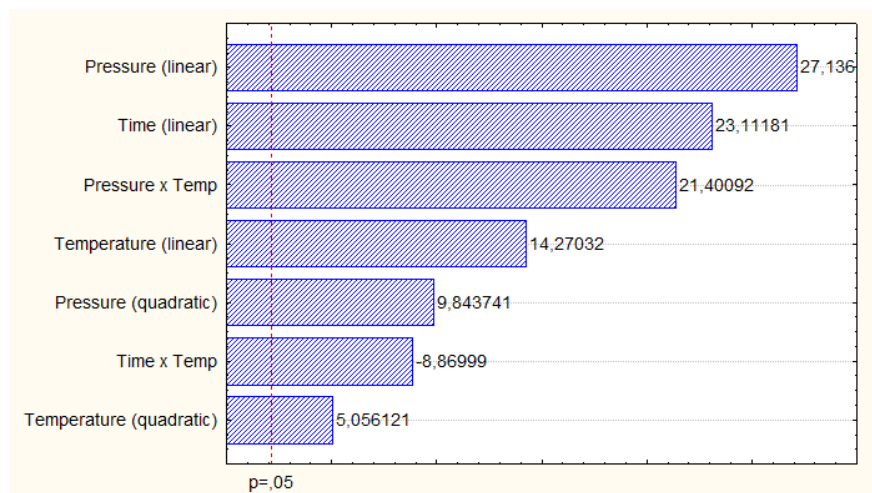


Figure 2.15. Pareto Chart showing standardized effects of the variables considered for modelling the relative activity of POD 48h after processing. The red line is the t-value for $\alpha=5\%$

The ANOVA analysis for POD activity 48 hours after processing gives an $R^2=0.88899$. This observation, together with the plot of observed vs. predicted values (Figure 2.14) confirms the obtained model is valid. On Figure 2.15, the Pareto chart shows there are three major effects: First order effect of pressure, first order effect of time and combined effect of pressure and temperature, in this order of importance.

Linear effects of pressure, time and temperature appeared between the 4 most relevant effects of the three built models (0, 24 and 48h after processing), indicating this effects are not only the most relevant but also not time-reversible during storage.

It is interesting to notice also that the first order effect of pressure increases with storage time, assuming the values 14.2 ; 20.4 and 27.1 at times 0, 24 and 48h, respectively.

Regarding the effects of HIP processing on PPO relative activity 0h after processing, a valid model was obtained in a 5% level of significance and obtained surfaces are shown in Figures 2.16, 2.17 and 2.18. This Figures shows that the effect of pressure on PPO relative activity is always positive and also that there is a synergistic effect of pressure and time. The effects of temperature and time, however, show a second order behaviour, resulting in a more complex surface.

The ANOVA table is given in Table 2.5, the constructed surfaces on Figures 2.16, 2.17 and 2.18 and the plotting of predicted vs observed value on Figure 2.19. Figure 2.20 is the Pareto Chart showing the standardized effects of the variables considered for modelling PPO relative activity 0h after processing.

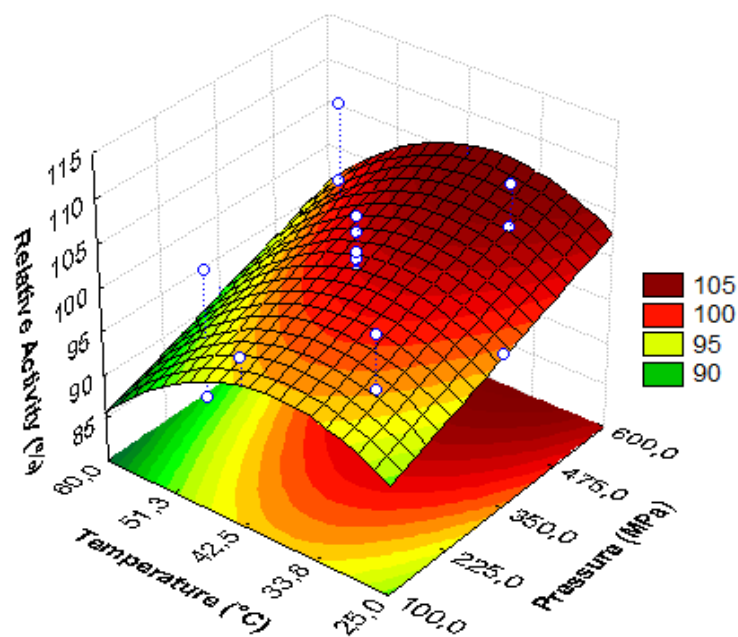


Figure 2.16. Response surface of the relative activity of PPO 0h after processing as a function of pressure and temperature with fixed time of 16.5 min (central point).

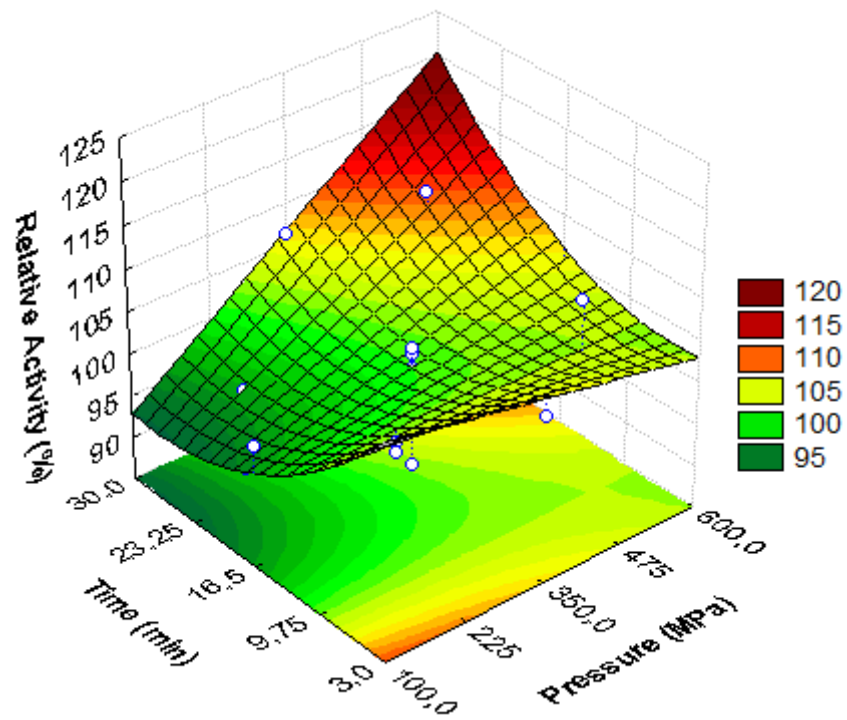


Figure 2.17. Response surface of the relative activity of PPO 0h after processing as a function of pressure and time with fixed temperature of 42.5°C (central point).

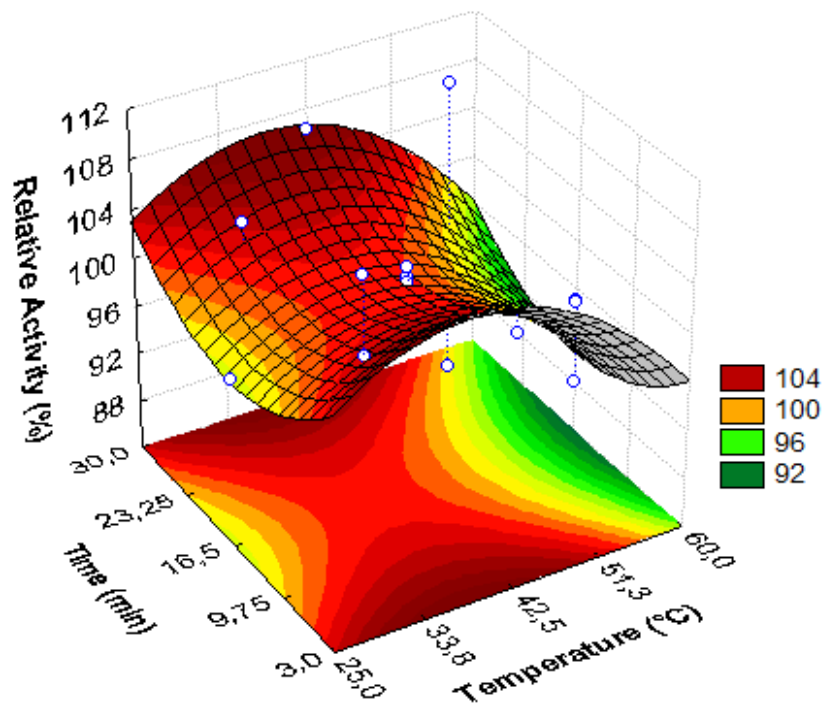


Figure 2.18. Response surface of the relative activity of PPO 0h after processing as a function of temperature and time with fixed pressure of 350MPa (central point).

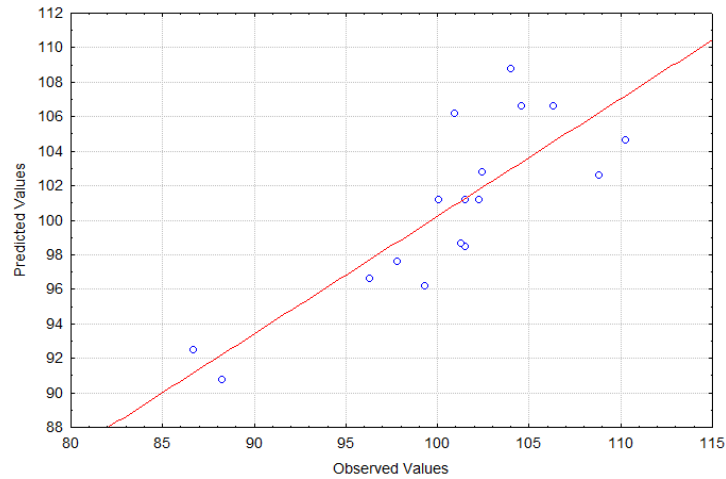


Figure 2.19. Plot of observed (points) vs. predicted (line) values of PPO relative activities 0h after processing.

Table 2.5. ANOVA table for the modelling of PPO relative activity 0h after processing (SQ: Sum of squares; DF: Degrees of freedom; MS: Mean square; Fcal: Calculated value of F) – $R^2=0.68126$

	SQ	DF	MS	Fcal	p-value
Regression	256.06	2	128.03	4.67	2,79E-02
Resiues	383.64	14	27.40	2.22	
Lack of fit	356.85	12	29.74		
Pure error	26.78	2	13.39		
TOTAL	639.70	16			

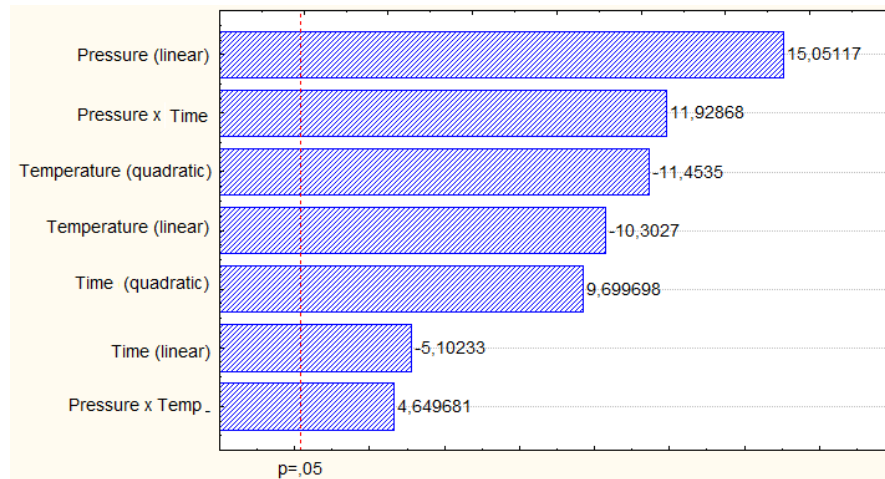


Figure 2.20. Pareto Chart showing standardized effects of the variables considered for modelling the relative activity of PPO 0h after processing. The red line is the t -value for $\alpha=5\%$

Due to secondary reactions where quinones take part, forming complex polymeric chains, methodology for PPO activity measurement is challenging. Also, other enzymes with similar properties and the occurrence of isoenzymes can interfere with PPO activity measurement. (MURASAKI, 2004). This can explain the low R^2 obtained for PPO relative activity model, implying in a low model predictability.

Although the model of PPO relative activity for 0h after processing shows differences in enzyme activity, the analysis of the obtained data for relative activity 24 and 48 hours after processing shows no effect of pressure on PPO relative activity, meaning the pressure-induced alterations are reversible within 24 hours during storage in the studied range.

The results obtained for PPO are in accordance with Lukas (2013) that found no significant difference in the activity of coconut water PPO processed at 400, 500 and 600 MPa for 2 min at starting temperature of 4 °C.

2.4 CONCLUSIONS

HIP processing is capable of altering enzymes activity. However, not always in the direction of inactivation. In the case of coconut water, most of the tested HIP process conditions resulted in activation of POD and PPO. In fact, results show that all three variables (pressure, time and temperature) had a positive effect on the relative activity of POD, showing that the higher the pressure and temperature and the longer the time, the higher the relative activity. The conditions of higher predicted activation of PPO and POD were, respectively, $P=600\text{MPa}$, $T=28^{\circ}\text{C}$, $t=30\text{ min}$ and $P=600$, $T=60^{\circ}\text{C}$, $t=30\text{min}$, with relative activity of 120% and 208.7%, respectively.

It is also important to emphasize that some of the effects of the process on enzymes are reversible during storage, especially in the case of PPO. This reversibility is most likely due to reassembly of enzyme structure. Considering this reversibility effect, the values obtained for enzyme activity immediately after processing must not be considered as a fixed product parameter.

Due to POD activation during HIP processing, the use of HIP for coconut water processing must be accompanied by a secondary hurdle to avoid product quality degradation by POD – An example would be a high oxygen barrier package. Also, it would be interesting from the enzymatic perspective to adopt low-pressure, low-temperature, short processes.

2.5 REFERENCES

- ARAGAO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M. de O. Água-de-coco. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2001. 32p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 24)
- CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L; CRISTIANINI, M. The use of High Pressure Teechnology in Food Processing - **Brazilian Journal of Food Technology** v.6, n.2, p. 351-357, 2003
- EMBRAPA – Informação tecnológica (Coleção Agroindústria Familiar) , 2005 – Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11868/2/00076150.pdf>
- FEHRMANN, W.L.; DIAMOND, A. E. – Peroxidase activity and phytopora resistance in different organs of potato plant. **Phytopatology**, v. 57, p. 69-72, 1967
- LUKAS, A. R. (2013). **Use of High Pressure Processing to Reduce Foodborne Pathogens in Coconut Water**. Tese apresentada para a obtenção do título de mestre em ciência e tecnologia de alimentos do Instituto Politécnico e Universidade Estadual de Virginia.
- MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. - Conservação de Água de Coco Verde por Filtração com Membrana - **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(1): 72-77, jan.-mar. 2005
- OLIVEIRA, H. J. S.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; CARDOSO, M. G.; TEIXEIRA, J. E. C.; GUIMARÃES, N. C. C. Carbohydrate measuvements on four brands of coconut water. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.27, n.5, p.1063- 1067, 2003.
- PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extracts - **Archives of biochemistry**, v.19, p. 47-63 (1948)
- ROSA, M.F.; ABREU, F.A.P. Água de coco: métodos de conservação. Fortaleza: **Embrapa CNPAT/SEBRAE-CE**, 2000. 40p. (Documentos 37)
- WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I.V.D.; HENDRICKX, M. (A) High pressure Inactivation of Polyphenoloxidases - **Journal of Food Science** v.63, n.5, 1998
- ZIMMERMANN, M.; SCHAFFNER, D. W.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature - **LWT - Food Science and Technology** (2013) 1-6

CHAPTER 3

Effects of High Isostatic Pressure on Coconut Water Microbial Contaminants

Authors: Elisa Barison Gragnani^a, Marcelo Cristianini^{a*}

Affiliations:

a Department of Food Technology (DTA), School of Food Engineering (FEA), University of Campinas (UNICAMP), Monteiro Lobato, 80. PO Box 6121, 13083–862, Campinas, S.P. Brazil.

*Author for Correspondence. Address Monteiro Lobato, 80, School of Food Engineering, University of Campinas, Postal code: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil, Phone: +55 19 3521-7592; fax +55 19 3521-4008

E-mail: olecram@unicamp.br

Article to be submitted to the LWT *Food Science and Technology*

ABSTRACT

Coconut water is an isotonic beverage with growing demand. Coconut water processing is currently carried out by thermal methods. These methods are efficient in the inactivation of enzymes and microorganisms but also promote loss of products sensory and nutritional properties, especially in thermal sensitive foods, which is the case of coconut water. For this reason, searching for non-thermal processing technologies has become a trend for thermal sensitive foods. A non-thermal processing technology with high potential for coconut water processing is high isostatic pressure processing (HIP). The inactivation of 3 microorganisms (*Lactobacillus fructivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*) was investigated in coconut water in different pressure conditions (200, 300, 400 and 500 MPa) at 25 °C for 2 min. Results showed that *S. cerevisiae* count was reduced in more than 9 log cycles in the 500MPa process, being the least resistant of the 3 tested microorganisms, followed by *E. coli* and *L. fructivorans*, whose counts were reduced, respectively, in more than 9.26 and 7.85 log cycles in the same process conditions. The shelf life test showed no growth in processed samples (600 MPa, 25 °C, 3 min) for 66 days, confirming no sub-lethal injuries were caused by the process.

Keywords: Coconut water; High pressure; Microorganisms

RESUMO

A água de coco é uma bebida isotônica natural que tem apresentado relevante e crescente demanda no mercado. A água de coco é atualmente processada por meio de processos térmicos, que, apesar de serem capazes de inativar enzimas e microrganismos, provocam efeitos deletérios nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos especialmente dos alimentos termosensíveis – que é o caso da água de coco. Desta forma, é necessário buscar novos métodos de processamento da água de coco a fim de aumentar a qualidade deste produto. O processamento por alta pressão isostática (HIP) é um método de grande potencial para o caso de alimentos termosensíveis e consiste em colocar o alimento em uma câmara cuja pressão é elevada até o nível desejado por injeção de fluido ou compressão da câmara por ação de um pistão. A inativação de 3 microrganismos (*Lactobacillus fructivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*) foi investigada em água de coco em diferentes condições de pressão (200, 300, 400 e 500 MPa) a 25 °C por 2 min. Os resultados mostram que a contagem de *S. cerevisiae* foi reduzida em mais de 9 ciclos logarítmicos após processo de 300MPa, sendo o menos resistente entre os microrganismos testados, seguida pela *E. coli* e *L. fructivorans*, cujas contagens foram reduzidas em 9,26 e 7,85 ciclos logarítmicos, respectivamente. O teste de vida de prateleira não acusou crescimento de microrganismos nas amostras processadas (600 MPa, 25 °C, 3 min), confirmando que o processo utilizado não causou injúrias sub-letais.

Palavras-Chave: Água de coco; Alta pressão; Microorganismos

3.1 INTRODUCTION

Coconut water (CW) is a natural isotonic beverage composed mainly of sugars and minerals. CW national and international demand has been growing rapidly, especially in the sector of isotonic beverages (ARAGÃO et al., 2001; DATAMARK, 2015).

Large scale commercialization of CW requires the product industrialization in order to reduce volume and weight and extend shelf life (ROSA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). The extension of CW shelf life depends, among other factors, on the inactivation of microorganisms that are naturally present in the product. The main classes of microorganisms that commonly contaminate CW are the lactobacillus genus and yeasts.

The currently applied methods to extend shelf life are thermal processes. However, it is known that thermal processing may promote deleterious effects on both sensory and nutritional properties of CW (CAMPOS et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2005).

New processing methods that are not based on heat are very interesting options for processing of thermo-sensitive products. High Isostatic Pressure (HIP) processing consists in placing the product in a fluid-filled chamber whose pressure is elevated either by fluid injection or reduction of the chamber volume by a piston and is capable of inactivating microorganisms causing minimum alteration on flavour, aroma and nutritional value (CAMPOS et al., 2003).

Elevated pressure is capable of altering microorganisms structure and physiology such as inhibition of protein synthesis and disruption of cell wall and membrane (CONSIDINE et al., 2008), compression of gas vacuoles, separation of cell membrane from cell wall (PATTERSON, 2005) and dissociation of ribosomal subunits (ABE, 2007). Cell membrane damages alter its permeability, implying in intracellular pH and permeability variation (MATSER et al., 2004) and leakage of intracellular components (CONSIDINE et al., 2008).

The effect of high pressure on microorganisms is dependent both on the matrix where the microorganism is located and on microorganism itself. Parameters affecting microorganisms baroresistance include growth phase, gram stain, sporulated form matrix composition, pH, water activity and temperature.

Many studies have been developed testing the effects of high pressure on microbial load reduction in juices. Bull et al. (2004) applied a 600MPa pressure for 1 minute at 20°C on orange juice, reducing microbial load in more than 7 log cycles, reaching non-detectable levels. Bayindirli et al. (2004) also reached non-detectable levels of microorganisms when investigating the inactivation of pathogens (*S. aureus*, *E. coli* O157:H7 and *S. enteritidis* FDA) in apple, orange, apricot and sour cherry juices, after HIP processing of 350 MPa and 40°C during 5 min.

Zimmermann et al. (2013) explored the combination of HIP with mild temperatures aiming at modelling the inactivation of *B. coagulans* in this conditions. The applied pressures were in the range of 300 to 600 MPa, temperatures between 50 and 60 °C. 300 MPa processes at 50 and 60 °C showed 2 and 2.4 log reduction, respectively, after 15 min processing. 600 MPa processes at 50 and 60 °C, for 15 min, reached reductions of 3.1 and 5.7 log, respectively.

As the coconut water, when inside the nut, is sterile, all contamination occurs after the opening of the fruit, due to contact with the environment, equipment and handlers. Therefore, the main contaminants of coconut water are moulds, yeasts and bacteria found in the production environment (DOSUALDO, 2007). It is important to highlight that, once contaminated, coconut water follows a rapid spoilage process, not only for having ideal pH and sugar levels for microorganism growth, but also for containing substances that stimulates growth and cell division such as myo-inositol and diverse cytokinins (PAIN 2012).

Among the yeasts most frequently associated to juice spoilage is *Saccharomyces cerevisiae* (BELTRAN et al., 2005). Given the relevance of *S. cerevisiae* as a juice and fruit products contaminant, many studies investigate the effects of HIP on this yeast. Basak et al. (2002) tested the effects of HIP on *S. cerevisiae* in natural and concentrated orange juice. Higher inactivation was observed in natural juice than in concentrated juice (confirming the importance of the matrix on microorganism baroresistance). The author obtained a 3-log reduction on *S. cerevisiae* count after a 250 MPa processing at 20°C for 20 min.

Besides *S. cerevisiae*, other microorganisms, such as *Lactobacillus* sp, are commonly identified as contaminants in diverse food products, especially fruit products. Hence, the inactivation of *Lactobacillus* sp using HIP is of extreme relevance. Ulmer et al.

(2000), for example, studied the inactivation of *L. plantarum* in beer in a pressure range of 200 to 600 MPa and found that HIP processing at 600MPa with no holding time could reduce *L. plantarum* count to non-detectable levels from an initial count of 10² CFU/mL.

As different matrices can provide higher or lower protection to microorganisms during HIP, it is important to study the inactivation of microorganisms in the matrix of interest. So far there is only one published article regarding the inactivation of microorganisms in coconut water. In this work, Lukas et al. (2013) investigated the inactivation of three pathogens on coconut water (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*) after treatments of 400, 500 and 600MPa for 120s and initial temperature of 4°C. The authors observed that a 6-log reduction was achieved for the 3 tested microorganisms after processing at 500 and 600 MPa. Differently, at 400MPa, a 4-log reduction was achieved for *E. coli* and *S. typhimurium* and only 3-log reduction for *L. monocytogenes*.

Considering the potential of HIP for processing of thermo-sensitive products, such as CW, the present paper investigates the inactivation of 3 common spoilage microorganisms (*Lactobacillus fructivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*) on coconut water under different high pressure processing conditions: 200, 300, 400 and 500 MPa for 2 min at 25 °C.

A shelf life study was designed to assure no viable cells were left in a count below detection limit after processing

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 COCONUT WATER SAMPLES

A total of 10 coconuts with 7-month maturation originated from the Espírito Santo state of Brazil were, washed with water to remove gross contaminants and then sprayed with a 70% w/v aqueous ethanol solution until completely covered by the ethanol in a biological safety cabinet and allowed to dry under UV-light for 15 min. A hole was bored into the center of the stem scar of the coconuts with a sterile metal coconut opener and coconut water from the 10 coconuts drained into a sterile beaker, blended and immediately inoculated with the desired microorganism. Inoculated samples were distributed in 50mL aliquots in vacuum sealed sterile flexible plastic bags (LDPE-Nylon-LDPE, 16 μ m thickness- TecMaq, Brasil) to be processed or used as control sample.

The obtained coconut water blend was characterized by measurement of pH (5.0 ± 0.04), total soluble solids content (5.6 ± 0.06 °B) and total titratable acidity (5.3 ± 0.42) according to the below described methodologies.

Coconuts were from dwarf coconut palms (*Cocos nucifera*) originally from Espírito Santo State (Brazil), harvested after 7 month maturation.

Extracted coconut water was tested for *L. fructivorans*, *E. coli* and *S. cerevisiae* and no growth was detected.

3.2.2 MICROBIOLOGY METHODS

- ***Lactobacillus fructivorans***

Liquid media cultivation: Cultivation was performed in 150 mL MRS broth at 35 °C for 24 hours (static). The incubation time was determined in order to achieve stationary phase, where microorganisms present higher pressure resistance.

Solid media culture (count): All counts of *L. fructivorans* were made by successive dilution and pour-plating in MRS-agar. Plates incubation was carried out for 48 hours at 35 °C.

Glycerol preservation: After liquid media cultivation, inoculum content was centrifuged in 1mL aliquots, in eppendorfs, at 5478G (7000 rpm) for 15 min. The obtained pellet was washed with 0.85 % saline solution and resuspended in 1 mL MRS broth with 10 % glycerol and stored at -7° C.

- ***Saccharomyces cerevisiae:***

Liquid media cultivation: Cultivation was performed in 200mL BHI broth at 23°C for 72 hours (static). The incubation time was determined in order to achieve stationary phase, where microorganisms present higher pressure resistance.

Solid media culture (count): All counts of *S. cerevisiae* were made by successive dilution and spread-plating in MEA (malt extract agar). Plates incubation was carried out for 72 hours at 23°C.

Glycerol preservation: After performing liquid media cultivation, inoculum content was centrifuged in 1 mL aliquots, in eppendorfs, at 5478G (7000 rpm) for 15 min. The obtained pellet was washed with 0.85 % saline solution and resuspended in 1 mL BHI broth with 20 % glycerol and stored at -7 °C.

- ***Escherichia coli:***

Liquid media cultivation: Cultivation was performed in 150mL BHI broth at 35°C for 18 hours (static). The incubation time was determined in order to achieve stationary phase, where microorganisms present higher pressure resistance.

Solid media culture (count): All counts of *E. coli* were made by successive dilution and pour-plating in VRBGA. Plates incubation was carried out for 48 hours at 35°C.

Glycerol preservation: After performing liquid media cultivation, inoculum content was centrifuged in 1mL aliquots, in eppendorfs, at 5478G (7000 rpm) for 15 min.

The obtained pellet was washed with 0.85 % saline solution and resuspended in 1 mL BHI broth with 20 % glycerol and stored at -7 °C.

3.2.3 HIP EQUIPMENT AND PROCESSING CONDITIONS

HIP process was carried in 2L HIP equipment with temperature control and maximum operation pressure of 690MPa (Avure Technologies, UK). Water was used as pressure conducting media and compression was indirect, by fluid injection.

Coconut water inoculated with the 3 microorganisms, individually, was processed at 25 °C for 2 min at different pressure conditions (200, 300, 400 and 500 MPa). The duration of the process was defined as the interval in which pressure reached the desired pressure. That is, intervals of pressurization and depressurization are not considered as part of process duration. Intervals of pressurization can be found on the “Appendix II” section of this thesis. Depressurization intervals were negligible (in the order of 5 seconds).

For inoculation of coconut water, liquid culture was centrifuged at 5478G (7000 rpm) for 15 min, the pellet washed with PBS and resuspended in 50mL of coconut water. Different microorganisms were inoculated separately in different coconut water samples.

To test the microorganisms baroresistance, the whole liquid culture was centrifuged, washed and inoculated, to assure coconut water high initial count (From 10^8 to 10^{10} CFU/mL).

For the shelf life test, only a fraction of the liquid culture was centrifuged, washed and inoculated, in order to achieve a count in the order of 10^4 to 10^6 CFU/mL, aiming at simulating a more realistic contamination.

The shelf life samples were processed at 600 MPa for 3 min at 25 °C.

All processes and analysis were performed in duplicates and microorganism counts were carried out 24 hours after processing. In the meanwhile, samples were kept refrigerated at 7 °C.

An adiabatic heating of 3°C each 100MPa was considered in order to reach the desired temperature in the moment the chamber and samples achieved the programmed pressure.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

Figures 3.1, 3.2 and 3.3 present the results of high pressure processing of coconut water inoculated with *S. cerevisiae*, *L. fructivorans* and *E. coli*.

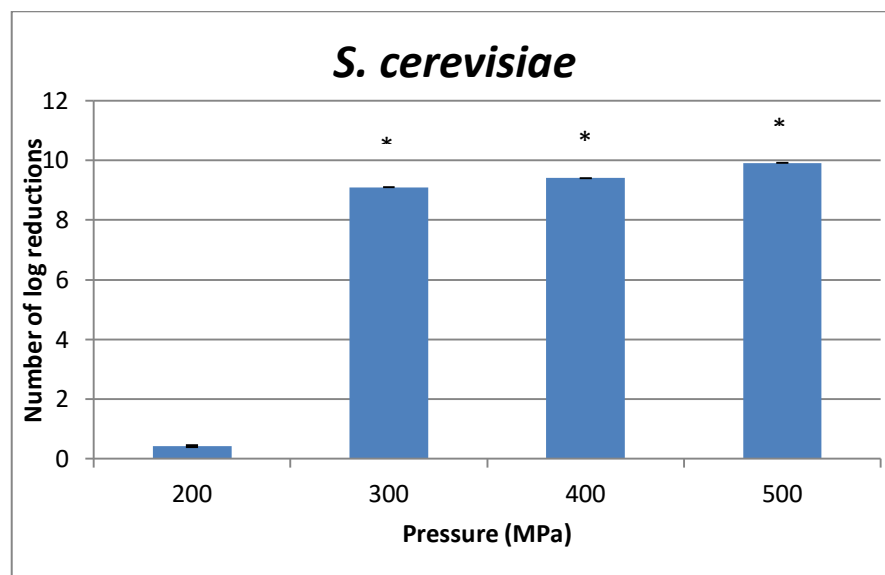


Figure 3.1. Log reduction of *S. cerevisiae* in coconut water in different pressure conditions for 2 min at 25 °C with corresponding error bars. (*) Count of processed samples below detection limit

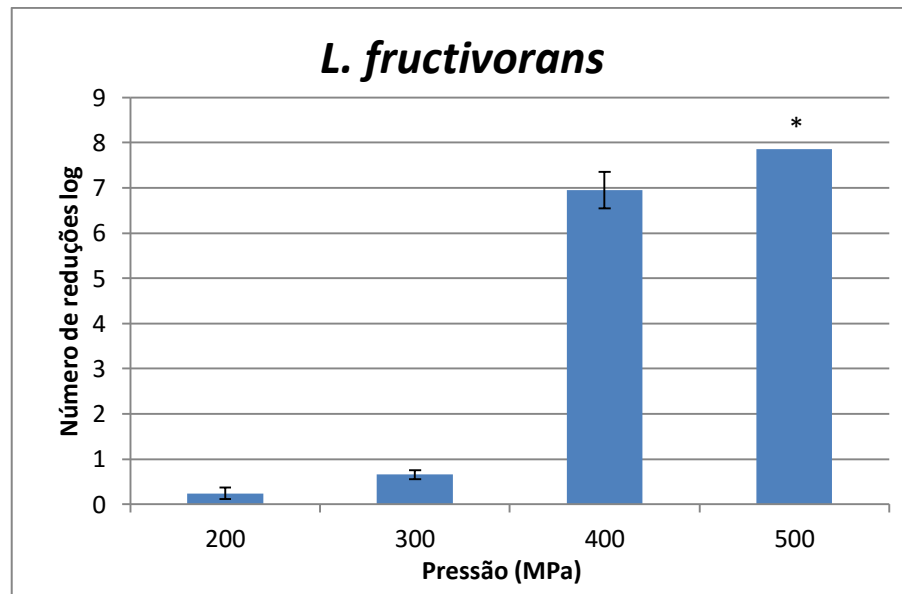


Figure 3.2. Log reduction of *L. fructivorans* in coconut water in different pressure conditions for 2 min at 25 °C. (*)Count of processed samples below detection limit

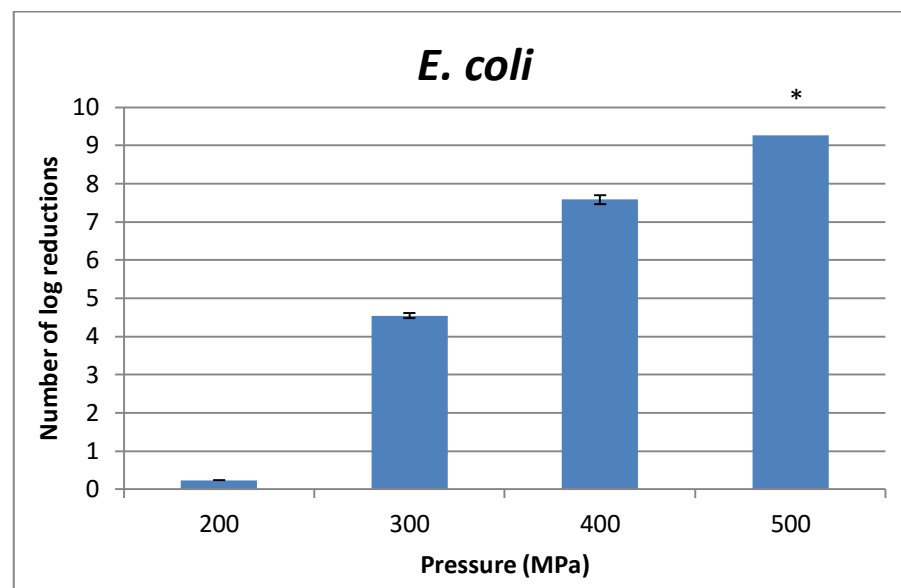


Figure 3.3. Log reduction of *E. coli* in coconut water in different pressure conditions for 2 min at 25 °C. (*)Count of processed samples below detection limit

Samples processed at 500MPa reached counts below detectable limit for the three studied microorganisms. For *S. cerevisiae*, pressures of 300, 400 and 500 MPa led to counts below detection limit (200 CFU/mL). This means that the number of log reduction illustrated for the three microorganisms at 500 MPa and the number of log reduction illustrated for *S. cerevisiae* at 300, 400 and 500 are merely the log of the count obtained for the inoculated sample, before processing. That is the reason why some of

the bars in the histograms of Figures 3.1, 3.2 and 3.3 have no error bars. In these cases, the error bars would not represent the reproducibility of the process, but the reproducibility of the inoculum.

The pressure inactivation of different microorganisms in coconut water show different inactivation responses, indicating distinct pressure resistances among microorganisms. From the three microorganisms, *S. cerevisiae* was the least resistant, showing the highest log reduction for all pressures applied. On the other hand, *L. fructivorans* was the most resistant of all 3 studied microorganisms, showing the lower log reduction for all pressures applied. These results are in accordance with other authors, showing that gram positive bacteria are more resistant to pressure than gram negative and that bacteria are generally more baroresistant than yeasts (CAMPOS et al., 2003; SMELT 1998)

The FDA juice guidelines states that a 5-log₁₀ CFU/mL reduction of pathogens must be achieved for a process to be approved (FDA, 2001). Considering the FDA regulation, only the processes at or above 500MPa (19°C, 2min) would be accepted, once they can reduce 5-log of pathogens (LUKAS, 2013).

It can be concluded from the previous results that *L. fructivorans*, *E. coli* and *S. cerevisiae* can be reduced in more than 7 log cycles in a 500 MPa process at 25 °C for 2 min, being, therefore, in accordance to the FDA guidelines.

Although processed samples from the 3 microorganisms showed no growth at 500MPa, a shelf life test was designed to assure no viable cells were left in a count below detection limit after processing of inoculated samples. Samples inoculated separately with *S. cerevisiae*, *L. fructivorans* and *E. coli* were processed at 500 MPa for 2 min at 25 °C were kept under refrigeration (7°C) and plated each 15 days to verify if growth of *S. cerevisiae*, *L. fructivorans* and *E. coli* was detected in their respective processed samples during refrigerated storage. On the 15th day of storage, the growth of the 3 microorganisms was detected in the respective processed samples.

Given the process of 500MPa at 25 °C for 2 min could not inactivate all cells in the inoculated samples, a second test was designed with different processing conditions (600 MPa for 3 min at 25 °C).

Figures 3.4, 3.5 and 3.6 show the counts of the 3 tested microorganisms in control samples and samples processed in the above mentioned conditions during refrigerated storage.

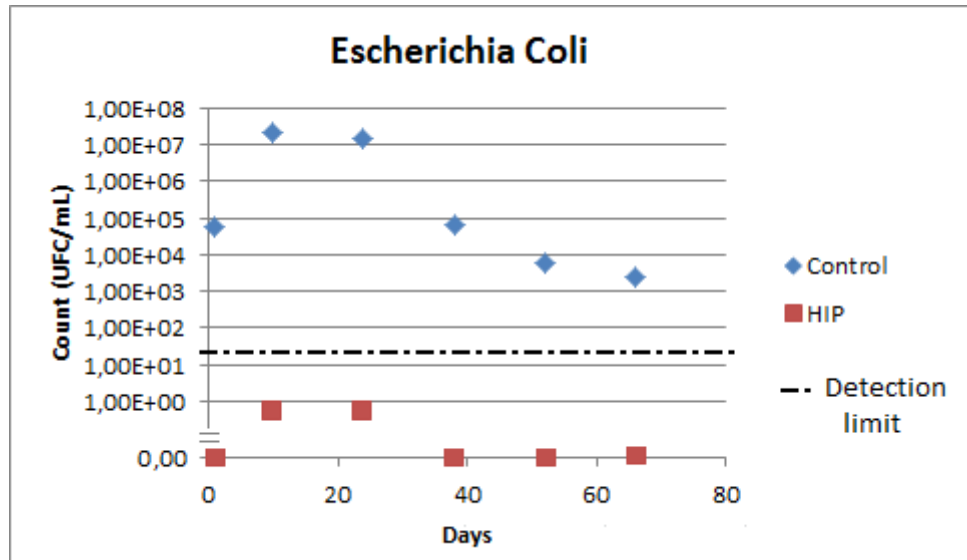


Figure 3.4. *E. coli* count (CFU/mL) of control and processed coconut water samples (600MPa/3 min/25C) evaluated during refrigerated shelf life (7°C) - (Detection limit = 30 CFU/mL)

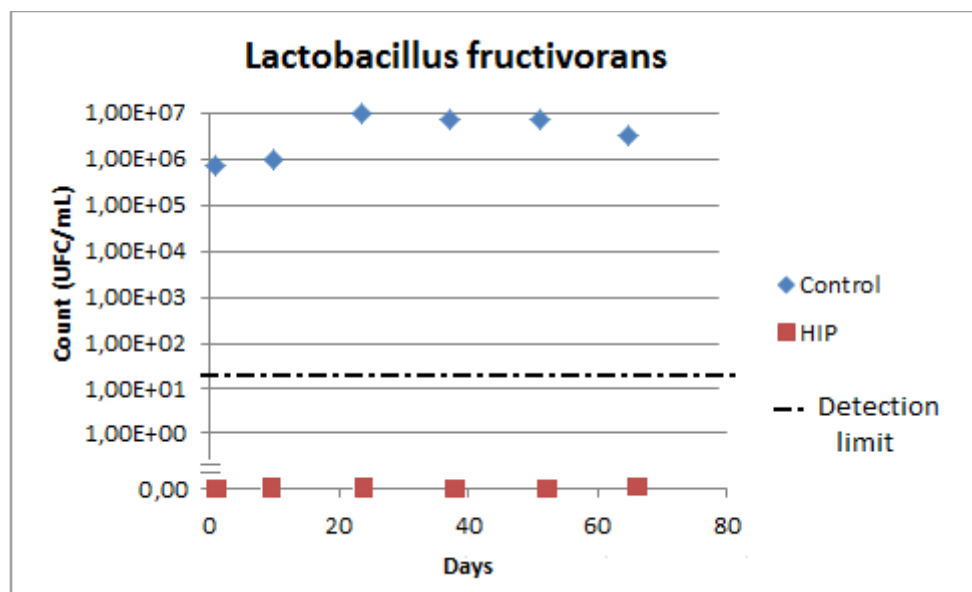


Figure 3.5. *L. fructivorans* count (CFU/mL) of control and processed coconut water samples (600MPa/3 min/25C) evaluated during refrigerated shelf life (7°C) - (Detection limit = 30 CFU/mL)

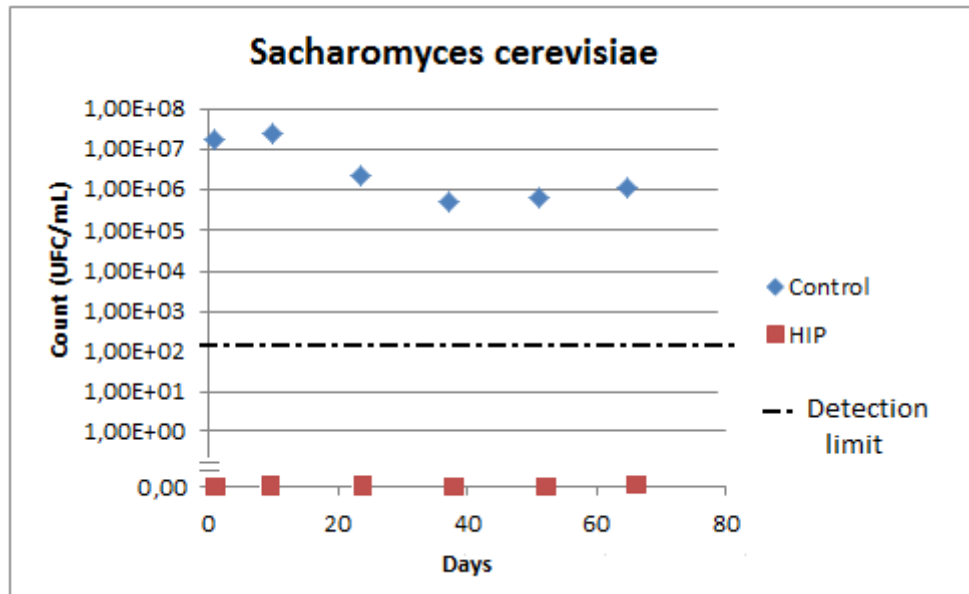


Figure 3.6. *S. cerevisiae* count (CFU/mL) of control and processed coconut water samples (600MPa/3 min/25°C) evaluated during refrigerated shelf life (7°C) - (Detection limit = 200 CFU/mL)

It can be observed from Figures 3.4, 3.5 and 3.6 that microorganism growth occurred only in control samples and not in the processed samples for 66 days. Counts of control samples were either zero or below the methods detection limit. This indicates the applied process (600 MPa/3 min/25 °C) can completely inactivate the 3 tested microorganisms without causing sub-lethal injuries from which microorganisms could recover during shelf life. Similar results were obtained by Lavinias et al. (2008), who observed that neither natural micropopulation growth nor *E. coli* repair was observed in post-processed (400 MPa for 3 min) cashew apple juice kept under refrigerated storage (at 4 °C). Also, Bull et al. (2004) found that HPP (600MPa, 20°C, 60sec) kept the microbial load of refrigerated-stored (4°C) orange juice below the limit of detection for at least 4 weeks.

It was also observed that the behaviour of the control samples differs from one microorganism to another. *E. coli* grew rapidly during the first 10 days, entered a short stationary phase for about 14 days and finally reached a death phase lasting for the final 42 days. *L. fructivorans* control curve described a 1-log growth in the first 24 days and stabilized in a stationary phase lasting for the last 42 days. *S. cerevisiae* showed a very

discrete growth in the first 10 days followed by considerable count reduction on the next 28 days and finally reached a stationary phase lasting for 28 days.

The distinct behaviour of the 3 microorganisms control samples can be attributed to differences in metabolism and replication velocities and microorganism resistance and ability to grow in low temperatures.

3.4 CONCLUSIONS

Results showed that different microorganisms react distinctly to the same HIP process. From the three microorganisms, *S. cerevisiae* was the least resistant, showing the highest log reduction for all processes applied in coconut water. On the other hand, *L. fructivorans* was the most resistant of all 3 studied microorganisms, showing the lower log reduction for all processes applied. These results are in accordance with other authors, showing that gram positive bacteria are more resistant to pressure than gram negative and that bacteria are generally more baroresistant than yeasts

It can be concluded from the previous results that *L. fructivorans*, *E. coli* and *S. cerevisiae* can be reduced in more than 7 log cycles in a 500 MPa process at 25 °C for 2 min.

Shelf life study did not show any growth of none of the studied microorganisms in processed samples (600 MPa, 25 °C, 3 min) when stored at 7 °C for 66 days, confirming no sub-lethal injuries were caused by the process.

3.5 REFERENCES

- ABE, F. (2007) Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. **Biosci Biotechnol Biochem** 71: 700151–7001511.
- ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; RAY, B. (2000) Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure sensitive strains of food-borne pathogens. **Int J Food Microbiol** 60: 33–42.
- ARAGAO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M. de O. Água-de-coco. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2001. 32p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 24)
- AUGUSTO, P.E.D.; TRIBST, A.A.L.; CRISTIANINI, M. Thermal Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a model liquid food - **Journal of Food Process Engineering**, v.34, p. 1013-1027 (2009)
- BARRAUD, C.C.; GAUBERT, A.; MASSON, P.; VIDAL, D. – Combined Effects of High Hydrostatic Pressure and Temperature for Inactivation of *Bacillus anthracis* Spores - **Applied and Environmental Microbiology**, Jan. 2004, p. 635–637
- BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S.; PIETTE, J.P.G. - High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice - **Innovative Food Science & Emerging Technologies** 3, p.233-231 (2002)
- BAYINDIRLI, A.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F.; HIZAL, M. - Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices - **Food Control** 17 (2006) 52–58
- BELTRÁN, J.G.; CÁNOVAS, G.V.B. - Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in Apple Juice by Ultraviolet Light - **Journal of Food Process Engineering** 28 (2005) 437–452
- BLACK, E.P.; KOZIOL-DUBE, K.; GUAN, D.; WEI, J.; SETLOW, B.; CORTEZZO, D.E.; HOOVER, D.G.; SETLOW, P. (2005) Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via

activation of nutrient receptors by high pressure. **Appl Environ Microbiol** 71: 5879–5887.

BULL, M. K.; ZERDIN, K. Z.; HOWE, E.; GOICOECHEA, D.; PARAMANANDHAN, P.; STOCKMAN, R.; SELLAHEWA, J.; SZABO, E. A.; JOHNSON, R. L.; STEWART, C.M. - The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 5 (2004) 135–149

CABRAL, L. M. C. Estabilização da água de coco verde por meio de filtração com membranas. - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Comunicado técnico 47** - ISSN 0103-5231 (2002). Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/estabilizacaodeaguadecoco_000fds_u6jvd02wx5eo0a2ndxyfl0r8fv.pdf

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L; CRISTIANINI, M. The use of High Pressure Teechnology in Food Processing - **Brazilian Journal of Food Technology** v.6, n.2, p. 351-357, 2003

CANOVAS, B.G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. - **Nonthermal Preservation of Foods**. 1.ed. New York: Marcel Decker, 1997. 276p.

CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; JUNIOR, G.A.M. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento - **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina v.27, n.3, p. 437-452 (2006)

CHOI, L. H., & NIELSEN, S. S. (2005). The effect of thermal and non-thermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability - **Journal of Food Quality**, v. 28, p. 13–29

CONSIDINE, K.M.; KELLY, A.L.; FITZGERLD, G.F.; HILL, C.; SLEATOR, R.D. High pressure processing: Effects on Microbial Food Safety and Food Quality – **FEMS Microbiol Lett**, v. 281, p. 1-9 (2008)

DAMAR, S. (Tese de Doutorado) **Processing of Coconut Water with High Pressure Carbon Dioxide Technology** – University of Florida (2006)

DOSUALDO, G.L. **Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na Redução da Carga Microbiana e da Atividade Enzimática da Água de Coco**,

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2007

FDA, 2001 - GUIDANCE FOR INDUSTRY: JUICE HACCP HAZARDS AND CONTROLS GUIDANCE FIRST EDITION; FINAL GUIDANCE -
[HTTP://WWW.FDA.GOV/FOOD/GUIDANCEREGULATION/GUIDANCEDOCUMENTSREGULATORYINFORMATION/JUICE/UCM072602.HTM](http://www.fda.gov/food/guidancerregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/juice/ucm072602.htm)

GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; COSTA, S.; MONFORT, J.M.; HUGAS, M - Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage – **Food Microbiology**, 2002, 19,509-518

HERNANDO S'AIZ, A., T'ARRAGO MINGO, S., PURROY BALDA, F., TONELLO SAMSON, C. 2008. Advances in design for successful commercialization of high pressure processing. **Food Australia** 60(4):154–156.

HITE, B.H. (1899) The Effect of Pressure in the Preservation of Milk - **West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin** 58, 15±35

HOGAN, E.; KELLY A. L.; SUN, D. W. (2005) High pressure Processing of foods: an overview. **Emerging Technologies for Food Processing** (Sun Da Wen, ed), pp. 3–31. Academic Press.

HORI, K., MATANABE, Y., KANEKO, M., SEKIMOTO, T., SUGIMOTO, Y., YAMANE, T. 1992. The development of high pressure process for food industries. In: **High Pressure and Biotechnology**, edited by Claude, B., Rikimaru, H., Karel, H., and Patrick, M. Colloque INSERM, Paris: John Libbey Eurotext Ltd., pp. 499–507.

LUKAS, A. R. (2013). **Use of High Pressure Processing to Reduce Foodborne Pathogens in Coconut Water**. Tese apresentada para a obtenção do título de mestre em ciência e tecnologia de alimentos do Instituto Politécnico e Universidade Estadual de Virginia.

MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. - Conservação de Água de Coco Verde por Filtração com Membrana - **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(1): 72-77, jan.-mar. 2005

MARTÍN, M. F.S.; CÁNOVAS, G. V. B.; SWANSON, B. G. (2002): Food Processing by High Hydrostatic

MATSER, A.M.; KREBBERS, B.; BERG, R.W.V.D; BARTELS, P.V. Advantages of High Pressure Sterilization on Quailty of Food Products - **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 79-85 (2004)

NOGUEIRA, A.L.C.; SOUZ, G.C.; ALVES, O.M.; DOMINGOS, M.S.C.; MARQUES, L.F.; COSTA, T.L.; PAIXÃO, F.J.R. Avaliação Sensorial de Água de Coco (*Cocos nucifera* L) *in natura* e processada - **Revista de Biologia e Ciências da Terra** v.4, n.2, 2º semestre, 2004

OLIVEIRA, H. J. S.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; CARDOSO, M. G.; TEIXEIRA, J. E. C.; GUIMARÃES, N. C. C. Carbohydrate measuvements on four brands of coconut water. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.27, n.5, p.1063- 1067, 2003.

PARISH, M.E. High Pressure Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, 18(1):57-65,1998.

PATTERSON MF (2005) A review: microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology** 98: 1400–1409.

M.F. SAN MARTÍN; G. V. BARBOSA-CÁNOVAS; B. G. SWANSON – Food Processing by High Hydrostatic Pressure, Critical Reviews **in Food Science and Nutrition**, 42:6, 627-645

RASTOGI, N. K; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D - Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods - **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47:69–112 (2007)

REDDY, K.V.; DAS, M.; DAS, S.K. - Nonthermal Sterilization of Green Coconut Water for Packaging - **Journal of Food Quality** 30 (2007) 466–480

ROBERTS, C.M.; HOOVER, D.G. - Sensitivity of *Bacillus Coagulans* Spores to Combinations of High Hydrostatic Pressure, Heat, Acidity and Nisin - **Journal of Applied Bacteriology** 1996, 81, 363-368

ROSA, M.F.; ABREU, F.A.P. Água de coco: métodos de conservação. Fortaleza: **Embrapa CNPAT/SEBRAE-CE**, 2000. 40p. (Documentos 37)

SILVA R.A., CAVALCANTE L.F., HOLANDA J.S., PEREIRA W.E., MOURA M.F., FERREIRA NETO M., Fruits quality of green dwarf coconut fertirrigation with nitrogen and potassium, *Rev. Bras. Frutic.* 28 (2006) 310–313

SMELT, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends Food Science and Technology** 9: 152–158.

TEREFE, N.S.; MATTHIES, K.; SIMONS, L.; VERSTEEG, C. - Combined high pressure-mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria × ananassa*) - **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 10 (2009) 297–307

TONELLO, C. (2011). Case Studies on High-Pressure Processing of Foods. **Nonthermal Processing Technologies for Food**.

TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial Opportunities and Research Challenges in the High Pressure Processing of Foods - **Journal of Food Engineering**, v.67, p. 95-112 (2005)

ULMER, H.M.; GANZLE, M.G.; VOGEL, R.F. Effects of High Pressure on Survival and Metabolic Activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460 - **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, N°9 p. 3966–3973 (2000)

ZIMMERMANN, M.; SCHAFFNER, D. W.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature - **LWT - Food Science and Technology** (2013) 1-6

CHAPTER 4

Sensory Analysis and Shelf Life Study of High Pressure Processed Coconut Water

Authors: Elisa Barison Gragnani^a, Marcelo Cristianini^{a*}

Affiliations:

a Department of Food Technology (DTA), School of Food Engineering (FEA), University of Campinas (UNICAMP), Monteiro Lobato, 80. PO Box 6121, 13083–862, Campinas, S.P. Brazil.

*Author for Correspondence. Address Monteiro Lobato, 80, School of Food Engineering, University of Campinas, Postal code: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil, Phone: +55 19 3521-7592; fax +55 19 3521-4008

E-mail: olecram@unicamp.br

Article to be submitted to the *Innovative Food Science and Emerging Technologies*

ABSTRACT

Coconut water has been showing increasing market demand due to its natural isotonic properties. Industrialization of coconut water relies nowadays on thermal processing methods. Although these methods are known for their effectiveness on inactivation of enzymes and microorganisms, they induce the loss of nutrients and sensory properties of foods, especially thermal sensitive foods, which is the case of coconut water. Therefore, research and application of non-thermal processing technologies has been made in order to improve this product's quality. One of the current studied non-thermal processing technology is high isostatic pressure processing (HIP), which is based on product pressurization in a fluid-filled chamber. Inside the chamber, pressure may be elevated either by fluid injection or reduction of the chamber volume by a piston. Sensory analysis and shelf life tests were performed in order to investigate effects and potential of HIP technology for processing of coconut water. Coconut water was processed at 600MPa, 25°C, 3 min and compared to control samples. Results showed consumers were unable to distinguish control and processed samples in terms of flavour, appearance, aroma, consistency, sweetness and global acceptance and that microbial growth occurred in control samples but not on processed samples during 66 day refrigerated storage, at 7°C. From a safety perspective, coconut water processed at 600 MPa for 3 min at 25 °C and stored at 7 °C achieved satisfactory results for the whole tested shelf life (66 days).

Keywords: Coconut water; High pressure; Sensory Analysis; Shelf Life .

RESUMO

A água de coco é uma bebida isotônica natural que tem apresentado relevante e crescente demanda no mercado. A água de coco é atualmente processada por meio de processos térmicos, que, apesar de serem capazes de inativar enzimas e microrganismos, provocam efeitos deletérios nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos especialmente dos alimentos termosensíveis – que é o caso da água de coco. Desta forma, é necessário buscar novos métodos de processamento da água de coco a fim de aumentar a qualidade deste produto. O processamento por alta pressão isostática (HIP) é um método de grande potencial para o caso de alimentos termosensíveis e consiste em colocar o alimento em uma câmara cuja pressão é elevada até o nível desejado por injeção de fluido ou compressão da câmara por ação de um pistão. Neste estudo foram realizados testes de análise sensorial e vida de prateleira para investigar os efeitos e potencialidades do processamento de água de coco por tecnologia HIP. Os resultados mostram que os consumidores não foram capazes de distinguir entre a água de coco controle e processada em termos de sabor, aroma, aparência, consistência e aceitação global e que durante a vida de prateleira de 66 dias sob refrigeração (7°C) não foi observado crescimento microbiano nas amostras processadas enquanto a contagem foi expressiva nas amostras controle.

Palavras-Chave: Água de coco; Alta pressão; Análise Sensorial; Vida de Prateleira.

4.1 INTRODUCTION

Coconut water (CW) is a natural isotonic beverage composed mainly of sugars and minerals. CW national and international demand has been growing rapidly, especially in the sector of isotonic beverages (ARAGÃO et al., 2001, DATAMARK, 2015).

Currently, CW undergoes thermal processes in industries in order to extend shelf-life. However, it is known that the enzymatic and microbiological stability achieved by thermal processes is accompanied by alteration of sensory and nutritional qualities of CW (CAMPOS et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2005).

Considering nutritional and sensory losses induced by thermal processes and that market trends are heading in the direction of minimally processed and natural products, non-thermal process technologies have been growing rapidly (WEEMAES et al., 1998; CAMPOS et al., 2003). New processing methods that are not based on heat are especially interesting options for processing of thermo-sensitive products.

High Isostatic Pressure (HIP) processing is a non-thermal process which consists in placing the product in a fluid-filled chamber whose pressure is elevated either by fluid injection or reduction of the chamber volume by a piston and is capable of inactivating microorganisms causing minimum alteration on flavour, aroma and nutritional value (CAMPOS et al., 2003).

HIP Processing can be a very good option for processing of fruit products such as juices and purees due to the presence of sugars that might undergo caramelization and Maillard reaction during thermal processing (DOSUALDO, 2007)

Sensory analysis studies have shown that high pressure process products frequently are indistinguishable from the fresh, non-processed product (TORRES et al., 2004). Shellhammer et al. (2003) examined chemical and sensory changes in pressure-pasteurized apple and pulp-free orange juice and observed no significant differences between pressure-treated and control samples. Palou et al. (2000) studied the effect of HIP on guacamole and concluded sensory acceptability and colour of HIP guacamole were not significantly different ($P=0.05$) from that of guacamole controls.

Besides the effects of the HIP technology, it is important to investigate the shelf life of the processed products given the final goal of industrial processing of food is to extend shelf life. WU et al. (2003) studied the effect of HIP processing on cloudy pomegranate juice and shelf life of HIP and HTST processed samples. During the storage at 4 °C, both HIP and HTST treatment guaranteed microbiological safety, but in general,

HIP treatment preserved the nutrient composition better. Effectiveness of HIP processing to guarantee microbiological stability was also confirmed by LAVINAS et al. (2008), that observed no microorganism growth in 8 week refrigerated storage of HIP processed cashew apple juice (400 MPa for 3 min).

Considering the potential of HIP for processing of thermo-sensitive products, such as CW, the present paper investigates the effect of HIP technology on sensory properties and shelf life of coconut water.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 HIP EQUIPMENT

HIP process was carried in 2L HIP equipment with temperature control and maximum operation pressure of 690 MPa (Avure Technologies, UK). Water was used as pressure conducting media and compression was indirect, by fluid injection.

For both shelf-life and sensory analysis tests, coconut water was processed at 600 MPa for 3 min at 25 °C.

An adiabatic heating of 3°C each 100MPa was considered in order to reach the desired temperature in the moment the chamber and samples achieved the programmed pressure.

4.2.2 COCONUT WATER SAMPLES AND PROCESS CONDITIONS

For the sensory test, 20 coconuts with 7-month maturation originated from the Espírito Santo state of Brazil were washed with water to remove gross contaminants and then sprayed with a 70% w/v aqueous ethanol solution until completely covered by the ethanol in a biological safety cabinet and allowed to dry under UV-light for 15 min. A hole was bored into the center of the stem scar of the coconut with a sterile metal coconut opener) and coconut water drained into a sterile beaker. Half of the obtained volume was distributed in 1L aliquots in vacuum sealed flexible plastic bags (LDPE-Nylon-LDPE, 16 µm thickness- TecMaq, Brasil) to be processed (600 MPa, 25 °C, 3 min). The unprocessed volume was kept at refrigerated temperature (7 °C) in the same package used for HPP processing and used as control sample. The sensory test was performed on the same day coconut was extracted and processed. The flexible plastic bags used for samples storage and processing were sanitized with ethanol (99.8% purity).

For the shelf life test 6 coconuts with 7-month maturation originated from the Espírito Santo state of Brazil were washed with water to remove gross contaminants. A hole was bored into the center of the stem scar of the coconut with a metal coconut opener) and coconut water drained into a beaker. Half of the samples were processed

(600 MPa, 25 °C, 3 min) and the rest kept as control samples. Both processed and control samples were stored under refrigeration (7 °C). The duration of the process was defined as the interval where pressure reached the desired pressure. That is, intervals of pressurization and depressurization are not considered as part of process duration. Intervals of pressurization can be found on the “Appendix II” section of this thesis. Depressurization intervals were negligible (in the order of 5 seconds).

The obtained coconut water blends (sensory/shelf life test) were characterized by measurement of pH ($5,0 \pm 0,05$), total soluble solids content ($5,3 \pm 0,03$ °B) and total titratable acidity ($5,5 \pm 0,2$) according to the below described methodologies.

Coconuts were from dwarf coconut palms (*Cocos nucifera*) originally from Espírito Santo State (Brazil) harvested after 7 month maturation.

An adiabatic heating of 3°C each 100MPa was considered in order to reach the desired temperature in the moment the chamber and samples achieved the programmed pressure.

The duration of the process was defined as the interval where pressure reached the desired pressure. That is, intervals of pressurization and depressurization are not considered as part of process duration. Intervals of pressurization can be found on the “Appendix II” section of this thesis. Depressurization intervals were negligible (in the order of 5 seconds).

4.2.3 SENSORY ANALYSIS

Samples were organized in balanced complete blocks and served at room temperature in 30 mL portions in plastic cups coded with 3 random digits. Panellists had water on their disposal at all times to drink between samples. The test was performed in individual cabins.

120 panellists were asked to mark their perception about the samples regarding appearance, aroma, flavour, consistency, sweetness and global impression on 9 cm hedonic scales correspondent to each attribute.

A copy of the form handed to the panellists to perform the sensory analysis can be found attached at the end of this thesis, in the section “Appendix I”.

This project was approved by the ethics committee of the School of Medicine (UNICAMP) – Number 794.065 (18/09/2014).

4.2.4 SHELF LIFE

Shelf life was evaluated for a 66 day period. Each 10-14 days, control and processed samples were tested for coliforms, moulds and yeasts, total aerobic mesophilic plate count, pH, total soluble solids (°B) and total titratable acidity according to the methods described next. Sample processing was performed in duplicates and analysis in triplicates.

4.2.5 PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS

pH: A.O.A.C. no 42.1.04 Official Method no 981.12 (1997).

Total Soluble Solids(°B): A.O.A.C. no 37.1.12 Official Method no 920.151 (1997).

Total titratable acidity: A.O.A.C. no 37.1.37 Official Method no 942.15 (1997).

4.2.6 MICROBIOLOGY METHODS

- ***Microorganism counts:***

Yeasts and molds: Analysis of yeasts and moulds was performed by spread-plate of samples in different dilutions in PDA (potato dextrose ágar) with pH 3.5 (correction made by addition of 10% tartaric acid), according to Normative Instruction nº 62 of august 26th, 2003 (BRASIL, 2003).

Total aerobic mesophilic plate count: Coconut water samples in different dilutions were spread-plated in PCA (plate count ágar) and incubated at 35°C for 48 hours, according to Normative Instruction nº 62 of august 26th, 2003 (BRASIL, 2003).

Coliforms: Total coliform and thermotolerant coliform counts were accessed by the MPN technique (most probable number) according to Normative Instruction n° 62 of august 26th, 2003 (BRASIL, 2003).

4.2.7 STATISTIC ANALYSIS

To evaluate statistical differences among average values obtained for the evaluated sensory parameters, student t-test was applied considering $\alpha=0,01$.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 SENSORY ANALYSIS

Figure 4.1 shows the average grade given by panellists to the attributes appearance, aroma, flavour, consistency, sweetness and global aspect of HIP processed and control coconut samples.

From the Student's t-test, it can be concluded there are no statistic differences between control and HIP processed samples regarding the analysed sensory properties (appearance, aroma, flavour, consistency, sweetness and global aspect).

Sensory studies comparing acceptance of freshly extracted and commercial brands of processed coconut water revealed thermally processed coconut water available today is much inferior in sensory terms than freshly extracted coconut water (NOGUEIRA et al. 2004). Therefore, HIP technology has showed to have a high potential for coconut water processing.

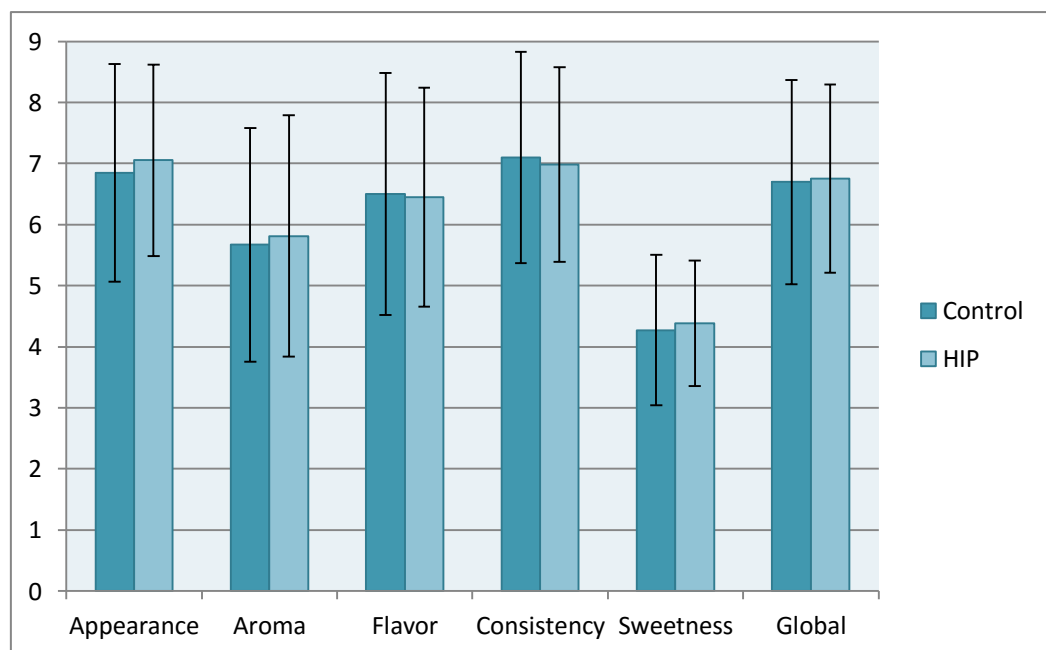


Figure 4.1. Average grade given by testers in a 0-9 scale regarding different attributes of coconut water control and HIP processed (600MPa, 3min, 25°C) samples.

A similar result was obtained by Laboissière et al. (2007) when investigating the effects of HIP process on passion fruit juice. The author observed that a trained panel was able to distinguish HIP processed (300MPa, 5 min, 25°C) and control samples.

However, the sensory profile of HIP processed samples was much closer to the fresh juice than thermally processed juice.

It is generally assumed that the fresh flavour of fruits and vegetables is not altered by high-pressure processing, since the structure of small molecular flavour compounds is not directly affected by high pressure. However, it is important to state that, as HIP processing can enhance and/or retard enzymatic and chemical reactions, it could indirectly lead to flavour alterations (OEYA, 2008).

Fernández García (2001) and Parish (1998) showed that the flavour of HIP processed (room temperature, 500-800 MPa, 1.5-5 min) orange juice was not as fresh as the flavour of untreated orange juice (FERNÁNDEZ GARCÍA et al., 2001; PARISH, 1998). Nevertheless, the taste of HIP processed orange juice was judged better than traditional heat pasteurized orange juice (PARISH, 1998; POLYDERA et al. 2005).

Results obtained in this work for sensory characteristics of coconut water processed by HIP show that the technology is suitable once it maintained the same characteristics of the fresh when analysed by the consumers.

4.3.2 SHELF LIFE

Figure 4.2 shows the measurements of total titratable acidity in control and HIP processed samples during shelf life.

Total titratable acidity on control samples increased until the 38th day, remaining stable from the 38th day until the end of shelf life test. During the same period, processed samples showed no alterations in acidity. The acidity curve described by control samples is similar to a traditional microorganism growth curve, indicating microorganism growth occurred in control, but not in processed samples.

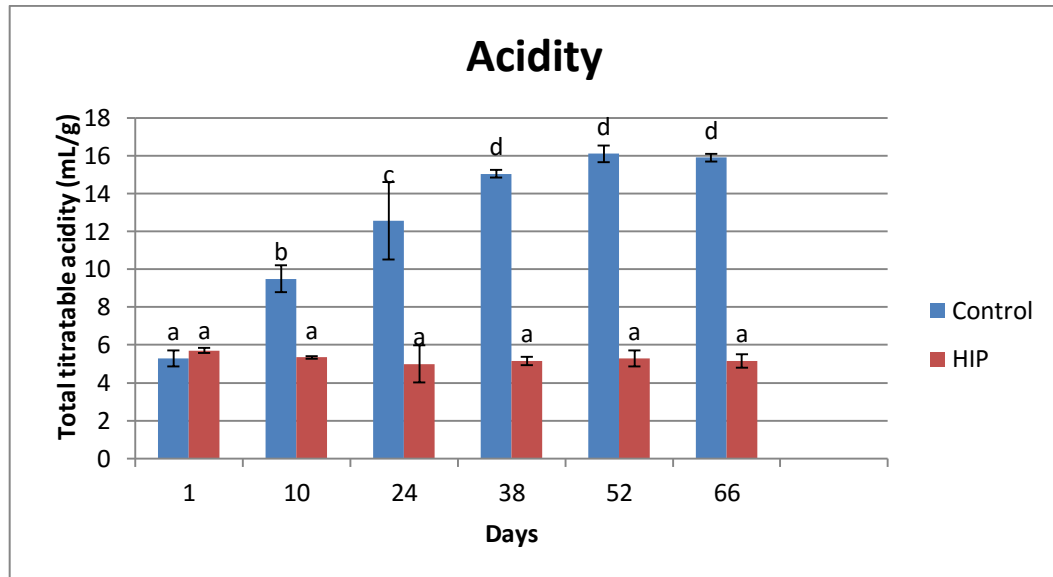


Figure 4.2. Acidity of control and HIP processed samples (600MPa, 25°C, 3min) during refrigerated shelf life (7°C).

Although results show increase in acidity of control samples during shelf life (Figure 4.2), pH was not affected to the same extent (Figure 4.3). Probably, the increase in acidity occurred as a consequence of weak acids production (organic acids) by microorganisms, which do not alter pH significantly and could promote a buffering effect.

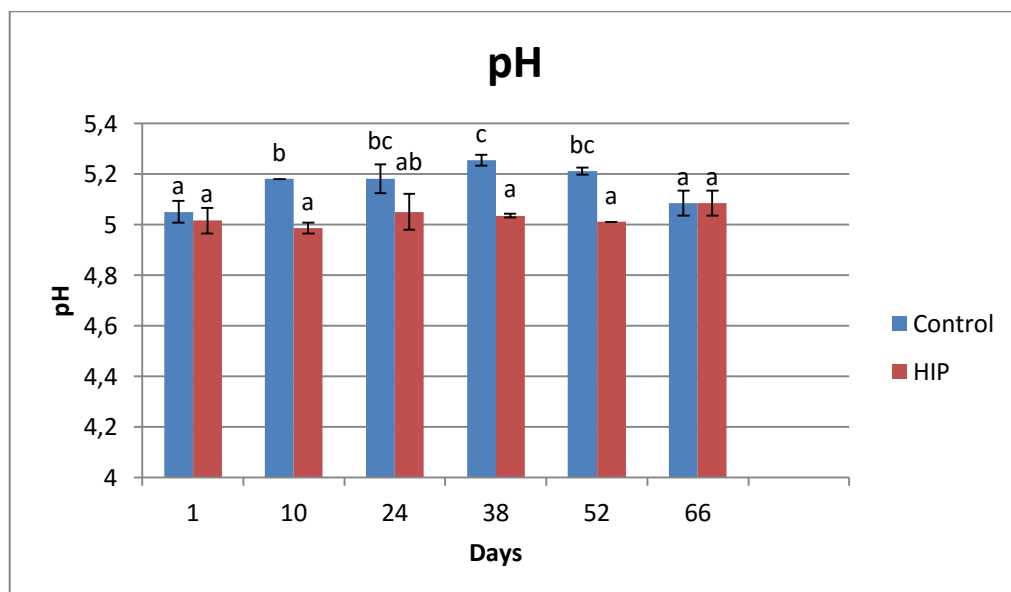


Figure 4.3. pH of control and HIP processed samples (600MPa, 25°C, 3min) during refrigerated shelf life (7°C).

Another physico-chemical parameter that was affected by microorganism growth during shelf life was total soluble solids content (°B). It can be observed from Figure 4.4 that control samples showed gradual reduction of soluble solids content during shelf life due to sugar consumption by microorganisms. At the same time, processed samples showed no soluble solids content reduction, once no microbial growth occurred in these samples.

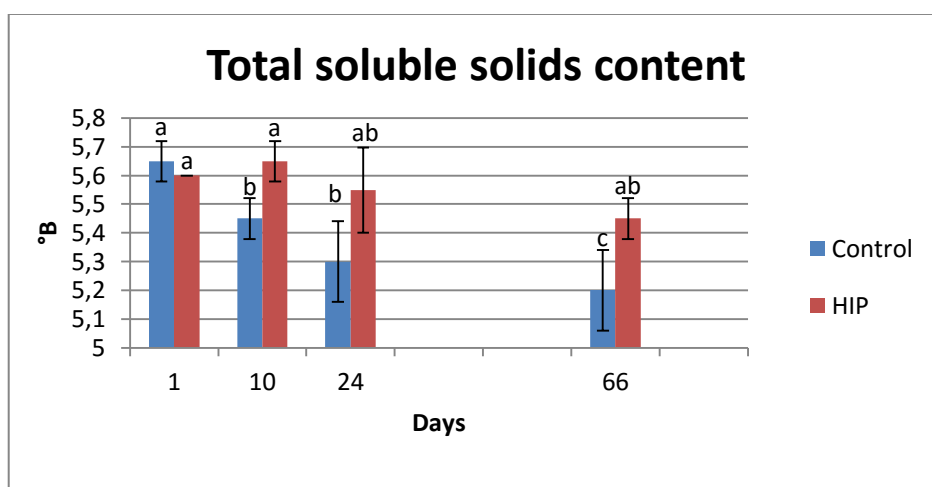


Figure 4.4. Total soluble solids of control and HIP processed samples (600MPa, 25°C, 3min) during refrigerated shelf life (7°C).

Regarding the behaviour of physico-chemical parameters of HIP processed samples, similar results were obtained by Varela-Santos et al. (2012), that observed no alteration of pH, total soluble solids content and acidity during 35-day refrigerated (4°C) shelf life of HIP processed pomegranate juice.

Except for pH, all the physico-chemical data measured during shelf life indicated microorganism growth on control samples but not on processed samples. This indication of microbial growth on control samples is confirmed by further microbiological analysis.

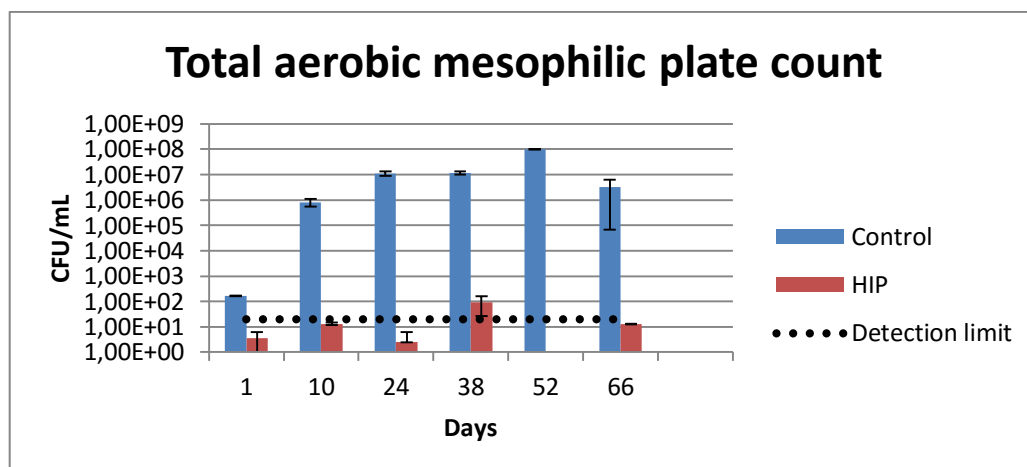


Figure 4.5. Microorganism total aerobic mesophilic plate count of control and HIP processed samples (600MPa, 25°C, 3min) during refrigerated shelf life (7°C) - (Detection limit = 30 CFU/mL)

Figure 4.5 shows total microorganism count during shelf life on both HIP processed and control samples. Total aerobic mesophilic plate count of control samples increased rapidly during the first 24 days and then stabilized in a 10⁷ CFU/ml average, while in HIP processed samples the total count remained stable during the whole shelf life period. The low total aerobic mesophilic plate count observed in processed samples is below the methods detection limit (30 CFU/mL) and could be due to contamination during analysis or to resistant microorganism populations that are unable to grow in storage conditions, given no increase in count was observed during shelf life.

Varela-Santos (2007) studied the shelf life of HIP processed pomegranate juice and observed that in pressurized samples at or above 350 MPa for 150 s, aerobic mesophilic bacteria count remained below the detection limit.

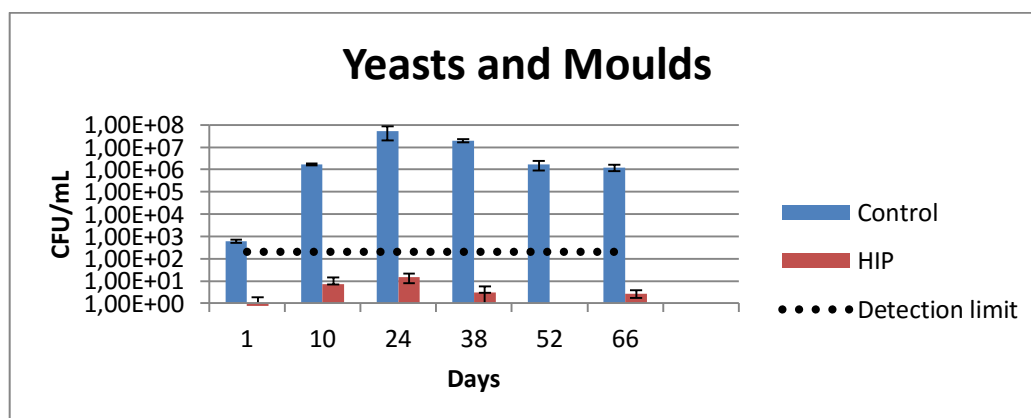


Figure 4.6. Yeasts and moulds count of control and HIP processed samples (600MPa, 25°C, 3min) during refrigerated shelf life (7°C) - (Detection limit = 200 CFU/mL)

Figure 4.6 illustrates the results for yeasts and mould count during shelf life. It can be observed yeasts and moulds count of control samples showed growth until the 24th day, followed by a death phase while yeasts and moulds count of HIP processed samples remained below the detection limit and stable, indicating possible contamination during analysis or presence of a resistant population that is unable to grow in storage conditions.

Similarly, Varela-Santos (2007) observed moulds and yeasts were not detected in pomegranate juice after pressure treatment at or above 350 MPa for 150 s, and survivors were kept below the detection limit throughout the cold storage period.

Yeast and moulds counts are very close to total microorganism count in all points, indicating they are the predominant class of microorganisms that grows in coconut water under the tested storage conditions.

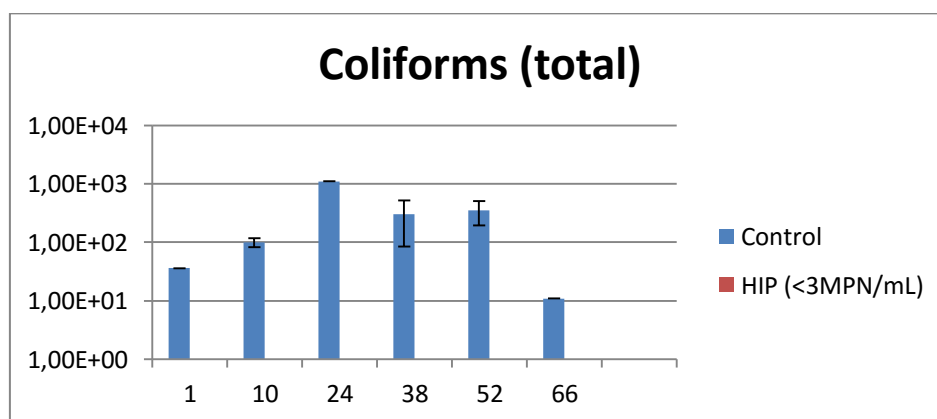


Figure 4.7. Coliforms total count of control and HIP processed samples (600MPa, 25°C, 3min) during refrigerated shelf life (7°C).

Figure 4.7 shows the results of total coliforms MPN (most probable number) during shelf life for control and HIP processed samples, even though MPN for processed samples was zero during all tested shelf life. On control samples, however, an increase of MPN is observed until the 24th day, from when a death phase can be observed, until the 66th day, on the end of the tested shelf life.

Counts of thermotolerant coliforms were zero on both control and processed samples during shelf life.

Comparable microbiology results were obtained by Lavinas et al. (2008), that did not observe growth of microorganisms (below detection limit) in cashew apple juice treated with HIP at 350 MPa for 7 min or 400 MPa for 3 min and stored at 4 °C for 8 weeks.

4.4 CONCLUSIONS

As consumers were unable to distinguish control and processed samples, HIP technology was shown to be adequate for the processing of coconut water from a sensory perspective, considering the studied parameters.

From a safety perspective, coconut water processed at 600 MPa for 3 min at 25 °C and stored at 7 °C achieved satisfactory results for the whole tested shelf life (66 days).

4.5 REFERENCES

- ARAGAO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M. de O. Água-de-coco. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 32p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 24)
- CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L; CRISTIANINI, M. The use of High Pressure Technology in Food Processing - Brazilian Journal of Food Technology v.6, n.2, p. 351-357, 2003
- DOSUALDO, G.L. Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na Redução da Carga Microbiana e da Atividade Enzimática da Água de Coco, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2007
- Ferna´ndez Garcí´a, A., Butz, P., Bogna`r, A., & Tauscher, B. (2001a). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orangeelemonecarrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. European of Food Research and Technology, 213, 290e296.
- HARMLESS HARVEST <http://www.harmlessharvest.com/original#pink>
- OEYA, I; LILLEB, M.; VAN LOEYA, A.; HENDRICKX, M. - Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review - Trends in Food Science & Technology 19 (2008) 320-328
- LABOISSIÈRE, L.H.E.S.; DELIZA, R.; BARROS-MARCELLINI, A.M.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L.M.A.Q.; JUNQUEIRA, R.G. - Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice - Innovative Food Science and Emerging Technologies 8 (2007) 469-477
- LAVINAS, F.C.; MIGUEL, M.A.L.; LOPES, M.L.M.; VALENTE MESQUITA - Effect of High Hydrostatic Pressure on Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.) Juice Preservation- JOURNAL OF FOOD SCIENCE Vol. 73, No. 6, 2008
- MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. - Conservação de Água de Coco Verde por Filtração com Membrana - Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(1): 72-77, jan.-mar. 2005
- NOGUEIRA, A. L. C.; SOUZA, G. C.; ALVES, O. M. B.; DOMINGOS, M. S. C.; MARQUES, L. F.; COSTA, T. L.; PAIXÃO, F. J. R. - Avaliação sensorial de água de coco (*Cocos nucifera* L) in natura e processada - Revista de Biologia e Ciências da Terra – Vol. 4- No 2 (2004)
- OLIVEIRA, H. J. S.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; CARDOSO, M. G.; TEIXEIRA, J. E. C.; GUIMARÃES, N. C. C. Carbohydrate measuvements on four brands of coconut water. Ciênc. agrotec., Lavras, v.27, n.5, p.1063- 1067, 2003.

PALOU, E.; SALGADO, C.H.; MALO, A.L.; CANOVAS, G.V.B.; SWANSON, B.G.; CHANES, J.W. - High pressure-processed guacamole - Innovative Food Science & Emerging Technologies 1 (2000). 69 -75

PARISH, M. E. (1998). Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft und e Technologie*, 31, 439e442.

POLYDERA, A. C., STOFOROS, N. G., & TAOUKIS, P. S. (2005). Quality degradation kinetics of pasteurized and high pressure processed fresh Navel orange juice: nutritional parameters and shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 1e9.

ROSA, M.F.; ABREU, F.A.P. Água de coco: métodos de conservação. Fortaleza: Embrapa CNPAT/SEBRAE-CE, 2000. 40p. (Documentos 37)

SHELLHAMMER, T. H., ALEMAN, G. D., MCDANIEL, M. R., & TORRES, J. A. (2003). A comparison of the sensory and chemical properties of orange and apple juices treated with and without high pressure - In IFT Annual Meeting, Chicago, IL.

TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial Opportunities and Research Challenges in the High Pressure Processing of Foods - *Journal of Food Engineering*, v.67, p. 95-112 (2004)

WEEMAES, C.; LUDIKHUYZE, L.; BROECK, I.V.D.; HENDRICKX, M. High pressure Inactivation of Polyphenoloxidases - *Journal of Food Science* v.63, n.5, 1998

WU, J.; LIAO, X.; HU, X.; PANG, X.; QIN, Z.; GUO, X.; XI, H.; CHEN, D. - Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time - *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19 (2013) 85-94

DISCUSSÃO GERAL

Quanto aos efeitos da tecnologia de alta pressão isostática (HIP – High Isostatic Pressure) na enzima POD (peroxidase), observou-se efeito positivo das três variáveis testadas (pressão tempo e temperatura) na atividade relativa da POD 0h após processamento, o que significa que quanto maior o tempo, pressão e temperatura de processo, maior a ativação da POD. Entre os pontos experimentais, a maior ativação de POD (164%) foi atingida na condição $P=499$ MPa, $T=52,59$ °C e $t= 24,5$ min e a maior inativação (92,45%) na condição $P=350$ MPa, $T=42.5$ °C e $t=3$ min. Imediatamente após o processamento (0h), as variáveis do modelo construído com maiores efeitos na atividade relativa da POD são a temperatura, pressão e tempo, nesta ordem.

Após 24h de estocagem (7°C) do produto processado, o novo modelo construído não apresentou grandes alterações em comparação com o modelo de 0h, indicando que os efeitos do processamento não foram reversíveis dentro de 24h.

Geralmente, a pressão resulta em inativação enzimática. Contudo, exemplos de ativação tem sido descritos na literatura e atribuídos a dois fenômenos: Transição de forma latente para forma ativa ou danos à membrana do tecido vegetal induzidos por pressão, no caso do processamento de vegetais inteiros.

Os efeitos lineares de pressão, tempo e temperatura se apresentaram entre os 4 maiores efeitos nos três modelos construídos (0, 24 e 48h), indicando que não só são os efeitos mais relevantes para a atividade relativa de POD, mas também que não são tempo-reversíveis em até 48h de estocagem a 7°C.

Também é interessante observar que o efeito de primeira ordem da pressão aumenta com o tempo de estocagem, assumindo os valores 14.2 ; 20.4 e 27.1 nos tempos 0, 24 e 48h, respectivamente.

Quanto aos efeitos da tecnologia HIP na atividade relativa da PPO, também foram obtidos efeitos positivos para todas as variáveis. No caso da PPO, efeitos de segunda ordem apresentam valores maiores que no caso da POD, resultando em superfícies mais complexas. Devido a reações secundárias em que as quinonas participam, formando cadeias poliméricas complexas, a metodologia para medição da atividade da PPO é desafiadora. Além disso, outras enzimas com propriedades semelhantes e a ocorrência de isoenzimas podem interferir com a metodologia. Esta situação pode justificar o R^2

baixo obtido no modelo de 0h da PPO, implicando em baixa preditibilidade do modelo obtido.

Apesar de terem sido identificados efeitos positivos das variáveis estudadas na atividade relativa da PPO imediatamente após processamento (0h), os modelos obtidos para 24h e 48h de estocagem não apresentam efeito da pressão na atividade relativa da PPO, indicando reversibilidade dos efeitos da pressão na atividade relativa da PPO dentro de 24 horas nas condições de estocagem.

A aplicação de tecnologia de alta pressão a diferentes microrganismos em água de coco apontou diferentes respostas de inativação, indicando que a resistência à pressão é particular de cada microrganismo. Entre os três microrganismos estudados, a *S. cerevisiae* foi o menos resistente, apresentando a maior redução de contagem em todas as condições testadas. Em comparação, o *L. fructivorans* foi o mais resistente dos três microrganismos estudados, apresentando as menores reduções de contagem em todas as condições testadas.

Apesar do processamento a 500 MPa a 25 °C por 2 min ter reduzido a contagem a zero, o teste de estocagem refrigerada (7 °C) para esta condição apontou crescimento dos três microrganismos em suas respectivas amostras no 15º dia de estocagem. Em um segundo ensaio (600 MPa, 3 min, 25 °C) não foi observado crescimento dos microrganismos inoculados após processamento por todo o tempo de estocagem (66 dias). Com isso, conclui-se que a condição de 600MPa a 25°C por 3 min é capaz de inativar completamente os microrganismos estudados sem causar injúrias subletais das quais os microrganismos podem se recuperar nas condições de estocagem.

Em relação aos efeitos da tecnologia HIP nas propriedades organolépticas do produto, os resultados não apontam diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros sensoriais testados, indicando que o processo de alta pressão isostática, nas condições estudadas (600 MPa, 25 °C, 3 min), preserva as propriedades sensoriais da água de coco. Com isso, do ponto de vista sensorial, a tecnologia HIP pode ser considerada adequada para o processamento de água de coco.

Durante o ensaio de vida de prateleira das amostras processadas (600 MPa, 25 °C, 3 min) e respectivos controles, observou-se redução de sólidos solúveis e aumento de acidez somente nas amostras controle.

Tais alterações físico-químicas podem ser atribuídas ao desenvolvimento de microrganismos. Foi observado aumento da contagem total, de bolores e leveduras e de coliformes totais somente nas amostras controle. As amostras processadas permaneceram com contagens abaixo do limite de detecção por todo o período analisado (66 dias)

A contagem de bolores e leveduras permaneceu sempre próxima à contagem total, indicando que são a classe de microrganismo predominante que se desenvolveu nas amostras controle durante o ensaio de vida de prateleira.

A contagem de coliformes termo-tolerantes foi zero tanto nas amostras controle quanto nas processadas durante todo o período de testes.

CONCLUSÃO GERAL

Do ponto de vista microbiológico e de segurança, a tecnologia de alta pressão isostática aplicada à água de coco apresentou bons resultados, reduzindo mais de 7 ciclos logarítmicos dos três microrganismos testados na condição de 500MPa a 25°C por 2 minutos. Além disso, não foi detectado crescimento dos microrganismos inativados durante estocagem, indicando ausência de injúrias subletais. Na avaliação de vida de prateleira (600 MPa a 25°C por 3 min) com estocagem a 7 °C por 66 dias, resultados satisfatórios foram obtidos, com a qualidade do produto por todo o período testado.

Além de atingir padrões de qualidade microbiológica e segurança aceitáveis, a água de coco processada obteve resultados positivos em teste de aceitação sensorial, sendo indistinguível da água de coco fresca para os consumidores considerando os parâmetros avaliados (aparência, aroma, sabor, consistência, dulçor e impressão global).

Quanto aos efeitos da aplicação da tecnologia nas enzimas POD e PPO da água de coco, a maior parte das condições de processo avaliadas e modeladas resulta em ativação das enzimas de até 120% e 208% nos casos da PPO e POD, respectivamente. Esta ativação se mostrou reversível no caso da PPO, mas não reversível no caso da POD. Com isso, o uso da tecnologia de alta pressão isostática para processamento da água de coco deve ser acompanhado por uma barreira secundária a fim de evitar degradação do produto pela POD. Uma alternativa seria o uso de embalagem com barreira a oxigênio.

APÊNDICE / APPENDIX

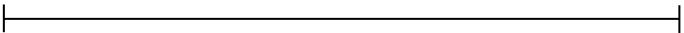
Appendix I

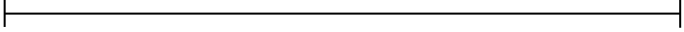
Form (Sensory Analysis) – Form handed to penellists for performing sensory analysis test.

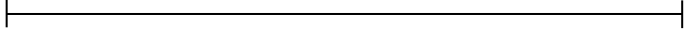
Nome: _____ Idade: _____

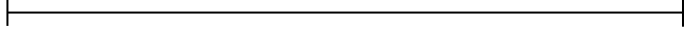
Você está recebendo uma amostra codificada de água de coco. Por favor, prove a amostra e em seguida, avalie a amostra usando as escalas abaixo para indicar o quanto você gostou da amostra em relação aos atributos aparência, aroma, sabor, consistência e impressão global e o quão próximo do ideal está o dulçor da amostra.

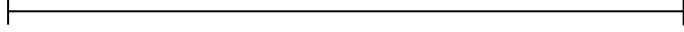
Por favor, identifique a amostra: _____

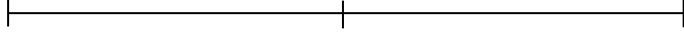
Aparência: 
Desgostei extremamente Gostei Extremamente

Aroma 
Desgostei extremamente Gostei Extremamente

Sabor 
Desgostei extremamente Gostei Extremamente

Consistência 
Desgostei extremamente Gostei Extremamente

Impressão global 
Desgostei extremamente Gostei Extremamente

Dulçor 
Desgostei extremamente Gostei Extremamente

Appendix II**Pressurization intervals:** Intervals of pressurization for each target pressure

Pressure (MPa)	Interval (min:sec)
100	00:35
200	00:51
300	01:06
400	01:23
500	01:39
600	01:58

Appendix III

Enzymes activity: Measured enzymes activities (POD / PPO) for each point of the rotational central composite design at 0, 24 and 48h after processing.

Pressure	Temperature	Time	POD 0h	POD 24h	POD 48h	PPO 0h	PPO 24h	PPO 48h
-1,00	-1,00	-1,00	102,73	101,43	97,88	102,45	105,47	92,11
-1,00	1,00	1,00	136,24	124,27	114,89	86,71	93,65	93,37
1,00	-1,00	1,00	122,01	133,98	137,01	104,05	106,05	110,17
1,00	1,00	-1,00	137,30	144,76	144,02	101,51	100,41	102,34
0,00	0,00	0,00	117,05	111,30	126,39	100,07	98,00	98,00
-1,00	-1,00	1,00	106,42	115,83	162,13	96,30	97,04	99,72
-1,00	1,00	-1,00	105,57	106,95	112,94	101,30	97,67	93,50
1,00	-1,00	-1,00	100,71	128,21	119,38	108,82	104,63	113,67
1,00	1,00	1,00	164,40	161,32	181,83	110,26	90,21	99,87
0,00	0,00	0,00	115,89	116,50	125,02	101,51	99,00	99,00
-1,68	0,00	0,00	103,22	113,92	111,61	99,31	99,42	102,32
1,68	0,00	0,00	148,55	161,60	155,62	100,97	95,45	97,20
0,00	-1,68	0,00	102,57	111,07	111,89	97,80	109,27	103,54
0,00	1,68	0,00	136,23	138,75	142,42	88,24	87,16	93,61
0,00	0,00	-1,68	92,46	119,14	113,45	104,58	101,35	99,40
0,00	0,00	1,68	116,51	124,86	126,28	106,35	98,10	102,34
0,00	0,00	0,00	111,00	114,89	123,05	102,28	101,20	101,20