

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO TESTE DESAFIO EM
REFRIGERANTE DE LARANJA ADICIONADO DE CONCENTRADO
DE CENOURA E MAÇÃ

DENISE ROSANE PERDOMO AZEREDO

2016

664.0287

A993d

T

Azeredo, Denise Rosane Perdomo, 1969-

Desenvolvimento e aplicação do teste desafio em refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã / Denise Rosane Perdomo Azeredo - 2016.

113 f.: il.

Orientador: Adriano Gomes Cruz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 99-113.

1. Alimentos - Aditivos - Teses. 2. Alimentos - Conservadores - Teses. 3. Alimentos - Microbiologia - Teses. 4. Refrigerantes - Teses. 5. Corantes - Teses. 6. Microbiologia - Teses. I. Cruz, Adriano Gomes, 19-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

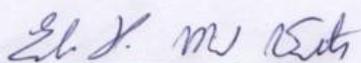
DENISE ROSANE PERDOMO AZEREDO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

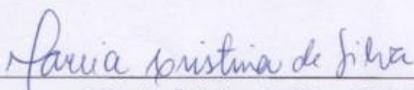
TESE APROVADA EM 25/08/2016



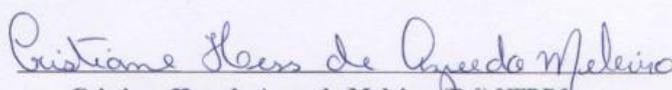
Adriano Gomes da Cruz. (Dr.) UFRRJ
(Orientador)



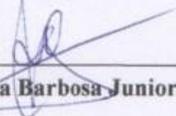
Eduardo Henrique Miranda Walter. (Dr.) Embrapa Agroindústria de Alimentos



Márcia Cristina da Silva. (Dr^a) IFRJ



Cristiane Hess de Azevedo Meleiro. (Dr^a) UFRRJ



José Lucena Barbosa Junior. (Dr.) UFRRJ



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO TESTE DESAFIO EM REFRIGERANTE
DE LARANJA ADICIONADO DE CONCENTRADO DE CENOURA E MAÇÃ.**

DENISE ROSANE PERDOMO AZEREDO

Sob a Orientação do Professor

DSc. Adriano Gomes Cruz

DSc. Armando Ubirajara de Oliveira Sabaa Srur

In memoriam

e Co-Orientador

PhD. Anderson de Souza Sant'Anna

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do **grau de Doutor** no
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, Área de
Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai, infinito em bondade e misericórdia. Senhor da Vida, que me sustenta a cada dia com saúde, coragem e força, agradeço por me presentear com uma família amorosa e amigos verdadeiros.

À Jesus, nosso amigo, mestre, companheiro incondicional de todas as horas. À querida irmã Maria Angélica, pela possibilidade do trabalho renovador.

À Lucimar, que muito me auxiliou e que sempre me deu forças para seguir...

A querida amiga Judy, que não mediu esforços para me ajudar! Amiga de longa caminhada....parte do que sou como profissional devo a você!!!

Ao querido orientador Sabaa, que soube compreender, com muito carinho, a minha vida multidisciplinar: professora, orientadora, mãe, esposa, filha, dona de casa, aluna de doutorado...e que confiou em mim, dando-me oportunidade de fazer a primeira disciplina do doutorado, PCA, ministrada por ele, como ouvinte. Continuo em prece por ele, porque acredito que os laços fraternos se estendem para sempre.

Ao querido amigo e co-orientador Anderson, de quem muito me orgulho, por toda a ajuda, pela resposta aos e-mails na madrugada, pelo acolhimento, pelos congressos e cursos que me oportunizou.

Ao querido amigo Adriano pela resposta aos e-mails na madrugada, pelo incentivo e pela disponibilidade em me auxiliar sempre.

À querida amiga Andréa Mello, companheira desde o mestrado, que sempre me deu forças para continuar nesta longa caminhada e dividiu comigo as preocupações de mãe, filha e aluna de doutorado.

Aos professores (as) da instituição que pelas aulas ministradas muito contribuíram para a minha formação, em especial ao Sabaa, Cristiane Hess, Kátia Tabai, Stella Reis, Luís Otávio e a Verônica Lobato.

A equipe de professores do curso de Alimentos do IFRJ- Campus Rio de Janeiro pelo incentivo e compreensão das ausências nas reuniões, em especial a Lourdes Maria Pêsoa Masson e ao coordenador José Ricardo Hassel Lopes que me auxiliou sempre que percebeu que a minha carga horária estava muito alta! Aos Professores Fábio M. Costa e Janaína Nascimento.

Aos técnicos das indústrias que me possibilitaram o desenvolvimento e produção das formulações: Hélio, Mariana, Edmilson, Rogério, Dona Ruth e Sérgio Becker. Ao Mário Slikita pela doação do ingrediente natural. Sem vocês eu não teria conseguido!

DEDICATÓRIA

Ao meu querido e amado esposo, as minhas filhas e aos meus pais, pelo incentivo nas horas difíceis, pelo auxílio constante e pela compreensão das ausências.

.....Estamos sempre, face à face, com a banca examinadora do mundo, pois onde formos aí seremos convocados à confissão de nossa Fé e valor moral. O minuto que se esvai é a nossa oportunidade valiosa; o lugar onde estamos é o anfiteatro de nossas lições contínuas.

Por isso, caminhar sem Jesus nos domínios humanos, é sentir que a água não dessedenta, o alimento não sacia, a melodia não eleva, a página não edifica, a flor não perfuma, a luz não aquece. Entretanto, amparados no Cristo, todos somos autossuficientes, porquanto dispomos de apoio, esclarecimento e fortaleza em qualquer transe aflitivo com que a vida nos surpreenda.

CAÍRBAR SCHUTEL

(mensagem: Nas culminâncias da luta, do livro Ideal Espírita – Psicografia de Francisco C. Xavier).

RESUMO

AZEREDO, Denise Rosane Perdomo. Desenvolvimento e aplicação do teste desafio em refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã. 2016. 113p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

Atualmente o consumidor anseia por alimentos mais naturais, saudáveis, que promovam benefícios à saúde e que sejam isentos de aditivos. Nesse sentido, a composição química dos refrigerantes, especialmente no que concerne aos corantes artificiais e conservadores pode representar riscos à saúde do consumidor, devido a possibilidade de formação de benzeno, reconhecido agente carcinogênico ao homem, e a associação entre corantes artificiais, reações alérgicas e efeitos deletérios ao DNA. Nessa pesquisa, inicialmente, desenvolveu-se uma formulação de refrigerante de laranja, contendo os conservadores benzoato de sódio e sorbato de potássio, na qual os corantes artificiais – amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo foram substituídos por concentrado de cenoura e maçã. Em paralelo, desenvolveu-se uma formulação controle. Foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial das formulações durante o período de armazenamento de 150 dias. Observou-se o atendimento ao padrão de identidade e qualidade e estabilidade das formulações em relação aos parâmetros físico-químicos. Entretanto, na análise colorimétrica observou-se uma degradação de cor perceptível ao consumidor na amostra contendo o concentrado de cenoura e maçã. Em relação as análises microbiológicas, ambas as formulações atenderam aos parâmetros preconizados pela legislação. Entretanto, a contagem de bolores e leveduras apresentou crescimento de 1 ciclo log na formulação contendo o concentrado de cenoura e maçã, sugerindo que a robustez da matriz desenvolvida pode ser afetada, se as condições de higienização da linha de processamento não forem observadas. Em relação a análise sensorial, verificou-se que a cor foi a característica sensorial que mais influenciou os consumidores com relação a aceitabilidade das amostras, sinalizando que esse parâmetro interferiu, de forma significativa na avaliação do sabor e aparência. Os resultados referentes a aplicação do teste desafio e a determinação do potencial de multiplicação microbiana (δ) indicaram que as leveduras e bactérias lácticas são capazes de se multiplicar na formulação adicionada de concentrada de cenoura e maçã sem conservadores ($\delta \geq 0,5 \log_{10}$), sinalizando que a formulação é sensível. As bactérias acéticas, nessas condições, foram inibidas. Nas formulações preservadas quimicamente com adição de concentrado de cenoura e maçã e a adicionada de corantes artificiais, os resultados referentes ao potencial de multiplicação microbiana (δ) indicaram que as leveduras e bactérias lácticas foram inibidas ($\delta \leq 0,5 \log_{10}$) em ambas as formulações. Entretanto, as leveduras resistentes a conservadores apresentaram habilidade de crescimento ($\delta \geq 0,5 \log_{10}$). No ingrediente concentrado de cenoura e maçã, observou-se que as leveduras, bactérias lácticas e o fungo *Penicillium citrinum* foram inibidos, indicando que o concentrado não deve ser considerado uma fonte de nutriente para a multiplicação microbiana que afetaria a robustez da formulação. Constatou-se a multiplicação das leveduras resistentes a conservadores, com potencial de multiplicação $\delta \geq 0,5 \log_{10}$ em todas as formulações e ingrediente avaliados. Os dados obtidos no presente estudo sinalizam que o desenvolvimento de alimentos mais naturais ainda representa um desafio para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: corantes naturais, aditivos alimentares, bebidas carbonatadas, potencial de multiplicação microbiana (δ), microbiologia.

ABSTRACT

AZEREDO, Denise Rosane Perdomo. Development and application of microbiological challenge test (MCT) in orange soda added with carrot and apple concentrate. 113p. 2016.p. Thesis (Doctoral Program in Food Science and Technology) – Institute of Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

Nowadays consumer desired healthy foods that promote benefits and free from food additives. The chemical composition of soft drinks, artificial colors and preservative, may pose a risk to consumer health due to the possibility of benzene formation, a recognized carcinogenic agent in humans and the association between artificial colors, allergic reactions and DNA damage. In this study, an orange soda formula containing the preservatives sodium benzoate and potassium sorbate with carrot and apple concentrate was developed. In parallel, we developed a standard formula containing tartrazine and sunset yellow. Physicochemical, microbiological and sensory analysis of formulas were carried out during the storage period of 150 days. It was observed that there were no changes in physicochemical parameters. However, the colorimetric analysis revealed a short shelf life in the sample containing the carrot and apple concentrate. Regarding microbiology, both formulations were according to regulation by public health agencies. The yeasts and molds counts presented 1 log cycle growth in the formula containing the carrot and apple concentrate, suggesting that the robustness of the developed matrix may be affected, if the hygiene conditions of processing line sanitation are not observed. It was found that the color was the sensory characteristic that most influenced consumers regarding the acceptability of the samples, signaling that this parameter interfered significantly in evaluating flavor and appearance. The results obtained by microbiological challenge test and determination of growth potential (δ) indicated that yeast and lactic acid bacteria are able to multiply in the formula containing carrot and apple concentrate without preservatives ($\delta \geq 0.5 \log_{10}$), indicating that the formula is sensitive. Acid acetic bacteria, in these conditions, were inhibited. A preserved formula with the addition of carrot and apple concentrate and other formula with the addition of artificial colors were prepared. The results referring to the growth potential (δ) indicated that yeast and lactic acid bacteria were inhibited ($\delta \leq 0.5 \log_{10}$) in both formulas. However, the preservative resistant yeasts presented growth ability ($\delta \geq 0.5 \log_{10}$). In the apple and carrot concentrate, it was observed that yeast, lactic acid bacteria and fungus *Penicillium citrinum* were inhibited, indicating that this ingredient should not be considered a nutrient source for microbial multiplication that would affect the formula robustness. It was verified the growth of the preservative resistant yeasts (growth potential $\delta \geq 0,5 \log_{10}$) in all the evaluated formulas and ingredient. The data obtained, in this study, indicate that the development of more natural foods still represents a challenge for the food industry.

Key words: food colouring stuffs, food additives, carbonated soft drinks, growth potential (δ), microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Volume de produção do mercado de bebidas não alcóolicas em 2014	07
Figura 2 – Participação de mercado dos produtores brasileiros de refrigerantes	08
Figura 3 – Frequência de consumo de refrigerantes entre homens e mulheres em diferentes cidades brasileiras.....	09
Figura 4 – Consumo <i>per capita</i> (litros/habitante/ano) do mercado brasileiro de refrigerantes dos anos de 2010 a 2014.....	10
Figura 5 – Processo de industrialização do refrigerante.....	23
Figura 6 – Texto informativo sobre o corante amarelo tartrazina	58
Figura 7 – Lista de ingredientes retirada do rótulo da amostra testada	59
Figura 8 – Características sócio demográficas da população em estudo.....	60
Figura 9 – Frequência de escores (positivos/negativos) atribuídos pelos consumidores nas três sessões.....	62
Figura 10 – Classificação de corantes de acordo com a Resolução nº 44/CNNPA.....	68
Figura 11 – Produção de refrigerante de laranja	72
Figura 12 – Contagem de bolores e leveduras e bactérias aeróbias totais nas formulações F 1 e F 2	78
Figura 13 – Figura bidimensional do mapa de preferência interno das 8 amostras de refrigerante de laranja avaliadas	80
Figura 14 – Formulação F 1. Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã, sem adição de conservadores (pH 3,0; Aa 0,990 e CO ₂ 3,0v).....	93
Figura 15 – Formulação F 2. Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em refrigerante de laranja preservado quimicamente, adicionado de concentrado de cenoura e maçã (pH 3,0; Aa 0,990 e CO ₂ 3,0v).....	94
Figura 16 – Formulação F 3. Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em refrigerante de laranja preservado quimicamente, adicionado de corantes artificiais – amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo (pH 3,3; Aa 0,990 e CO ₂ 3,0v).....	94
Figura 17 - Concentrado de cenoura e maçã. Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores, bactérias lácticas e fungo	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) dos refrigerantes	13
Tabela 2 – Exemplo de declaração quantitativa de ingredientes no rótulo do produto	14
Tabela 3 – Quantidades mínimas de suco e polpa de frutas e extratos para refrigerantes	15
Tabela 4 – Relação dos edulcorantes, poder adoçante e limites máximos preconizados pela legislação	17
Tabela 5 – Corantes artificiais - nome, cor, código, ingestão diária aceitável e limites máximos permitidos em bebidas não alcóolicas	19
Tabela 6 – Teor de tartrazina em amostras de bebidas comercializadas no Brasil	22
Tabela 7 – Ingredientes e características físico-químicas das amostras de refrigerantes comerciais	74
Tabela 8 - Resultados das análises físico-químicas das amostras de refrigerante produzidas com concentrado de cenoura e maçã (F 1) e controle (F 2), durante o tempo de armazenamento de 150 dias	76
Tabela 9 – Segmentação por gênero e idade dos participantes da análise sensorial	79
Tabela 10 – Média das notas atribuídas pelos consumidores para aparência, aroma, sabor, textura, impressão global e cor para as 8 amostras testadas	80
Tabela 11 – Formulações desenvolvidas para a condução do teste de desafio microbiológico	88
Tabela 12 – Culturas selecionadas para o teste desafio microbiológico	89
Tabela 13 – Fatores intrínsecos característicos das formulações desenvolvidas	92
Tabela 14 – Potencial de multiplicação microbiana de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em diferentes formulações de refrigerante sabor laranja e em concentrado de cenoura e maçã	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Afirmativas apresentadas no formato de survey	57
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIR	Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas
ACP	Análise de Componentes Principais
AFREBRAS	Associação dos fabricantes de refrigerantes do Brasil
AMBEV	Companhia de Bebidas das Américas
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATT	Acidez Total Titulável
COMEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
ICBA	<i>International Council of Beverages Associations</i>
IDEC	Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor
INS	<i>International Numbering System</i>
JAR	<i>Just About Right</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEPSICO	Pepsi Company
PET	Politereftalato de etileno
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
PROTESTE	Associação Brasileira de Defesa do Consumidor
RTD	<i>Read to drink</i>
SICOBEB	Sistema de Controle de Produção de Bebidas
SST	Sólidos Solúveis Totais
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TAC	Termo de ajuste de conduta
TACLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
-------------------------------	-----------

CAPÍTULO I – REFRIGERANTES: CONSUMO, COMPOSIÇÃO E TECNOLOGIA.

Resumo	04
Abstract	05
1. Introdução	06
1.1. Desafios para o setor	10
2. Refrigerantes: Legislação	11
2.1. Classificação / Designação	12
3. Refrigerantes: Composição	16
3.1 Refrigerante de laranja	19
3.1.1 A formação de benzeno em refrigerante de laranja	20
3.1.2 As alergias alimentares e os corantes artificiais empregados em refrigerante de laranja	21
4.Refrigerantes: Tecnologia	22
4.1.Tratamento da água do processo	22
4.2.Produção de xarope simples	24
4.3.Filtração do xarope	24
4.4.Produção de xarope composto	25
4.5.Processo de diluição, carbonatação e envase	25
5. A perda de qualidade dos refrigerantes.....	26
6. Considerações finais	26

CAPÍTULO II - AN OVERVIEW OF MICROORGANISMS AND FACTORS CONTRIBUTING FOR THE MICROBIAL STABILITY OF CARBONATED SOFT DRINKS

Abstract	29
1. Introduction	30
2. An overview of soft drink processing	32
3. Microorganisms of importance in carbonated soft drinks	34
3.1. Spoilage Microorganisms	34
3.1.1. Yeasts	35
3.1.2. Filamentous fungi	37
3.1.3. Acid producing bactéria	38
3.2. Pathogenic microorganisms	39
4. Major factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks	41
4.1. pH	41
4.2. Preservatives	42
4.3. Carbonation	44
5. Final remarks	45

CAPÍTULO III – SEGURANÇA DO ALIMENTO: PERCEPÇÃO DOS CONSUMIDORES SOBRE OS ADITIVOS ALIMENTARES

Resumo	52
Abstract	53
1. Introdução	54
2. Material e métodos	56
2.1. Estudo I- Percepção do consumidor sobre a segurança dos aditivos em alimentos processados	56
2.2. Estudo II- Impacto da informação sobre aditivos alimentares, em especial corantes artificiais, na aceitação de balas mastigáveis	57
2.3. Análise estatística	59
3. Resultados e Discussão	59
3.1. Estudo I- Percepção do consumidor sobre a segurança dos aditivos alimentares em alimentos processados	59
3.2. Estudo II – Impacto da informação sobre aditivos alimentares, em especial corantes artificiais, na aceitabilidade de balas mastigáveis	62
4. Conclusão	63

CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO DE REFRIGERANTE DE LARANJA ADICIONADO DE CONCENTRADO DE CENOURA E MAÇÃ

Resumo	65
Abstract	66
1. Introdução	67
2. Material e Métodos	70
2.1. Seleção do corante natural	70
2.1.1 Desenvolvimento das formulações	71
2.1.2 Produção do refrigerante	71
2.2 Análises físico-químicas	73
2.2.1 Análise Colorimétrica	73
2.2.2 Análises microbiológicas	73
2.3 Análise sensorial	74
2.3.1 Amostras	74
2.3.2 Teste afetivo de aceitação	75
2.4 Análise estatística	75
3. Resultados e Discussão	76
3.1 Análises físico-químicas	76
3.2 Análises microbiológicas	77
3.3 Análise sensorial	78
4. Conclusão	81

CAPÍTULO V - APLICAÇÃO DO TESTE DESAFIO E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA (δ) PARA VALIDAÇÃO DE FORMULAÇÃO DE REFRIGERANTE DE LARANJA ADICIONADO DE CONCENTRADO DE CENOURA E MAÇÃ.

Resumo	84
Abstract	85
1. Introdução	86
2. Material e Métodos	88
2.1. Desenvolvimento das formulações	88
2.1.1. Produção do refrigerante	88
2.2. Caracterização físico-química das formulações	88
2.3. Teste Desafio	89
2.3.1. Seleção dos micro-organismos	89
2.3.2. Ativação das culturas	89
2.3.3. Preparo do inóculo	90
2.3.4. Inoculação da suspensão de micro-organismos nas amostras de bebidas	90
2.3.5. Monitoramento do crescimento dos micro-organismos nas amostras inoculadas	90
2.3.6. Inoculação das suspensões de micro-organismos na amostra de concentrado de cenoura e maçã	91
2.3.7. Determinação do potencial de multiplicação microbiana (δ)	92
3. Resultados e discussão	92
4. Conclusão	97
CONCLUSÕES GERAIS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, as bebidas não alcoólicas ganharam espaço no mercado brasileiro. Os refrigerantes representam uma parcela significativa desse mercado, refletindo em um volume de consumo que coloca o Brasil em terceiro lugar no mercado mundial.

De acordo com a legislação, refrigerantes são bebidas não alcoólicas gaseificadas, obtidas pela dissolução, em água potável, de suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionadas de açúcares ou edulcorantes, acidulantes, aromatizantes, corantes artificiais e conservadores. No tocante aos conservadores, o benzoato de sódio, sob determinadas condições, em conjunto com o ácido ascórbico presente em bebidas de laranja pode formar benzeno, reconhecido agente carcinogênico ao homem. Quanto ao emprego de corantes artificiais, em refrigerantes de laranja destacam-se os corantes artificiais amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo, envolvidos em reações alérgicas e efeitos deletérios ao DNA, respectivamente. Ainda, estudos demonstram a relação direta entre o consumo de corantes artificiais e benzoato de sódio e a ocorrência de outras patologias como o déficit de atenção e hiperatividade.

Por outro lado, para adequada estabilidade microbiológica dos refrigerantes, os principais parâmetros são pH, carbonatação e a presença de conservadores como benzoato de sódio e sorbato de potássio.

Observa-se um movimento mundial da sociedade contemporânea em busca de produtos mais naturais, que se relacionem à saúde e dieta equilibrada, e mais seguros, que não ofereçam riscos à saúde do consumidor. A indústria de alimentos está reformulando seus produtos, buscando alternativas aos ingredientes convencionais. A inovação de produto, consistindo na substituição de aditivos alimentares por ingredientes naturais representa um desafio, pois deve atender aos aspectos relacionados a regulamentação, a qualidade e a segurança do alimento.

Desta forma, esse estudo teve como objetivo principal avaliar se a substituição dos corantes artificiais, em formulação de refrigerante de laranja, por concentrado de cenoura e maçã e a eliminação dos conservadores, afetariam a estabilidade microbiológica do produto, implicando na diminuição da robustez da fórmula. A aplicação do teste desafio em conjunto com a determinação do potencial de multiplicação microbiana (δ) permitiu afirmar ser possível a substituição dos corantes artificiais, contudo, a eliminação dos conservadores resulta em diminuição da estabilidade da formulação, e conseqüente sensibilidade à formulação. A aplicabilidade do estudo está na possibilidade de desenvolver uma bebida que possibilitará o

crescimento do mercado de refrigerantes, aliada ao conceito de saúde e segurança do consumidor.

Essa tese foi estruturada em 5 capítulos, organizados da seguinte forma. O **capítulo 1** corresponde a uma revisão bibliográfica acerca do consumo, composição e tecnologia de fabricação dos refrigerantes. O **capítulo 2** se refere ao artigo de revisão, publicado na revista *Food Research International*, cujo título é: “*An overview of microorganisms and factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks*”. No **capítulo 3** são apresentados os resultados do estudo sobre a percepção dos consumidores em relação aos aditivos alimentares. No **capítulo 4** são apresentados os resultados oriundos do desenvolvimento de formulação de refrigerante sabor laranja adicionada de concentrado de cenoura e maçã. O **capítulo 5** apresenta os resultados obtidos da aplicação do teste desafio e determinação do potencial de multiplicação microbiana (δ) para validação de formulação de refrigerante sabor laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã.

CAPÍTULO I

REFRIGERANTES: CONSUMO, COMPOSIÇÃO E TECNOLOGIA.

Resumo

O consumo de refrigerantes no Brasil é bastante significativo, colocando o país em terceiro lugar no mercado mundial depois dos Estados Unidos e do México. A produção de refrigerantes no Brasil é dominada por dois grandes fabricantes, entretanto, ressalta-se que as empresas de menor porte, ganharam competitividade ao longo dos últimos anos, sobretudo com a introdução da embalagem de polietileno tereftalato (PET). Uma extensa legislação assegura que a fabricação da bebida esteja em conformidade com padrões nacionais e internacionais. Este capítulo tem por objetivo fornecer uma revisão sobre o conhecimento científico disponível acerca dos refrigerantes e ressalta os principais aspectos ligados à saúde pública, no que tange à segurança do alimento. Especial atenção é dada aos ingredientes, incluindo os conservadores e corantes artificiais que podem representar um risco à saúde do consumidor. No tocante aos conservadores, o benzoato de sódio, sob determinadas condições, em conjunto com o ácido ascórbico presente em bebidas carbonatadas de laranja pode formar benzeno, reconhecido agente carcinogênico ao homem. Quanto ao emprego de corantes, em refrigerantes de laranja destacam-se os corantes artificiais amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo, envolvidos em reações alérgicas e efeitos deletérios ao DNA, respectivamente. As principais deteriorações dos refrigerantes compreendem a turvação do líquido, formação de sedimentos, alterações de sabor e odor e presença excessiva de gases. Devido as suas características intrínsecas, o refrigerante é considerado estável, do ponto de vista microbiológico. As etapas críticas de fabricação constituem a pasteurização/resfriamento do xarope simples e a homogeneização dos conservadores na preparação do xarope composto.

Palavras-chave: bebidas não alcoólicas gaseificadas, consumo, legislação, composição, processamento.

SOFT DRINKS: CONSUMPTION, COMPOSITION AND TECHNOLOGY

Abstract

Soft drinks consumption in Brazil is quite significant, placing the country in third position in the global market after the United States and Mexico. Two major manufacturers dominate the production of soft drinks in Brazil. However, smaller companies gained competitiveness over the past few years, especially with the introduction of polyethylene terephthalate packaging (PET). Extensive legislation ensures that the beverage manufacturing is in accordance with national and international standards. This chapter provides a broad overview of available scientific knowledge about the soft drinks and highlights the key aspects of public health in relation to food safety. Particular attention is given to ingredients, including preservative and artificial colors that can pose a risk to consumer health. As regards preservative, sodium benzoate, under certain conditions, together with the ascorbic acid present in orange carbonated beverage can form benzene, a known human carcinogen. The use of artificial colors, such as tartrazine and sunset yellow in the orange soda, are involved in allergic reactions and deleterious effects on DNA, respectively. The main deteriorations of soft drinks comprises turbidity, sediment formation, flavor and odor changes and excessive presence of gases. Due to its intrinsic characteristics, soft drink is considered stable, from the microbiological point of view. The critical manufacturing steps are pasteurisation and cooling the syrup and mixing the ingredients and preservatives.

Key-words: soft drinks, consumption, standards, composition, processing.

1. Introdução

Os últimos anos dez anos foram marcados por transformações na sociedade brasileira. De uma economia de baixo dinamismo, com taxas de crescimento abaixo da média mundial, o Brasil passou a fazer parte dos países emergentes que lideram o crescimento mundial. Em 2011, o Brasil se tornou a sexta economia do mundo. Este cenário alavancou o crescimento de diversos setores da economia do país, dentre estes, destaca-se o segmento de bebidas não alcoólicas. Em cinco anos, o segmento aumentou de 51,6% para 53,2% a sua participação de mercado, e os refrigerantes representaram 41,5% desta fatia (CAMARGO, BONACIO e ZACARCHENCO, 2014). A produção de refrigerantes desponta como principal item do setor de bebidas, seguido da produção de cervejas. Juntos, esses dois segmentos refletem aproximadamente 82% do volume produzido e 76% do valor total das vendas de bebidas no Brasil (CERVIERI et al., 2014). A Figura 1 retrata a segmentação do mercado. Ressalta-se a predominância dos refrigerantes, com maior volume de produção (em bilhões de litros) no ano de 2014. O Brasil é o terceiro maior mercado de refrigerantes do mundo depois dos Estados Unidos e México (NEVES, 2015).

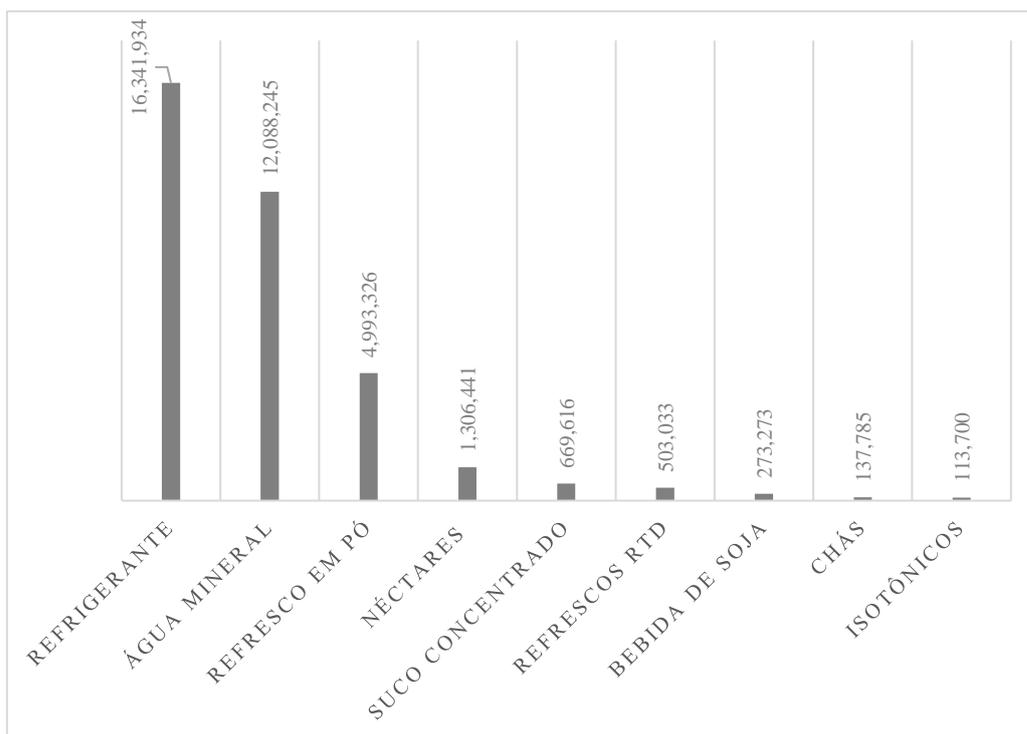


Figura 1: Volume de produção do mercado de bebidas não alcoólicas em 2014.
 Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados da ABIR (2014) e SICOBE (2014)
 *RTD – Read to drink.

A produção de refrigerantes no Brasil é dominada por dois grandes fabricantes: sistema Coca-Cola Brasil, formado pela Coca-Cola Brasil em parceria com grupos empresariais independentes, chamados de fabricantes autorizados e pela Ambev S.A que além de produzir a sua marca é também responsável pela produção e distribuição dos produtos da PepsiCo no Brasil (ROSA, COSENZA e LEÃO, 2006; CERVIERI et al., 2014). A esse grupo de grandes corporações multinacionais junta-se a Brasil Kirin, com capital de participação internacional, reunindo as três empresas cerca de mais de 80% do faturamento do setor (AFREBRAS, 2015). As empresas de menor porte, ganharam competitividade ao longo dos últimos anos, praticando preços baixos e oferecendo marcas conhecidas popularmente como tubaínas¹, distribuídas regionalmente, uma vez que não possuem a complexa logística de distribuição das grandes marcas (CAMPOS e OLIVEIRA, 2004). A Figura 2 destaca a participação de mercado dos principais produtores brasileiros de refrigerantes.

¹ O verbete “tubaína” não consta nos dicionários Aurélio e Michaelis. Tubaína é o nome de um refrigerante sabor “tutti frutti”, produzido por indústrias nacionais, com muitas variações regionais. Fonte: Campos e Oliveira, 2004.

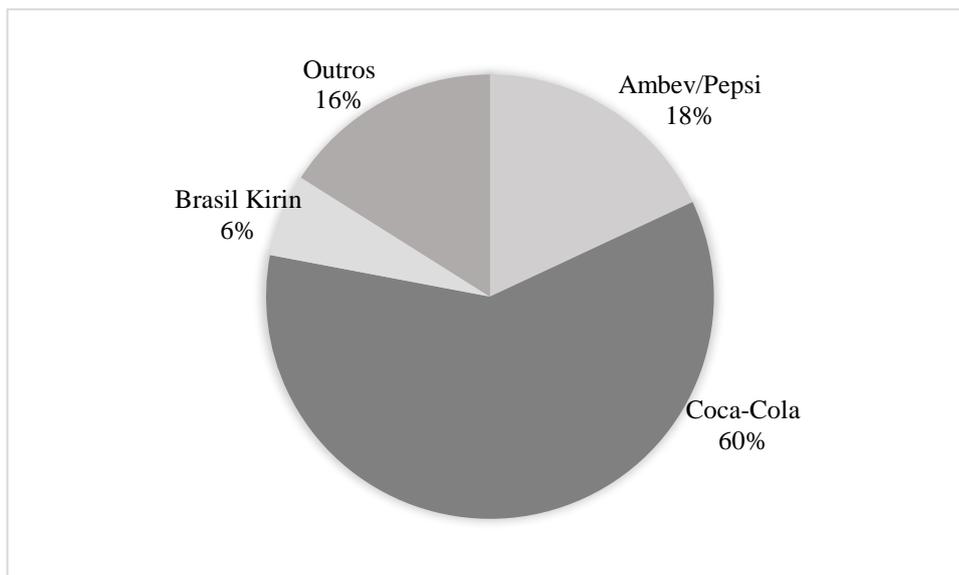


Figura 2: Participação de mercado dos produtores brasileiros de refrigerantes. Fonte: AFREBRAS (2015).

O consumo de refrigerantes no Brasil em 2014 foi de 80,6 litros/habitante/ano (ABIR, 2014). O consumo é prevalente entre adolescentes, seguido da população adulta, tendendo a diminuir de acordo com a idade (SOUZA et al., 2013; IBGE, 2011). Entretanto, um estudo conduzido em creches públicas com lactentes (0 a 36 meses) constatou que os refrigerantes e sucos industrializados foram introduzidos antes do primeiro ano de vida, pela metade da população em estudo (n=636) e 10% consumiram as bebidas industrializadas antes dos 6 meses (LONGO-SILVA et al., 2015). A presença de refrigerantes na dieta é cinco vezes maior na classe de maiores rendimentos do que na classe de menores rendimentos. Comparando-se o período de 1974-1975 e 2002-2003, observou-se um aumento de 400% na participação do refrigerante na dieta do brasileiro (IBGE, 2004).

Dados da pesquisa VIGITEL² BRASIL (2013) relataram que a frequência de adultos que referiram o consumo de refrigerantes em mais de cinco dias da semana foi de 11,6% em Natal e de 30,1% em Goiânia. A Figura 3 demonstra a frequência de consumo de refrigerantes entre homens e mulheres em diferentes cidades brasileiras. Destaca-se a maior regularidade de consumo em pessoas do gênero masculino. As cidades de Goiânia e Porto Alegre apresentaram o maior consumo da bebida, dentre as pesquisadas.

² Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico.

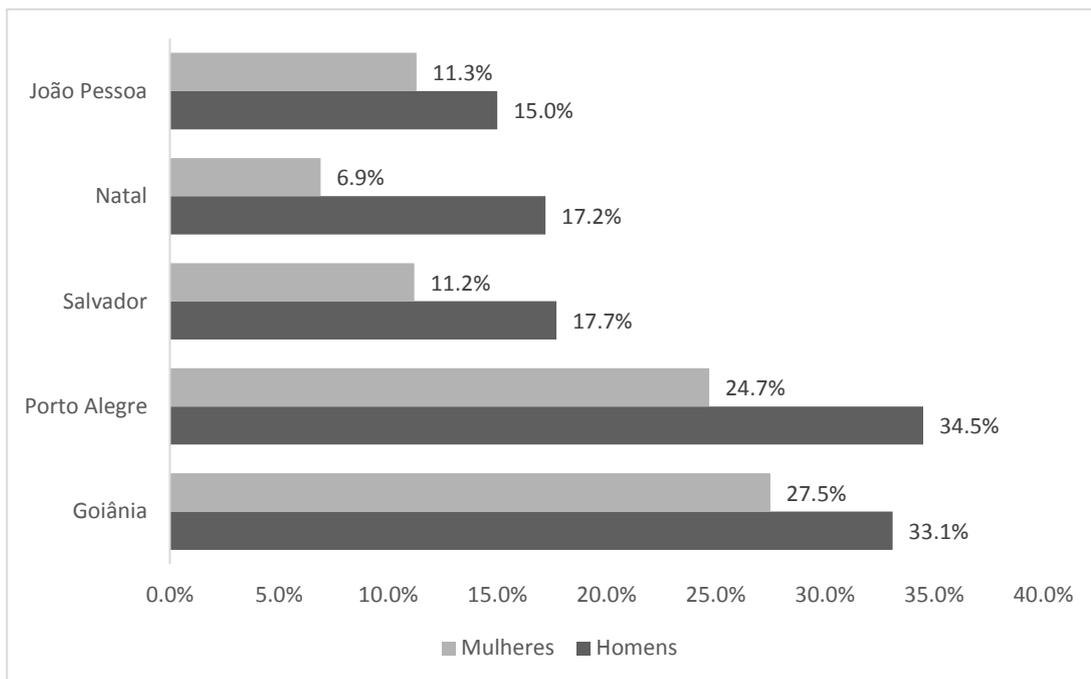


Figura 3: Frequência de consumo de refrigerantes entre homens e mulheres em diferentes cidades brasileiras. Elaborado pelos autores a partir de dados da Vigitel (2013).

Os dados citados anteriormente são corroborados pela Pesquisa Nacional de Saúde (IBGE, 2014). De acordo com o estudo, os homens consomem mais refrigerantes (26,6% dos entrevistados), sendo a maior proporção de consumo no Centro-Oeste. A região Nordeste foi considerada a de menor consumo (16,8%). Interessante notar que as indústrias de refrigerantes se concentram na região Sudeste (44%) e Nordeste (24%) (CERVIERI et al., 2014).

Embora seja evidente o consumo de refrigerante pela população brasileira, observa-se uma tendência de diminuição no consumo. Comparado ao ano de 2010, em 2013 houve uma retração de 10%, com discreto aumento no ano de 2014 (Figura 4). Nesse sentido, o segmento vem buscando novos consumidores (idade e classes sociais) e, para atingir este objetivo, lançaram novas embalagens de tamanhos diferenciados. Essa iniciativa refletiu um crescimento no consumo (CAMARGO, BONACIO e ZACARCHENCO, 2014).

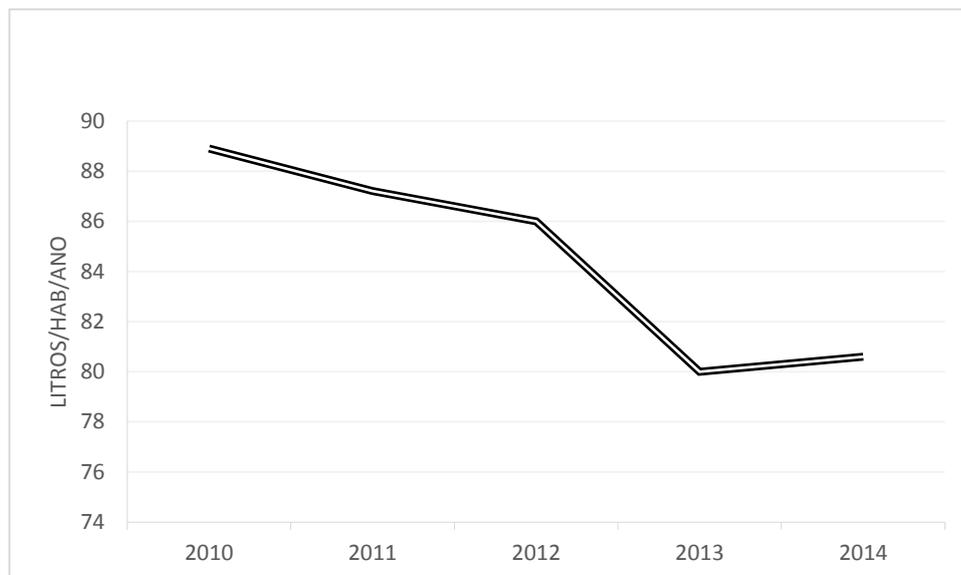


Figura 4: Consumo *per capita* (litros/habitante/ano) do mercado brasileiro de refrigerantes dos anos de 2010 a 2014. Fonte: ABIR (2014).

O mercado brasileiro de refrigerantes tem preferência pelas embalagens PET (politereftalato de etileno) de 2 L: 77% das bebidas produzidas no período de 2010 a 2014 foram acondicionadas nesta embalagem, 16% em latas e 7% em embalagens retornáveis de vidro e outras. Sob esse aspecto, a possibilidade de utilização da embalagem plástica abriu um espaço considerável para as empresas regionais atuarem no negócio, pois a embalagem de vidro exigia uma logística de retorno do vasilhame, pouco acessível (CERVIERI et al. 2014).

1.1 Desafios para o setor

As recentes transformações socioeconômicas observadas no Brasil foram responsáveis pelo bom desempenho das indústrias de bebidas no país (CERVIERI et al., 2014). Entretanto, vários são os pontos que demandam atenção do setor, visando o seu crescimento: O comportamento do consumidor que demonstra uma preocupação em manter um estilo de vida saudável, o que tem impactado os hábitos alimentares da população e como consequência, o aumento à procura por alimentos naturais e mais nutritivos. E ainda, estudos evidenciando a associação entre o consumo de refrigerantes, obesidade, doenças crônicas não transmissíveis e síndrome metabólica (FERRARI e SOARES, 2003; CARMO et al., 2006, DHINGRA et al., 2007; NOGUEIRA e SICHIERI, 2009; ESTIMA et al., 2011). Neste cenário, a indústria de refrigerantes terá que adotar novas estratégias, desenvolvendo sobretudo, bebidas com apelo mais natural e saudável. De acordo com Neves (2015), uma das tradicionais respostas ao

consumidor, foi o desenvolvimento de bebidas dietéticas (diet)³ (BRASIL, 1999). Sob esse aspecto, a publicação do Decreto n° 8592 de 17 de dezembro de 2015 (BRASIL, 2015), que permite a mistura de açúcar e adoçante hipocalóricos, resultará no desenvolvimento de bebidas com menos calorias, oportunizando a entrada de produtos no mercado brasileiro como a Coca-Cola Life, que mistura açúcar com extrato de folhas de stevia, um edulcorante natural. Essa nova versão fornece 89 Kcal em 330 mL, já a versão original 138 Kcal (NOGUEIRA, 2014). Outras tendências, no entanto, são observadas e já estão disponíveis para o consumidor, como por exemplo, o refrigerante com zero açúcar, cujo consumo de 500 mL atende a 25% da necessidade diária de ingestão de fibras⁴; e o refrigerante orgânico⁵. Segundo o IDEC (Instituto de Defesa do Consumidor), atendendo a pressão da sociedade por alimentos mais saudáveis, os principais fabricantes de refrigerantes: Coca-Cola Brasil, Ambev e Pepsico realizaram um acordo voluntário visando restringir a venda da bebida em cantinas escolares para crianças de até 12 anos de idade. Essa ação reforça a imagem junto ao consumidor de que as indústrias não estão alheias ao problema da obesidade infantil, entretanto, é importante detalhar de que forma essa iniciativa será implementada, como a fiscalização deverá atuar nesse sentido e qual o mecanismo de punição aos que infringirem as regras. Necessário se faz ainda refletir sobre o apoio à essa ação através de medidas legislativas, que visem inclusive banir a propaganda massiva a que as crianças estão submetidas (PORTAL DO CONSUMIDOR, 2016).

2. Refrigerantes: Legislação

A legislação brasileira define refrigerante como bebida gaseificada, obtida pela dissolução em água potável, de suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares. O refrigerante deverá ser obrigatoriamente saturado de dióxido de carbono industrialmente puro (BRASIL, 1998). Cabe esclarecer que de acordo com a Lei n.8918/94 (BRASIL, 1994) o registro, a padronização, a classificação, e, ainda, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas, em relação aos seus aspectos tecnológicos, competem ao Ministério da

³ De acordo com a Instrução Normativa n°30 de 27 de setembro de 1999, a bebida dietética e a bebida de baixa caloria são bebidas não-alcoólicas, hipocalóricas, que tenham o conteúdo de açúcares, adicionado normalmente na bebida convencional, inteiramente substituído por edulcorante hipocalórico ou não-calórico, natural ou artificial, em conjunto ou separadamente.

⁴ <https://www.brasilkirin.com.br/produto/fibz>

⁵ <http://www.natumaker.com.br/>

Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. À Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA cabe a inspeção e fiscalização de bebidas, nos seus aspectos bromatológicos e sanitários.

A classificação e a designação dos vários tipos de refrigerantes são apresentadas abaixo, conforme a Portaria n.544/1998 (BRASIL, 1998).

2.1. Classificação / Designação

2.1.1 Refrigerante de (nome da fruta), o que contiver por base suco ou polpa da fruta.

2.1.2. Refrigerante de Extrato de (nome do vegetal), o que contiver por base extrato vegetal.

2.1.3. Refrigerante de (nome da fruta ou do vegetal), o que contiver por base suco ou extrato vegetal ou suco de parte do vegetal de sua origem.

2.1.4. Refrigerante de (nome da fruta ou vegetal) com aroma de (nome da fruta ou do vegetal), o que contiver por base suco de fruta e aroma natural, tendo predominância do sabor do aroma.

2.1.5. Refrigerante Misto de (nome das frutas), o que contiver por base dois ou mais sucos das frutas.

2.1.6. Refrigerante Misto de (nome da fruta, ou dos vegetais), o que contiver por base suco(s) das frutas, extrato(s) de vegetal (is) ou suco(s) de parte do vegetal de sua origem,

2.1.7. Refrigerante de (nome da fruta, ou vegetal) com aroma de (Fruta ou vegetal de origem), o que contiver sucos de frutas, ou extratos vegetais, ou suco(s) de fruta (s), extrato(s) vegetal(is) e suco(s) de parte do(s) vegetal(is) e aroma, tendo predominância do sabor do aroma.

2.1.8. Refrigerante de Limão ou Soda Limonada, o que contiver por base suco de limão.

2.1.9. Refrigerante de Guaraná, o que contiver por base semente de guaraná ou seu equivalente em extrato de guaraná.

2.1.10. Refrigerante de Cola, o que contiver por base a noz de cola ou extrato de noz de cola.

Através da Instrução Normativa n° 30 de 27 de setembro de 1999 (BRASIL, 1999), o MAPA regulamentou o padrão de identidade e qualidade para bebida dietética e a de baixa caloria. Sob este aspecto, as bebidas dietéticas devem apresentar teor de açúcares (monossacarídeos e dissacarídeos) menor que 0,5 g/100mL da bebida pronta para consumo. Para as bebidas de baixa caloria o teor calórico não deverá ultrapassar 20 Kcal/100mL da bebida. Quanto ao aspecto da rotulagem, o termo “diet” é permitido nos rótulos de bebidas dietéticas; nas bebidas de baixa caloria, aplica-se o uso do termo “light”.

As características físico-químicas dos refrigerantes, de acordo com a legislação brasileira, encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) dos refrigerantes.

Sabor do refrigerante	°Brix do suco	% de suco (v/v)	Acidez (g/100mL) (mín.)	Cafeína (mg/100mL)	Tanino (mg/100mL)	Quinino ou seus sais (mg/100mL)
Uva	14	10	0,03*	-----	-----	-----
Laranja	10,5	10	0,1	-----	-----	-----
Tangerina	-----	10	-----	-----	-----	-----
Abacaxi	10	10	0,07	-----	-----	-----
Maçã	10	5	0,02**	-----	-----	-----
Pêra	10	5	0,03**	-----	-----	-----
Maracujá	9	3	0,06	-----	-----	-----
Limão ou soda limonada	-----	2,5	0,125	-----	-----	-----
Guaraná***	-----	-----	-----	0,6	1,0	-----
Cola****	----	----	-----	20	-----	-----
Água tônica de quinino	-----	----	-----	-----	-----	máx. 7; mín. 3
Misto de frutas (suco de mais de uma fruta)	-----	5,0	-----	-----	-----	-----

Fonte: Portaria n.544/1998; Decreto-lei 6871/2009 (BRASIL, 2009a). *Expresso em ácido tartárico; **Expresso em ácido málico. Para as demais frutas, a acidez é expressa em ácido cítrico.

*** O refrigerante de guaraná deverá conter, obrigatoriamente, no mínimo, 0,02 g/100mL de semente de guaraná (gênero *Paullinia*) ou seu equivalente em extrato.

**** O refrigerante de cola deverá conter semente de noz de cola ou extrato de noz de cola (*Cola acuminata*).

Em conjunto com outros órgãos do governo, o MAPA publicou em 2013, a Instrução Normativa nº 19 de 19 de Junho (BRASIL, 2013) que estabeleceu em todo o território nacional a complementação do Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para refresco, refrigerante, bebida composta, chá pronto para consumo e soda, com o objetivo de informar a população de forma mais clara e precisa sobre a porcentagem de suco e polpa de fruta contida nas bebidas não alcólicas vendidas no mercado (IDEC, 2014). O capítulo 2, art.12, da referida legislação, descreve que a quantidade de polpa de fruta e de suco de fruta ou de vegetal (nas bebidas prontas para o consumo, com exceção das bebidas contendo somente extrato padronizado e/ou aquoso como ingrediente característico) deve, obrigatoriamente, ser declarada no rótulo. Precisamente, no painel principal do rótulo, isolada, em destaque, com caracteres em caixa alta, em porcentagem volume por volume (v/v), com uma cifra decimal, de suco integral ou polpa ou o

somatório destes. O valor numérico e o sinal de porcentagem (%) devem ter, no mínimo, o dobro do tamanho da denominação do produto, e a expressão "DE SUCO" deve ter, no mínimo, uma vez e meia o tamanho da denominação do produto. Seguem abaixo, exemplos descritos na legislação (Tabela 2).

Tabela 2: Exemplo de declaração quantitativa de ingredientes no rótulo do produto

6g de suco concentrado de tangerina a 21°Brix	Deve ser escrito no painel principal a expressão "11,0% DE SUCO".
1g de suco concentrado de laranja a 66°Brix e 1g de suco concentrado de acerola a 40°Brix.	Deve ser escrito no painel principal a expressão "13,5% DE SUCO".
5g de suco concentrado de laranja a 50°Brix e 2g de suco concentrado de cana de açúcar a 30°Brix.	Deve ser escrito no painel principal a expressão "22,8% DE SUCO".

Fonte: BRASIL (2013)

Destaca-se ainda que, em relação as quantidades mínimas de suco de fruta, suco de vegetal, polpa de fruta, extrato padronizado e extrato de fruta para refrigerante, a legislação nº19/2013 (BRASIL, 2013) acrescentou os seguintes itens (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidades mínimas de suco e polpa de frutas e extratos para refrigerantes.

Quantidades de sucos de fruta, suco de vegetal, polpa de fruta, extrato padronizado e extrato de fruta para 100 mL de refrigerante.		
Fruta	Quantidade mínima em mL	Quantidade mínima de sólidos totais do açaí ou juçara em mL
Açaí fino, médio e grosso e polpa de açaí	----	2,0
Açaí fino clarificado	1,8	----
Açaí médio clarificado	1,6	----
Açaí grosso clarificado	1,25	2,0
Açaí (polpa de açaí clarificada)	5,0	----
Cajá	5,0	----
Cajú	5,0	----
Juçara (<i>Eutherpe edulis</i>)	----	2,0
Goiaba	5,0	----
Manga	5,0	----
Morango	2,5	----
Pêssego	5,0	----
Tomate (suco)	10,0	----
Duas ou mais frutas	5,0	----
Suco vegetal (quantidade mínima em gramas)		
Caju (castanha)	2,5	----
Cana- de- açúcar (suco de calda/caldo de cana)	20	----
Soja (proteína de soja)	1,0	----
Dois ou mais vegetais	5,0	
Extrato padronizado (quantidade mínima em gramas)		
Gengibre (extrato padronizado com, no mínimo, 0,03% de gingerol)	0,02	
Açaí (extrato padronizado com, no mínimo, 0,025% de antocianinas).	0,5	
Extrato de fruta (quantidade mínima em gramas)		
Cerejas (20°Brix)	0,5	
Framboesa (19°Brix)	0,5	
Kiwi (10°Brix)	0,5	

Notas: (1) O refrigerante de fruta ou de vegetal cuja matéria-prima não conste da Tabela 3 deve conter uma quantidade mínima de 5% v/v ou 5% m/v de suco ou polpa da fruta ou vegetal. (2) A soma dos ingredientes característicos que compõem o **refrigerante misto**, com exceção do extrato padronizado e do extrato de fruta, **deve ser de, no mínimo, 5% m/v**.

Outro ponto importante relacionado a classificação e denominação dos refrigerantes, é que a IN 19/2013 (BRASIL, 2013) se restringe apenas a quatro tipos de refrigerante, conforme indicado abaixo, ao contrário da legislação anterior – Portaria 544/98 (BRASIL, 1998).

I - Refrigerante de fruta, aquele obtido de suco de fruta ou de polpa de fruta, ou da combinação destes;

II - Refrigerante de vegetal, aquele obtido de vegetal;

III - Refrigerante de extrato, aquele obtido de extrato padronizado; e

IV - Refrigerante misto, aquele obtido da mistura de dois ou mais ingredientes característicos.

- ingredientes opcionais:

I - Vitaminas, sais minerais, fibras e outros nutrientes, em conjunto ou separadamente, desde que em conformidade com o estabelecido em legislação específica da ANVISA, em que o cloreto de sódio, em quantidades inferiores às consideradas não significativas para sódio; e

II - Ingrediente alternativo.

3. Refrigerantes: Composição

Os refrigerantes constituem um grupo diversificado de bebidas que são classificadas de acordo com a sua composição, com base no teor de açúcar, tipo de extrato e suco de fruta (BRASIL, 1998). Os refrigerantes convencionais contêm aproximadamente 90% de água, enquanto os dietéticos até 99% de água (CRUZ, 2012). Dessa forma, tanto do ponto de vista físico-químico, pela influência no sabor final da bebida, quanto pelo aspecto microbiológico, sua qualidade está atrelada ao produto final, requerendo um pré-tratamento a fim de que sejam eliminados micro-organismos, odores e sabores estranhos, partículas microscópicas e coloidais, matéria orgânica, carbonatos e bicarbonatos, compostos ferrosos e sulfurosos e excesso de cloretos (VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

Com exceção das bebidas zero calorias, o açúcar é adicionado numa proporção de 8 a 12% do produto final, mas cabe ao fabricante o estabelecimento dessa concentração. A sacarose é o açúcar utilizado na forma granulada ou líquida (CELESTINO, 2010), podendo sofrer inversão a glicose e frutose, devido ao baixo pH das formulações, notadamente nos refrigerantes

tipo cola (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010). O açúcar é adicionado para aumentar o sabor da bebida e conferir a sensação de saciedade.

A maioria dos refrigerantes dietéticos é adoçada com aspartame, acesulfame K, sacarina e ciclamato (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010; CRUZ, 2012). No Brasil, o decreto nº8592/2015 (BRASIL, 2015) permite a mistura entre açúcares e adoçantes. As bebidas formuladas com esses atributos deverão ser rotuladas como “baixo em açúcares” ou “reduzido em açúcares”. A Tabela 4 apresenta os principais edulcorantes, o potencial adoçante em relação a sacarose e os limites máximos permitidos pela legislação para bebidas com reduzido teor de açúcares.

Tabela 4: Relação dos edulcorantes, poder adoçante e limites máximos preconizados pela legislação.

Edulcorante	Poder adoçante	Limites máximos (g/100mL)
Sacarina e seus sais de cálcio, potássio e sódio	300 vezes superior, deixando um sabor residual metálico.	0,015
Ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio.	30 a 60 vezes superior	0,04
Aspartame*	200 vezes superior	0,075
Acesulfame K	200 vezes superior	0,035
Glicosídeos de esteviol	200 vezes superior	0,06
Sucralose	600 vezes superior	0,025**

Fonte: (Brasil, 2008; Gava, Silva e Frias, 2008; Brasil, 2009b). *As bebidas com aspartame em sua composição devem inserir no rótulo a advertência de que o produto “CONTÉM FENILALANINA” (BRASIL, 1998). **valor estipulado para bebidas não alcólicas gaseificadas e não gaseificadas.

Os refrigerantes são caracteristicamente bebidas carbonatadas com teor de CO₂ variando de 1,5 a 5,0 g/L (LAWLOR et al., 2009). A legislação brasileira estabelece que o refrigerante deve apresentar gaseificação igual ou superior a 2,5V (volumes) de CO₂. O refrigerante que for adicionado de até 2,5V de CO₂ deve ter a inscrição levemente gaseificado no rótulo (BRASIL, 2013). O gás carbônico torna a bebida mais ácida e em conjunto com o pH ácido (faixa de 2,5-4,0) contribui para a estabilidade microbiológica das formulações. As colas comumente, apresentam pH na faixa de 2,5 a 2,8 e são acidificadas com ácido fosfórico (SPLITTSTOESSER e RANSOM, 1992; BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010; KRIEGEL, 2015). Os ácidos cítrico, fumárico e málico também podem ser utilizados, porém a concentração máxima

permitida para o ácido fosfórico e tartárico é, respectivamente, 0,07 g/100mL e 0,5 g/100mL (BRASIL, 2007a).

Os acidulantes permitem que os conservadores atuem com maior eficiência em bebidas que possuam pH ácido ou que possam ser acidificadas (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008). Os conservadores mais comumente utilizados em refrigerantes são o ácido benzoico e seus sais (benzoato de sódio e potássio) e o ácido sórbico e seus sais (sorbato de sódio e potássio) (DONG e WANG, 2006; LINO e PENA, 2010). A RDC nº5/2007 da Anvisa (BRASIL, 2007a) estabelece os limites máximos para bebidas com gás são de 0,03 g/100mL (expressos em ácido sórbico) e 0,05 g/100mL (expressos em ácido benzoico). A sua principal função é prevenir a multiplicação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SANTOS et al., 2015).

Os corantes e os aromatizantes são adicionados aos refrigerantes com o objetivo de intensificar a cor e o aroma, respectivamente. A adição de corantes às formulações se justifica, pois, tornam a bebida mais atrativa ao consumo, auxiliam a correção de pequenas variações no processamento e armazenamento e contribuem para o reconhecimento da identidade do produto pelo consumidor (KRIEGEL, 2015). Existem basicamente três categorias de corantes: naturais, artificiais e caramelos. Em refrigerantes de laranja e de uva, destaca-se o uso de corantes artificiais, dentre eles: amarelo tartrazina, amarelo crepúsculo, amaranço ou Bordeaux S, azul brilhante. O corante caramelo (caramelo I-simples, caramelo II – processo sulfito cáustico, caramelo III-processo amônia e caramelo IV – processo sulfito amônia) está presente nas formulações de guaraná e cola (OS CORANTES..., 2009). Os corantes artificiais são obtidos através de síntese química e não ocorrem em produtos naturais. Quimicamente os corantes sintéticos são classificados em cinco categorias: derivados do amarelo de quinoléina, grupo triaril-metano, xantinas (como a eritrosina), corantes índigo e aminas aromáticas ou estrutura azoica aromática que apresenta o grupo azo $-N=N-$ (MPOUNTOUKAS et al., 2010) e dificilmente pode ser sintetizado sem a produção concomitante de contaminantes. O corante amarelo crepúsculo, o amarelo tartrazina e vermelho 40 são denominados compostos azoicos (MÍDIO e MARTINS, 2000; FREITAS, 2012).

A Tabela 5 apresenta os nomes comerciais, a cor referente a cada corante, o código de acordo com o Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares⁶, a ingestão diária

⁶ Cabe ao Codex Alimentarius a elaboração do Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares. O Codex foi criado pela Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com o objetivo de desenvolver normas alimentares internacionais harmonizadas que protegem a saúde dos consumidores e promovem as boas práticas no comércio de alimentos. Fonte: CODEX, 2016.

aceitável segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*) e a OMS (*Organização Mundial da Saúde*) e os limites máximos preconizados pela legislação para bebidas não alcóolicas.

Tabela 5: Corantes artificiais - nome, cor, código, ingestão diária aceitável e limites máximos permitidos em bebidas não alcóolicas.

Nome	Cor	Código*	IDA (mg/kg de peso corpóreo)	Limite máximo (g/100mL)
Amaranto ou Bordeaux S	Magenta	INS 123	0,50	0,005
Amarelo crepúsculo FCF, amarelo Sunset	Laranja	INS 110	2,50	0,01
Azul brilhante	Azul turquesa	INS 133	10	0,01
Tartrazina	Amarelo limão	INS 102	7,50	0,01

Fonte: MÍDIO e MARTINS, 2000; BRASIL, 2001; BRASIL, 2007a; OS CORANTES, 2009.
*INS – *International Numbering System*

3.1 Refrigerantes de laranja

Os refrigerantes à base de sucos de fruta possuem como principal apelo ser fonte de vários nutrientes e compostos bioativos como fibras, minerais, vitaminas e antioxidantes. Os sucos naturais ou concentrados além de contribuir para a doçura da bebida, podem representar importante fonte de contaminação. No caso específico de refrigerante de laranja, o suco pode vir conservado com benzoato de sódio, de forma a minimizar esse risco. Nesse tipo de bebida ainda se observa a adição de hidrocolóides ou espessantes como goma guar, goma xantana ou pectina que objetivam evitar a separação de fases (KRIEGEL, 2015). O padrão de identidade e qualidade (PIQ) para refrigerante de laranja estabelece que essa bebida deve ter, no mínimo 10% (v/v) de suco de laranja a 10,5°Brix e acidez titulável maior do que 0,1 grama de ácido cítrico por 100 mL de refrigerante (BRASIL, 1998; BRASIL, 2009a).

3.1.1 A formação de benzeno em refrigerantes de laranja

Os refrigerantes de laranja apresentam em sua composição ácido ascórbico⁷. Sob determinadas condições, a sua combinação com ácido benzoico pode resultar na formação de benzeno⁸ em bebidas (NYMAN et al., 2008), apesar do ácido benzoico ser reconhecido como um aditivo seguro ou GRAS (*generally recognized as safe*) (OGA, 2003). Vários estudos demonstraram a presença de benzeno em limites acima daqueles considerados seguros em refrigerantes de laranja e sucos industrializados (FDA, 2006; SYAL, 2006; FDA, 2007; CAO et al., 2007; PROTESTE, 2009). As condições favoráveis para a formação de benzeno em bebidas consistem em elevadas temperaturas e exposição à luz (NYMAN et al., 2010). O mecanismo de reação envolvido propõe que alguns metais de transição como o cobre II (Cu^{+2}) e o ferro III (Fe^{+3}), presentes, provavelmente, na água utilizada para a fabricação das bebidas, podem catalisar a redução de um elétron de oxigênio por ácido ascórbico para produzir o radical ânion superóxido, o qual sofre dismutação espontânea e forma peróxido de hidrogênio, podendo gerar o radical hidroxila (OH^{\cdot}), capaz de descarboxilar o ácido benzoico, resultando na formação de benzeno. Cabe destacar que a presença de ambos os sais benzoato e ácido ascórbico nas bebidas não resulta, necessariamente, na presença de benzeno no produto final (GARDNER e LAWRENCE, 1993). Algumas medidas podem promover a redução ou eliminação do benzeno, são elas: adição de agentes quelantes como EDTA e hexametáfosfato de sódio, substituição/eliminação do ácido ascórbico nas formulações, avaliação das condições de estocagem e prazo de validade das bebidas (ICBA, 2006). A legislação brasileira não estabelece limites de benzeno em bebidas, tendo sido adotado os mesmos valores estipulados para água potável ($5\mu\text{g/L}$). No Brasil, em 2011, foi firmado um termo de ajustamento de conduta (TAC) entre os maiores fabricantes de refrigerantes e o Ministério Público Federal em Minas Gerais (MPF/MG). As empresas terão no máximo 5 anos para reduzir os níveis de benzeno (SOUZA, 2011).

⁷ O ácido ascórbico aumenta a vida útil da bebida, impedindo a formação de sabor indesejado, pois os componentes aromáticos da bebida, podem combinar-se com o oxigênio, produzindo modificações no sabor.

⁸ O benzeno é reconhecido pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como carcinogênico ao homem e sua presença em alimentos tem sido atribuída a vários fatores: embalagem, ambiente de armazenamento, água potável contaminada, cozimento, irradiação e degradação do conservador benzoato de sódio. (Fonte: Santos et al., 2015).

3.1.2 As alergias alimentares e os corantes artificiais empregados em refrigerantes de laranja

Muitos experimentos vêm sendo realizados em animais no intuito de verificar o efeito dos alimentos com corantes artificiais no surgimento de alergia e/ou intolerância alimentar, como asma brônquica, rinite e urticária, além de desordens gástricas e neoplasias da glândula tireoide e do trato gastrointestinal (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005; SCHUMANN, POLÔNIO e GONÇALVES, 2008). Em refrescos em pó, balas e refrigerantes de laranja os corantes sintéticos mais utilizados são o amarelo tartrazina e o amarelo crepúsculo (OSTROSKI, BARICATTI e LINDINO, 2005).

Merece destaque que a tartrazina é inquestionavelmente um dos corantes artificiais mais controversos. Estudos associaram seus efeitos deletérios ao fígado (alteração das enzimas hepáticas), ao sistema reprodutor masculino, a citotoxicidade e citostaticidade em linfócitos humanos e danos ao DNA (MEHEDI et al., 2009; AMIN, HAMEID e ELSTTAR, 2010; MPOUNTOUKAS et al., 2010; AXON et al., 2012). Entretanto, outros estudos consideraram a tartrazina como um aditivo seguro, respeitando-se o consumo de acordo com a IDA (ingestão diária aceitável) (MOUTINHO, BERTGES e ASSIS, 2007; TANAKA, 2009; POUL et al., 2009). Importa considerar também que crianças e adolescentes tendem a consumir mais corantes artificiais em sua dieta do que adultos, pois observa-se uma maior ingestão de balas, cereais matinais e bebidas coloridas (STEVENS et al., 2014), podendo, possivelmente, ultrapassar a IDA.

O corante amarelo crepúsculo, que é produzido a partir de compostos aromáticos derivados de hidrocarbonetos de petróleo, também tem sido relacionado a genotoxicidade e efeitos imunomoduladores e xenoestrogênicos (AXON et al., 2012; SAYED et al., 2013; CEYHAN et al., 2013; YADAV et al., 2013).

Alguns estudos têm sido conduzidos com intuito de avaliar os teores de corantes artificiais em bebidas, sobretudo do corante amarelo tartrazina, devido ao seu envolvimento em reações alérgicas (asma, bronquite, rinite, náuseas, broncoespasmos, urticária, eczema e dor de cabeça) (BRASIL, 2007b) em consumidores. Neste sentido, a Anvisa regulamentou, através da Resolução n.340/02 (BRASIL, 2002) que as empresas fabricantes de alimentos que contenham em sua composição o corante amarelo tartrazina devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso.

Os dados disponíveis na literatura sobre o teor de tartrazina em bebidas encontram-se sumarizados na Tabela 6. Observa-se que as amostras analisadas se apresentam em

concordância com o disposto pela legislação brasileira. Contudo, deve-se considerar que mesmo as bebidas se apresentando dentro dos limites estabelecidos, o que determinará se a IDA foi ultrapassada ou não, é a porção consumida, a diluição, a idade/massa corporal e a frequência de consumo dos alimentos fontes dos corantes (ABRANTES, 2011).

Tabela 6: Teor de tartrazina em amostras de bebidas comercializadas no Brasil.

Alimento	Teor mínimo encontrado	Teor máximo encontrado	Fonte
			Reis et al. (2010)
Refrigerantes	2,93 mg/ 100ml	3,60 mg/100ml	Martins, Oliveira e Kawashima (2010)
	1,04mg/100ml	1,64 mg/100ml	
Isotônicos	2,10mg/100mL	3,60mg/100mL	Piasini et al. (2014)
Refresco em pó	0,03mg/100mL	0,74mg/100mL	Martins, Oliveira e Kawashima (2010)

4. Refrigerantes: Tecnologia

4.1 Tratamento da água do processo

De modo geral, as principais etapas de tratamento da água na indústria de refrigerantes incluem cloração, abrandamento, floculação e posterior separação de partículas (por decantação ou flotação), filtração em filtro de areia, supercloração, filtração por carvão ativado e polimento final (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010). É importante esclarecer que a água pode conter vários íons que promovem a alteração do sabor da bebida, especialmente o íon cloro. Os fabricantes costumam abrandar a água com esse objetivo. Os métodos mais comuns são resina de troca iônica e osmose reversa. O ideal é que a concentração de sais de cálcio e magnésio seja reduzida para 50ppm (KRIEGEL, 2015).

Os padrões de potabilidade da água preconizados pela legislação brasileira exigem ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100mL. A contagem de bactérias heterotróficas não deve ultrapassar 500UFC/mL. A legislação ainda estipula o monitoramento de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* As principais análises físico-químicas indicadas para controle da qualidade da água tratada são: pH, sulfato, alcalinidade, turbidez, cloretos, dureza, ferro, alumínio, cloro, sólidos totais dissolvidos, cor, odor e gosto (BRASIL, 2011).

O processamento de refrigerantes, de forma simplificada, envolve as etapas de produção de xarope simples, produção de xarope composto e fabricação da bebida. O fluxograma descrito abaixo (Figura 5) resume o processo de industrialização de refrigerante.

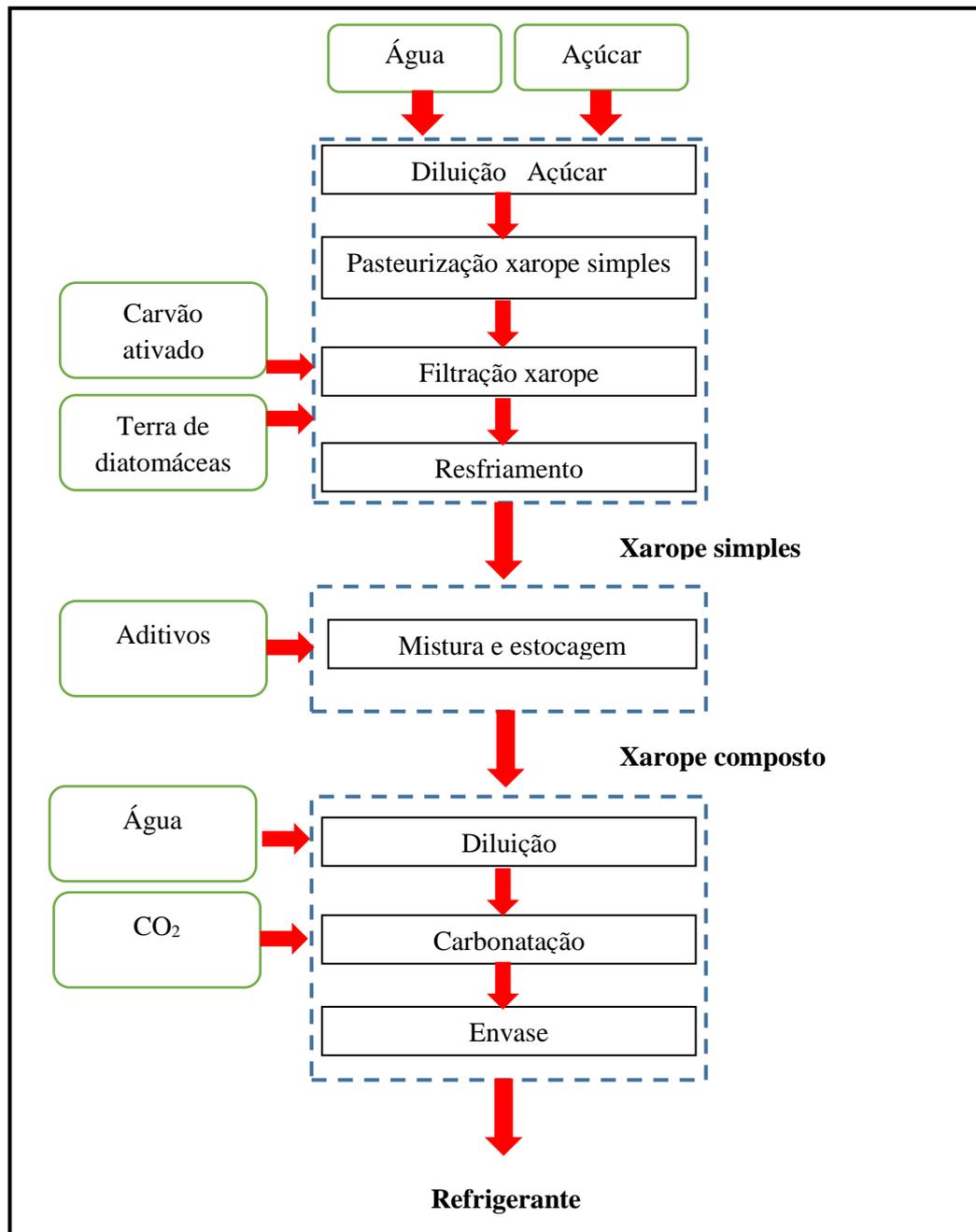


Figura 5: Processo de industrialização de refrigerante. Fonte: SANTOS e RIBEIRO (2005), modificado.

4.2 Produção de xarope simples

Industrialmente, o preparo do xarope é feito na sala denominada xaroparia. O xarope simples ou calda base é o produto da diluição do açúcar cristal em água. A concentração usual para refrigerantes é de 60 °Brix (60 g de sacarose para 100 gramas de solução). O xarope simples pode ser obtido de acordo com os seguintes métodos (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010):

- a) Processo a frio – Consiste na diluição do açúcar em água na temperatura ambiente.
- b) Processo a frio acidificado – o produto é obtido com adição de ácido cítrico ao xarope simples frio, o qual fica menos sujeito a deterioração microbiológica.
- c) Processo à quente⁹ - a mistura de água e açúcar é aquecida para facilitar a dissolução dos carboidratos e impedir a multiplicação microbiana. A dissolução do açúcar deve ocorrer sob agitação constante. Após a dissolução completa do açúcar, a temperatura é elevada para 85°C ±5°C. Este processo também pode ser denominado de pasteurização.
- d) Processo a quente acidificado – Adiciona-se ácido cítrico ao xarope antes ou durante o aquecimento, obtendo-se a inversão total ou parcial da sacarose. Com a acidificação, a estabilidade microbiológica é melhorada.
- e) Xarope de alta densidade – Possui concentração de, no mínimo, 67°Brix, mais apropriado para estocagem.

A preparação de bebidas com edulcorantes ocorre através da dissolução do produto em água, em tanque de aço inox; não sendo necessário pasteurizar ou adicionar o carvão ativado (CELESTINO, 2010).

4.3 Filtração do xarope

O carvão ativado é adicionado nesta etapa objetivando a clarificação do xarope, na proporção de 2 a 5 gramas por Kg de açúcar. O carvão ativo adsorve impurezas responsáveis pelo sabor, odor, cor e turvação. Além disso, é adicionado um coadjuvante de filtração (terra infusória) na mesma quantidade do carvão, para facilitar a filtração do xarope. A etapa seguinte é a filtração deste xarope, usando terra de diatomácea como auxiliar de filtração. Esta operação tem por finalidade separar o carvão ativado, a terra infusória e outras partículas, resultando na sua clarificação. O xarope simples é posteriormente resfriado em trocador de calor até a

⁹ As médias e grandes indústrias de bebidas utilizam esse processo, enquanto o pequeno industrial utiliza o processo a frio acidificado (CELESTINO, 2010).

temperatura de 15-20°C em trocadores de calor (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010; CELESTINO, 2010).

4.4 Produção de xarope composto

O xarope composto é o produto obtido da mistura do xarope simples com os demais ingredientes. Os aditivos incorporados nessa etapa são responsáveis pela caracterização da cor, sabor e aroma do produto final.

A sequência de adição dos ingredientes deve ser obedecida de forma a evitar precipitações e turvações: xarope simples, conservador, acidulante, antioxidante, suco de fruta ou extrato, aromatizantes, corantes e água deionada (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010; CELESTINO, 2010).

No caso dos extratos, cita-se o emprego em refrigerantes de cola e guaraná. Este último, é obtido de sementes de planta de guaraná, que passam por um processo de torrefação, moagem e depois são encaminhadas para a fabricação de um extrato, com o auxílio de solventes orgânicos e extratores rotativos. O extrato é então enviado para a fábrica de aromas, e misturado a aromas, óleos essenciais e corantes, torna-se o concentrado líquido de guaraná. Nas fábricas, é combinado ao xarope de guaraná, ficando com um sabor mais doce, próximo ao da finalização da bebida (CAVALCANTI, 2013).

O teor de sólidos solúveis (°Brix) final da bebida é ajustado e a agitação deve ser mantida para garantir a homogeneização de todos os ingredientes, especialmente dos conservadores e evitar a admissão de ar.

4.5 Processo de diluição, carbonatação e envase

Para a fabricação do refrigerante propriamente dito, o xarope composto é adicionado de água tratada e acrescido de CO₂. O equipamento denominado proporcionador é responsável por combinar as proporções corretas entre a água tratada e o xarope composto. Os elementos chave do proporcionador são: desaerador, proporcionador, unidade de carbonatação e unidade de resfriamento. A combinação de CO₂ é efetuada em um equipamento denominado *carbo-cooler*. Nota-se que o nível de oxigênio dissolvido na água e no xarope deve ser baixo de forma a melhorar as condições de carbonatação. O nível de carbonatação inicial do refrigerante, ou seja, o volume de CO₂ que está dissolvido no líquido é definido em função do sabor do produto. A quantidade de gás na bebida afetará a estabilidade microbológica, o sabor e o aroma do refrigerante. Em seguida, ocorre o resfriamento da mistura. O resfriamento a 2°C para o

enchimento a frio minimiza a criação de espuma na enchedora (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010, CELESTINO, 2010). Merece destaque que algumas pequenas empresas, realizam somente esta parte do processo, recebendo o xarope composto para diluição, carbonatação e envase (SANTOS e RIBEIRO, 2005).

A bebida final é enviada para a enchedora, que recebe as garrafas PET higienizadas, através de *rinser*. A enchedora preenche a bebida até o nível correto, transferindo automaticamente a embalagem para a capsuladora (colocação da tampa de fechamento) e, por último, para fechamento (CELESTINO, 2010)

Para o envase de garrafas de vidro faz-se necessário antes encaminhá-las para um equipamento denominado lavadora de garrafas, onde os vasilhames serão lavados com solução de soda cáustica à quente e posteriormente enxaguados com água para sua adequada desinfecção (SANTOS e RIBEIRO, 2005).

5. A perda de qualidade dos refrigerantes

De modo geral, as principais deteriorações dos refrigerantes compreendem a turvação do líquido, formação de sedimentos, alterações de sabor e odor, alteração no teor de sólidos solúveis (Brix) e presença excessiva de gases (que podem levar ao estufamento do recipiente e estouro do mesmo) (BARNABÉ e VENTURINI FILHO, 2010). Por outro lado, a perda de carbonatação também representa um grande inconveniente, especialmente para as bebidas embaladas em PET. Neste caso, o refrigerante pode se tornar suscetível a contaminação por fungos filamentosos, embora, devido as suas características intrínsecas, sejam bebidas consideradas bastante estáveis do ponto de vista microbiológico (LAWLOR et al., 2009). As etapas críticas do processo de fabricação constituem a pasteurização/resfriamento do xarope simples e a homogeneização dos conservadores na preparação do xarope composto.

6. Considerações finais

O Brasil ocupa a terceira posição em termos de consumo de refrigerantes no mundo. A presença do refrigerante na mesa/dieta do brasileiro é evidente. Entretanto, esse mercado denota ligeira retração, oriunda não só das questões relacionadas ao apelo nutricional, mas também da situação econômica atual e ainda da existência dos riscos associados à saúde, notadamente ao consumo excessivo de corantes artificiais e aos conservadores. A indústria de refrigerantes está sob pressão, tanto dos órgãos regulamentadores quanto dos consumidores, que anseiam por

produtos com apelo mais natural, sustentável e saudável. Desse modo, o uso de ingredientes naturais; a eliminação de corantes artificiais e a diminuição da concentração de conservadores também podem fazer parte de um planejamento em busca do aumento de consumo e conquista de novos nichos de mercado. Outro aspecto interessante, é o desenvolvimento de novos sabores de bebidas de frutas, explorando o potencial da fruticultura brasileira, em atendimento aos interesses de uma nova geração que se preocupa mais com a relação entre a qualidade de vida e saúde.

CAPÍTULO II

**AN OVERVIEW OF MICROORGANISMS AND FACTORS
CONTRIBUTING FOR THE MICROBIAL STABILITY OF
CARBONATED SOFT DRINKS.**

Denise R.P.Azeredo^{a*}, Verônica Alvarenga^b, Anderson S. Sant'Ana^b, Armando U.O. Sabaa Srur^a

^aDepartment of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ
– Brazil.

^bDepartment of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas,
Campinas, SP - Brazil.

Running title: Microbiology of soft drinks.

***Corresponding author:** D.R.P. Azeredo (denise.perdomo@uol.com.br).

Abstract

Soft drinks, which are largely produced and consumed worldwide, are acidic beverages (pH 2.5-4.0), formulated with water, sucrose, carbonated with 1.5-5.0 volumes of CO₂, and added or not with chemical preservatives and fruit juices. A simplified manufacturing process of soft drinks consists of water treatment, production of simple syrup, production of compound syrup, carbonation and filling. As any other food and beverage, soft drinks can be contaminated by microorganisms; however, the low pH caused by the addition of acidulants, the presence of preservatives, and the presence of CO₂ comprise major barriers to microbial growth. Because of these characteristics, filamentous fungi and some bacteria, including pathogens, do not pose spoilage and safety risks for soft drinks. On the other hand, because of their tolerance to acidic environments and CO₂, both yeasts and aciduric bacteria can survive and deteriorate soft drinks. This review deals with the microorganisms of relevance, as well as with the factors influencing their survival and role on soft drink spoilage.

Keywords: soft drink, soda, food spoilage, shelf life, food safety, beverages, stability.

1) Introduction:

Soft drinks are defined as carbonated or non-carbonated beverages containing sugars or artificial sweeteners, acidulants, flavorings, colorings and preservatives. Soft drinks are produced by dissolving juices or vegetable extracts in drinking water. Most soft drinks are sweetened with aspartame, acesulfame K, saccharin and cyclamate, while regular soft drinks are sweetened with crystallized or liquid sucrose (Barnabe & Venturini Filho, 2010, Cruz, 2012). In some countries, regulations establish not only the specification but also the minimum amount of juice or extract to be added to these beverages. Regular soft drinks contain approximately 90% water, while diet soft drinks contain up to 99% water (Cruz, 2012). Filling can take place in standard or clean packaging lines (Wareing and Davenport, 2004) and these products may be available for consumption in post mix machines (soda fountains), polyethylene terephthalate (PET) bottles, glass or can containers.

Soft drinks have markedly acidic pH (2.5-4.0), 1.5 to 4 volumes of carbon dioxide (CO₂), with typical carbonation level of about 3 volumes. Cola-type soft drinks commonly present pH in the range of 2.5 to 2.8 and are acidified using a diluted phosphoric acid solution (Barnabé & Venturini Filho, 2010, Brasil, 2009, Splittstoesser & Ransom, 1992). The low pH caused by the addition of acidulants, the addition of preservatives and CO₂ comprise major barriers to microbial growth in soft drinks. On the other hand, the presence of sugars represent an important source of energy for microbial growth (Wareing and Davenport, 2004). Therefore, microorganisms of concern in soft drinks are usually adapted to grow in acidic environments in the presence of preservatives and CO₂. Nonetheless, with recent changes in consumers' behavior related to health and wellness (Ares et al., 2008) and regulations by public health agencies throughout the world, industries have promoted changes in their products and processes. Innovations in the field of soft drinks comprise the development of new tastes, addition of not only higher amounts of juices, pulps and fruit cells, but also the addition of

health-appealing beverages (containing collagen, herbs, etc.), use of natural colorants, low calorie formulations (reduction in sugar content), addition of proteins, and removal of chemical preservatives from soft drinks formulations, among others (DataMonitor, 2013). While addressing consumer's and health authorities concerns, these changes will certainly influence the microbiology of soft drinks. Therefore, the aforementioned changes in soft drink processing and formulation have the potential to greatly impact on the entire soft drink production chain. For example, in order to produce soft drinks with no preservatives, the use of raw materials and ingredients of very high microbiological quality will be mandatory. In addition, extremely high hygienic standards and validated sanitation practices will have to be in place to ensure the shelf life of these products. Even transportation conditions and shelf life of these products might require further improvements.

Ensuring the microbiological safety of soft drinks is a challenge for both the industry and microbiologists. Although filling technology coupled with preservation methods are applied to ensure shelf-stable products, a few groups of microorganisms can still compromise the microbial stability of these beverages. The limited literature on the subject has motivated this article, which aims at focusing on the microbiology (contaminants) of soft drinks. Thus, in this review, the microorganisms of relevance in soft drinks and the major factors contributing for their microbial stability as well as the main sources of microbiological contamination are reviewed. Taking into consideration the characteristics of relevant microorganisms and factors influencing their fate in soft drinks comprises very valuable information to deal with the aforementioned challenges and to advance our understanding of the microbiological aspects related to these products.

2) *An overview of soft drink processing:*

In order to understand the impacts of processing on microorganisms, a general overview of the production of carbonated soft drinks is presented (*Figure 1*). The manufacturing process of carbonated soft drinks, in a simplified form, consists of water treatment, production of simple syrup, production of compound syrup, carbonation and filling. Specific steps and conditions can vary depending on the factory, country and type of carbonated soft drink produced.

Insert Figure 1 here.

The raw materials used in the manufacture of soft drinks should be stored as recommended by the good manufacturing practices in order to avoid contamination of chemical, physical and microbiological nature. At the reception, the reports of the suppliers should be checked to assess conformity with internal and regulation standards, and a sampling program should be established to verify the accuracy of the information through analysis performed in an outsourced laboratory. A major concern at this step is the microbiological contamination of raw materials by spoilage microorganisms, for instance by preservative-resistant yeasts, such as *Zygosaccharomyces bailii* and *Z. rouxii* (Frisón et al., 2015, Stratford et al., 2013). As preservative-resistant yeasts are present in the processing plant, given their resistance to certain sanitizers (Frisón et al., 2015, Davidson and Harrison, 2002), they may remain in the environment and be responsible for spoilage. *Alycyclobacillus* represents another bacterium of concern in raw materials intended for soft drink production. *Alycyclobacillus* is a sporeforming, acidophilic and thermophilic bacterium that is highly associated with spoilage of fruit juices and concentrates (Oteiza et al., 2011, Oteiza et al., 2015). Other ingredients used for soft drinks production, such as flavorings, have also recently proved to be potential sources of *Alycyclobacillus* spores (Oteiza et al., 2014). The concerns with the presence of *Alycyclobacillus* in raw materials is explained by the fact that *Alycyclobacillus* strains survive through harsh thermal processing conditions (Spinelli et al., 2009, 2010) and are capable of deteriorating

acidic foods and beverages (Chang and Kang, 2004). Although *Alycyclobacillus* does not grow in the presence of high CO₂ levels, such as soft drinks (Chang and Kang, 2004), there is a concern that this bacterium may be able to deteriorate low-carbonated beverages.

The production of soft drinks requires the preparation of the simple syrup (*Figure 1*). The simple syrup is produced by mixing water and sucrose in a stirring tank. After mixing, the simple syrup is pasteurized at 85 °C for 5 minutes (or equivalent) to facilitate the sugar dissolution and to inactivate spoilage microorganisms potentially present in the ingredients. Thereafter, microbial contamination is very critical because there will be no further killing treatments (*Figure 1*). This fact highlights the pivotal importance of appropriate ingredient selection and the application of good manufacturing practices to build and select equipment that will allow in maximum efficiency of sanitization procedures as well as the application of validated hygienic and sanitization procedures. After pasteurization of the single syrup, single syrup is pasteurized, activated charcoal is added aiming at clarifying the syrup, followed by filtration using diatomaceous earth. Then, the simple syrup is maintained cooled at 20°C until mixed with other ingredients to result in the compound syrup. To avoid precipitation and turbidity, the ingredients should be added in the following order: simple syrup, preservative (when added), acidifying agent, antioxidant, fruit juice or extract, flavoring, coloring and dechlorinated water. The total soluble solids content (°Brix) of soft drinks are then adjusted, and the mixture should be stirred to mix all ingredients, especially the preservatives, thus preventing air incorporation (*Figure 1*). The mixture containing the compound syrup and water is previously prepared in a carbo-cooler beverage processor, which automatically doses the amounts of each ingredient. The level of dissolved oxygen in water and syrup should be low to improve the carbonation process. Then, the mixture is cooled, followed by the carbonation step. The carbonation process consists of injecting CO₂ in soft drinks. The initial carbonation level, *i.e.*, the amount of CO₂ dissolved in the liquid, is established according to the desired taste of

the product. The CO₂ level affects the microbiological stability (pH related), taste perception, and aroma release of soft drinks. After the carbonation step, the soft drink is filled into PET bottles, glass, cans or other containers (post mix, for example), which are further sealed and stored (*Figure 1*). The filling procedure comprises another critical step for microbial contamination of soft drinks. Filling machines that are not properly cleaned and sanitized may comprise potential sites for adhesion of microbial contaminants capable of spoiling soft drinks, such as lactic acid bacteria and preservative-resistant yeasts (Frisón et al., 2015, Stratford et al., 2013, Tribst et al., 2009).

3) Microorganisms of importance in carbonated soft drinks:

3.1) Spoilage Microorganisms:

Microbial spoilage of soft drinks is typically characterized by visual changes and off-flavors (Juvonen et al., 2011). The spoilage becomes apparent when the microbial concentration is higher than 10⁵ CFU/mL (Stratford, 2006, Tribst et al., 2009).

Microorganisms must be able to grow in the presence of CO₂, and to withstand acidic conditions and presence of chemical preservatives to spoil soft drinks (Stratford, 2006, Lawlor et al., 2009, Tribst et al., 2009). Although these factors exert a selective pressure on acidophilic and anaerobic microorganisms, the addition of some ingredients, such as fruit juices, proteins, and other natural ingredients can result in less microbiologically stable formulations of soft drinks. Although the presence of essential oils in some soft drinks, especially essential oil from citrus fruits, may confer antimicrobial effects, it does not seem to be an effective barrier to microbial growth (Beuchat and Golden, 1989). In the absence of carbohydrates, other compounds, for instance, aspartame and citric acid can be nitrogen and carbon sources for microbial growth, respectively (Lawlor et al., 2009).

3.1.1) Yeasts:

Yeasts are the main contaminants and spoilers of soft drinks because of their natural occurrence in ingredients used for soft drink production, such as sucrose and fruit juices, as well as because of their ability to grow in acidic and carbonated environments (Stratford, 2006). Although yeasts do not represent a risk to consumer's health (Ndagijimana et al., 2004), they compromise the image of the company (perceived safety) and can lead to serious economic losses (Loureiro and Queiroz 1999).

The spoilage of soft drinks by yeasts is usually characterized by abundant CO₂ production, which can lead to bulging and bursting of the bottle, excessive effervescence when opening the bottle, turbidity, sediments, production of undesirable flavor and aroma compounds, such as "fruity", "keto", and "alcoholic" odors (Stratford et al, 2000, Lawlor et al, 2009, Juvonen et al, 2011). A significant decrease in total soluble solids (°Brix) in soft drinks spoiled by yeasts is also observed.

The spoilage of processed and packaged foods seems to be restricted to ten yeast species – *Dekkera bruxellensis*, *D. hansenii*, *Issatchenkia orientalis*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii*, *Z. bisporus*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Saccharomyces exiguus*, which are commonly associated with soft drinks spoilage (Pitt & Hocking, 1999). Davenport (2006) proposed a division of yeasts into four groups depending on the risk they pose for soft drink spoilage. Fermentative and preservative-resistant yeasts represent group 1 (the high risk group), while group 2 consists of yeasts that spoil soft drinks because of deficiencies in processing conditions, such as sanitation problems. The yeasts from group 3 are not spoilers of soft drinks but serve as indicators of inadequate hygiene, whereas group 4 embraces yeasts that can be isolated from soft drinks, but are not common contaminants and do not grow in these products (Davenport, 2006, Stratford and James, 2003). This division may be important for a suitable classification

of ingredients in terms of potential impacts on soft drink microbial stability, supplier's selection, to define strategies for improvement of soft drinks formulations and to improve hygienic practices applied in processing environment. Nonetheless, the concepts behind this division will be better used for management of soft drink microbial stability if yeasts isolates are characterized for their growth and spoilage potential as well as phenotypical characteristics (resistance to preservatives and sanitizers). This is highlighted because the behavior and characteristics of yeasts may be strain-dependent and new species may be identified with a certain behavior that is not yet known.

Soft drink contamination by yeast may be originated from several sources, including ingredients, returnable bottles, equipment, food handlers, and air vectors. In addition, some insects, such as the fruit fly *Drosophila* spp, may carry spoilage yeasts (Lachance, 2001). Despite this, it is known that yeasts are mostly linked to poor hygiene during the manufacturing process. High yeast populations may be associated with inappropriate use of sanitizing products, incorrect frequency, and problems of heat transfer during cleaning in place (CIP) system (Lawlor et al., 2009). The CIP procedure conducted with hot water is required each time the production line is prepared to process a soft drink of a different flavor. The chemical CIP should be performed daily both at the beginning and in the end of the production process. Moreover, the process water can be a potential carrier for yeasts, so the analysis should also be considered for controlling the entire process. The ambient air sampling at specific points (filler, rinser, stock and transportation of bottles, syrup production room, stock and transportation of caps, filling line) is relevant, since filamentous fungi and yeasts are carried by air streams and may contaminate soft drinks. It is recommended to monitor the air quality and the critical production sites in order to identify the areas of greatest risk and, therefore, to implement appropriate preventive actions accordingly. According to Lawlor et al. (2009), sucrose is the primary source of fermentable carbohydrate for the growth of microorganisms in acidic medium

and in the presence of CO₂. If not stored properly, sucrose can be a vector of spoilage yeasts. The main sources of yeasts associated with soft drinks manufacture are summarized in *Table 1*.

Insert Table 1 here.

3.1.2) Filamentous fungi:

Conidia or spores of filamentous fungi and mycelial fragments present in the environment can contaminate soft drinks environment in response to hygienic failures along the processing line, poor quality of raw materials and/or use of contaminated packaging (Filterborg et al. 2004, Juvonen et al., 2011, Delgado et al., 2012a,b). The packages caps may also be a contamination source. Sato (2010) investigated filamentous fungi in a factory of plastic caps for soft drinks and found that 47 filamentous fungi species were isolated from 52 swabs and air samples. The most contaminated areas were the cover checking room followed by the storage room of resins.

Although some species can grow under anaerobic conditions, such as *Fusarium*, *Rhizopus* (Filterborg et al., 2004, Scholte et al., 2004), *Byssochlamys* and other heat resistant molds (Sant'Ana et al., 2010a,b), most molds are aerobic (Pitt & Hocking, 1999) and therefore inhibited in environments with low oxygen tension. In soft drinks, the CO₂ loss in PET (polyethylene terephthalate) packaging due to improper storage can promote spore germination of filamentous fungi and consequent spoilage. Therefore, glass and metal packagings provide less gas exchange. According to Mislivec et al. (1992), the presence of visible mycelium may be the main reason for consumers rejecting these products. According to Hara-Kudo et al. (2009), filamentous fungi are the major cause of claims registered on the customer care service in Japan, with 91 cases related to the closed packaging and 138 cases involving opened packages.

The spoilage of soft drinks by filamentous fungi can result in off-flavor. The numerous enzymes resulting from fungal metabolism (lipases, proteases, carbohydrases) can promote the discoloration of the beverage (Juvonen et al., 2011) and some fungi strains are able to produce toxigenic compounds, such as aflatoxins (Sant'Ana et al., 2008, Sant'Ana et al., 2010b, Pitt and Hocking, 2009).

3.1.3) Acid producing bacteria:

The two major groups of acid producing bacteria associated with soft drink spoilage are lactic acid bacteria and acetic acid bacteria (Back et al., 1999, Juvonen et al., 2011, Tribst et al., 2009).

Lactic acid bacteria include *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella*, among others. In the group of acetic acid bacteria, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* and *Asaia* stand out as the major concerns for soft drink spoilage (Juvonen et al., 2011, Tribst et al., 2009, Yamada and Yukphan, 2008). *Lactobacillus* and *Leuconostoc* seem to be the most important genera of lactic acid bacteria associated with soft drink spoilage (Back et al., 1999). For example, *Lactobacillus perolens* was isolated from a fruit soft drink (orange and lemon), conferring off-flavor to the beverage (production of high amounts of diacetyl) (Back et al., 1999). *Leuconostoc mesenteroides* is commonly found in sugar cane fields is of paramount concern because it is capable of fermenting sucrose, producing dextrans that block pipes and lead to economic losses. *Lactobacillus* and *Streptococcus* may also produce lower molecular weight dextrans (Aquino and Franco, 2008), thus forming biofilms. In the acetic acid bacteria group, *Gluconobacter oxydans* and *Gluconoacetobacter sacchari* seem to be the concerns for carbonated soft drinks and flavored water spoilage (Battey and Schaffner,

2001, Moore et al., 2002b). *Asaia* species have been described as spoilage organisms of fruit-flavored bottled water (Moore et al., 2002a, Horsáková et al., 2009).

The sources of contamination of soft drinks by lactic acid bacteria are ingredients (mainly fruit juices), packaging materials and surface of equipment (Lawlor et al., 2009, Tribst et al., 2009). Acetic bacteria are present in nature, such as flowers and particularly in environments containing carbohydrates and ethanol. It is worth mentioning their ability to form biofilms, so their presence in soft drinks is frequently associated with poor hygiene during the process (Raspor and Goranovic, 2008).

Although the lactic acid fermentation often converts carbohydrates into lactate, depending on the species and environmental conditions, other by-products can be formed, such as CO₂, ethanol, acetic acid, diacetyl, formic acid, and extracellular polysaccharides. Interestingly, the production of diacetyl, which confers a buttery smell, can be associated with a putrid odor by the consumer. On the other hand, acetic bacteria are capable of oxidizing sugars, organic acids and alcohols with production of acetic acid, gluconic acid, lactic acid, succinic acid, and acetaldehyde. The presence of these products leads to changes in viscosity, presence of sediments, turbidity, packaging distension and modifications in flavor (Juvonen et al., 2011, Raspor and Goranovic, 2008, Tribst et al., 2009).

3.2) *Pathogenic microorganisms:*

Pathogenic microorganisms, such as *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, do not grow in carbonated soft drinks. Pathogens lose viability rapidly when exposed to acidic and carbonated environments. Strains of *Salmonella* Derby SD37, *S.* Derby SD81 and *L. monocytogenes* inoculated in orange soft drink were not detected after 35 h inoculation when pH was 3.0, although they survived at pH 4.9 and 6.8 (Massa et al., 1998).

Although carbonated soft drinks are not adequate substrates for the growth of pathogenic microorganisms, their presence can be related to the microbiological quality of water used for processing these products. It is known that pathogens such as *Salmonella* and *E. coli* are enteric microorganisms commonly transmitted through water (Levantesi et al., 2012). Carbonated soft drinks can be contaminated with *Salmonella* spp. (at numbers ranging from 2 to 90 CFU/100 mL), total coliforms, and faecal coliforms if the water used for processing these products is not of high microbiological quality (Akond et al., 2009). Therefore, the importance of water used for processing soft drinks concerns not only from the physicochemical standpoint but also from the microbiological perspective. Water pretreatment should be applied so that microorganisms, strange flavors, microscopic and colloidal particles, organic matter, carbonates and bicarbonates, ferrous and sulfur compounds, and excess chlorides are eliminated (Varnam and Sutherland, 1994). Generally, the main steps of water treatment in the industrial plant of soft drinks include chlorination, softening, flocculation and subsequent separation of particles (by flotation or sedimentation), slow sand filtration, super chlorination, activated carbon filtration, and polishing filtration (Barnabé and Venturini Filho, 2010). Although the treatment of water for drinking purposes may allow the survival of non-pathogenic microorganisms, soft drink manufacturers cannot take any risk related to the presence of these microorganisms in the final product. Therefore, the microbiological quality of water is a major issue for soft drink producers, which is normally addressed by ensuring the application of disinfection treatments at the point of use, *i.e.*, in soft drink processing plants.

Pathogenic microorganisms loose viability in soft drinks and contamination by these microorganisms may be prevented by the use of high microbiological quality water. However, contamination by pathogenic microorganisms can also take place before consumption, such as in packages or soda fountains. Opportunistic pathogenic microorganisms, such as *Chryseobacterium meningosepticum*, *Klebsiella* species, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*,

Candida, and *Serratia* can be persistent contaminants of soda fountain machines (White et al., 2010). In addition, these microorganisms may harbor antimicrobial resistance genes that may constitute a concern for health risk sub-populations such as immunocompromised people (White et al., 2010). External contamination of packages by potentially pathogenic microorganisms suggests inadequate storage conditions (Mata et al., 2010).

1. Major factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks:

Carbonated soft drinks are stable products at room temperature, chemically preserved and cold filled. The major barriers to microbial growth in these products are: (i) low pH due to the addition of acidulants (citric acid and/or phosphoric acid), (ii) presence of preservatives, such as potassium sorbate and sodium benzoate, and (iii) CO₂ level.

4.1) pH

Acidulants are substances that increase acidity or confer a sour taste to food products. As the pH is invariably reduced, acidification is quite effective in controlling microorganisms, which increases the effectiveness of preservatives. It is known that the microorganisms are more sensitive to changes in the internal cellular pH than in the external pH. The extent of the inhibitory effect of pH is related to the ability of the microorganism to expel internal protons and repel external ions. However, the ability to maintain the internal pH close to neutrality can overload the cell, especially in an environment with low extracellular pH. If the pH is not balanced, the cell is unable to synthesize cellular components, and thus unable to divide and multiply, resulting in cellular death (Beales, 2004). Once weak acids are inside the cells, they reduce the internal pH. In contrast, strong acids cannot permeate the cell membrane, thus their antimicrobial effect relies on the denaturation of enzymes present on the cell surface and on the

acidification of cytoplasmic pH due to the migration of H⁺ ions from the external layer to the internal environment. This change in turn leads to an increased lag phase. If essential nutrients cannot be metabolized, the microbial growth will be inhibited by reducing the ion transport (Hill et al., 1995, Brown et al., 1997, Davidson et al., 2005).

Unlike most bacteria, filamentous fungi and yeasts can multiply in a wide pH range, specifically below pH 2 and above pH 9. Over time and in the absence of an effective buffer system, these microorganisms are able to shift the pH of the substrate to a value that is close to the optimum pH, usually 4 to 6.5 (Mislivec et al. 1992). Filamentous fungi become prevalent in environments with a water activity value lower than 0.9, regardless of the pH (Pitt and Hocking, 1999). Aciduric bacteria exhibit optimum growth at a pH range of 1.0 to 5.0 (Beales, 2004), and are able to grow in soft drinks. Lactic and acetic bacteria are suitable examples of these phenomena.

4.2) Preservatives

Preservatives are substances that prevent or slow food spoilage caused by microorganisms or enzymes. The preservatives commonly used in the manufacture of soft drinks are benzoic and sorbic acids, and their sodium, potassium and calcium salts. Not only these compounds but also acetic and propionic acids are considered weak monocarboxylic acids that are able to inhibit the growth of filamentous fungi and yeasts, although their effectiveness depends on the initial cell concentration (Tfouni & Toledo, 2001, Machado et al., 2007). In this regard, it is noteworthy that the effectiveness of the preservative depends on other factors, including the composition and pH of the product, redox potential of the medium, and the amount of free water for microbial growth (Barnabé and Venturini Filho, 2010).

Weak acids partially dissociate in aqueous solution, leading to a dynamic equilibrium (pH-dependent) between the undissociated and dissociated forms. The optimum inhibitory

activity occurs at low pH, which favors the undissociated molecule that is liposoluble and therefore permeable through the plasma membrane. The diffusion mechanism is relatively fast, occurring between 1 and 3 min. The molecule will dissociate upon entering the cell, resulting in the release of anions and protons in the cytoplasm, which cannot cross the plasma membrane (**Figure 2**). At high concentrations of preservatives, the release of protons is enough to cause cytoplasmic acidification, affecting the ability of cells to maintain the internal pH (Loureiro, 2000, Forsythe, 2002, Beales, 2004).

Insert Figure 2 here.

The theory that the inhibitory effect of weak acids has been attributed to intracellular accumulation of protons and anions from the acid dissociation and subsequent acidification suggests that all weak acids behave in a similar manner. However, propionic, sorbic and benzoic acids present more lipophilic structures than acetic acid. These higher hydrophobic acids are more effective in their inhibitory effect over the membrane as they become more lipophilic (Piper, 2011, Stratford et al 2013a). To evidence this fact, high levels of acetic acid (80-150 mM) are required to inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* at pH 4.5, while only 1-3 mM sorbic acid presents similar effect under the same conditions (Mollapour and Piper, 2006). One major cause of inhibition of *S. cerevisiae* cells caused by sorbic acid or benzoic acid is due to the oxidative stress caused by the generation of free radicals in the mitochondria (Piper et al., 2001, Stratford et al, 2013a). Moreover, benzoic acid is a potent inhibitor of both the substrate transport across the membrane and the microautophagy (Piper, 2011).

Although preservatives inhibit most species of filamentous fungi and yeasts, some species can grow in chemically preserved foods (Pitt and Hocking, 1999). *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Candida krusei* and *Zygosaccharomyces bailii* are examples of yeasts presenting this behavior (Battey et al., 2002, Lawlor et al., 2009). Martorell, et al. (2007) isolated *Z. bailii* and *Z. rouxii* from a factory environment with high sucrose concentration and

found that *Z. bailii* isolates exhibited high resistance to preservatives including ethanol, sorbic, benzoic, acetic, and cinnamic acids . Although these yeasts isolates were preservative-resistant, no resistance to sanitizers, such as peracetic acid or hypochlorite, was observed. Therefore, the adoption of appropriate sanitation procedures for equipments can be effective in controlling these yeasts in soft drinks processing environment.

The preservative-resistance mechanism of *Zygosacharomyces* species can be associated not only to its ability to metabolize benzoate and sorbate as a single carbon source in the presence of oxygen, but also to a small number of resistant cells in the population (Stells et al 2000, Mollapour and Piper, 2001, Stratford et al, 2013b). Members of *Saccharomyces* genus are able to decarboxylate sorbic acid, producing 1,3-pentadiene, a volatile organic compound (Stratford et al., 2007). *S. cerevisiae* also plays a role in the decanoic acid detoxification through the production of decanoate ethyl ester by β -oxidation routes (Legras et al., 2010).

Other bacteria, such *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*, are able to grow in non-carbonated beverages containing sodium benzoate and potassium sorbate (Battey and Schaffner, 2001). Among molds, *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum* are considered preservative-resistant, being able to tolerate acidic and low water activity environments (Battey and Schaffner, 2001).

4.3) Carbonation

Carbon dioxide molecules are water soluble, leading to formation of H_2CO_3 , which releases H^+ that is able to reduce the extracellular pH. This phenomenon contributes to the increased permeability of the cell membrane, allowing CO_2 to enter into the cell, creating a toxic environment and modifying the internal pH (Damar and Balaban, 2006). Garcia- Gonzalez et al. (2007) presented a hypothetical mechanism for the lethal effects of CO_2 (*Figure 3*). Even

though this proposed mechanism applies for high pressure carbon dioxide processing, it provides details on how this gas can be inhibitory or lethal for microorganisms.

Insert Figure 3 here.

The aerobic spoilage microorganisms do not grow in the presence of CO₂. The tolerance to carbonation provides a selective advantage to certain facultative anaerobic yeasts, such as *Dekkera* spp, including *Dekkera anomala*, which is able to grow in the presence of up to 4.45 volumes of CO₂ (Ison and Gutteridge, 1987). *Z. bailli* and *Hansenula anomala* are tolerant up to 3.34 volumes of CO₂, while *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Z. microellipsoides* are moderately tolerant up to 2.23 volumes of CO₂. Lactic bacteria are microaerophilic, displaying the ability to grow in an atmosphere containing above 1.5 volumes of CO₂, which is similar to the environment of most soft drinks (Lawlor et al., 2009).

2. Final remarks

Soft drinks have intrinsic characteristics that provide conditions for the growth of a select group of microorganisms. Oxidative and fermentative yeasts are the main spoilage microorganisms, since they withstand acidic pH, high CO₂ concentrations, and some species are even resistant to the usual amounts of preservatives used in the formulation of soft drinks. Lactic acid bacteria also survive at low-pH and low oxygen-tension environments and are normally associated with quality of ingredients and with hygienic conditions of the process (as they are capable of forming biofilms). Both filamentous fungi and acetic bacteria will multiply in case of carbonation losses that mainly occur in PET bottles.

Measures to ensure the microbial stability of soft drinks must consider aspects related to ingredients, formulation and processing. Introduction of contaminated ingredients can result in product contamination even when validated CCPs (critical control points) are employed in the

process. In this context, juice is the ingredient that turns carbonated soft drink more vulnerable to spoilage. Juice can introduce most of microbial contaminants in the process environment and in the beverage per se, such as yeast and molds, heat resistant molds, lactic acid bacteria and *Alicyclobacillus*. Given this, the juice must be pasteurized prior to be added to soft drinks. Despite this, it is known that *Alicyclobacillus* spores are able to survive through the heat pasteurization process applied in fruit, vegetable, and fruit/vegetable-based juices, fruit concentrates and purees, sugar, sugar syrups, tea, isotonic drinks and other acidic products (Chang and Kang, 2004, Spinelli et al., 2009, McKnight et al., 2010). Despite this, the carbonation of soft drink avoids the germination of spores and hinders the outgrowth of *Alicyclobacillus*, preventing spoilage of these products by these microorganisms.

When formulating soft drinks, the control of the pH, the carbonation process and the concentration of preservatives comprise essential measures for inhibiting the growth of potential spoilage microorganisms present in the product. Other critical aspects that complement the range of measures applied in order to ensure the production of shelf-stable soft drinks comprise the control of hygiene of equipment, process environment and packaging.

Failure to clean and sanitize equipment, gasket, valves, filler heads components, and filler valves could lead to biofilm formation, providing substrates for the growth of aciduric microorganisms (Lawlor et al., 2009, Clavero, 2010), for example, lactic acid bacteria, yeast and molds (Srey et al., 2013). Additionally to the recontamination of final products, biofilm can also enhance the resistance of microorganisms to disinfectants (Sidhu et al., 2001). Improper sanitation practices, particularly in filling machine-associated equipment, including the filler itself, tanks and pumps, have generally contributed to spoilage incidents (Clavero, 2010). Thus, the development of an efficient sampling and testing program of product contact surfaces before operations can provide a good indication of the efficacy of cleaning and sanitation program (Kornacki, 2010). This is highly important as most spoilage problems and recalls arise from

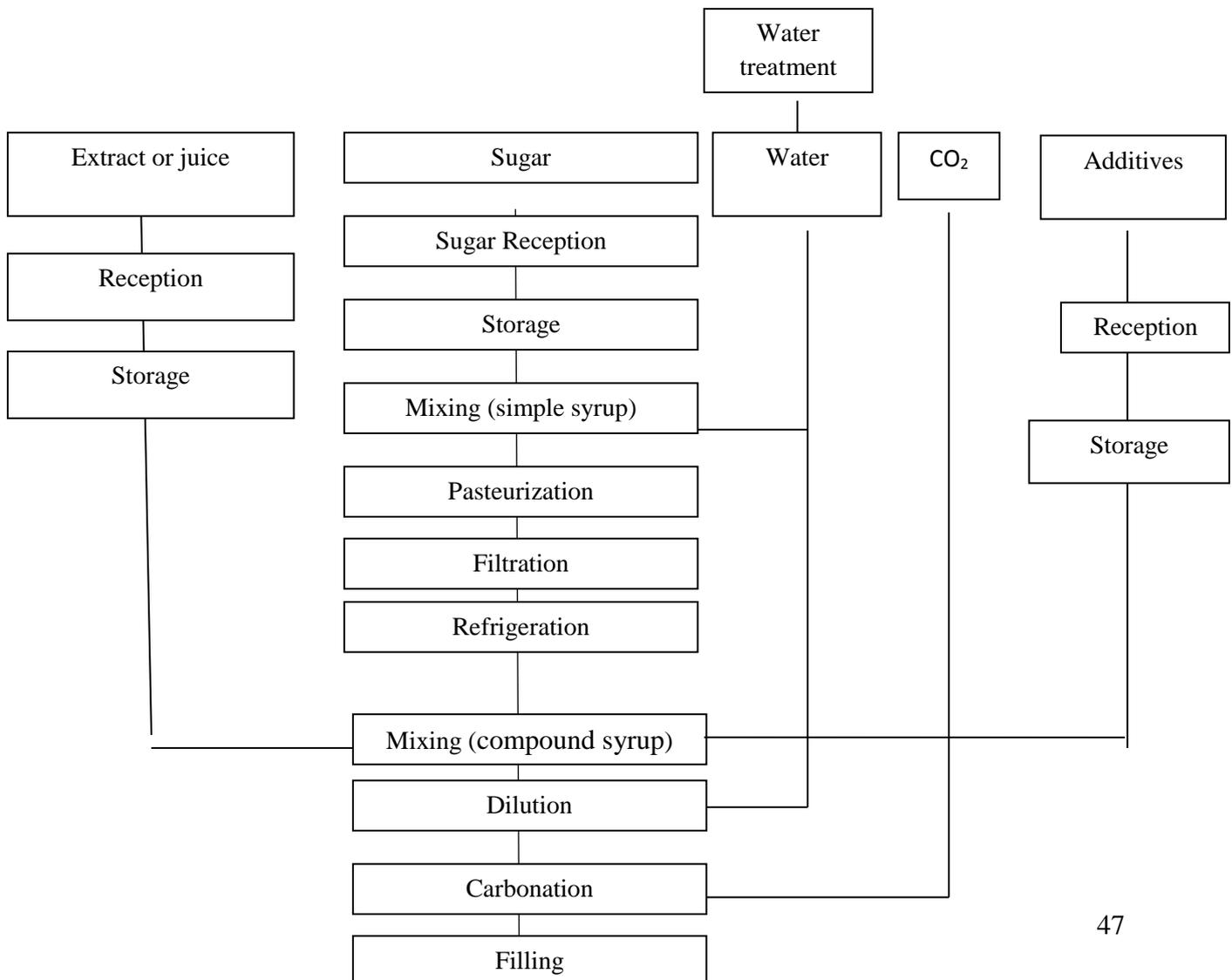
contamination of the processing environment. Further developments in microbiology of carbonated soft drinks should take place in the upcoming years considering all challenges imposed by consumers' aspirations toward naturalness, food safety and wellness.

Acknowledgements

The authors would like to thank the support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Figure captions

Figure 1: General flowchart for soft drink processing.



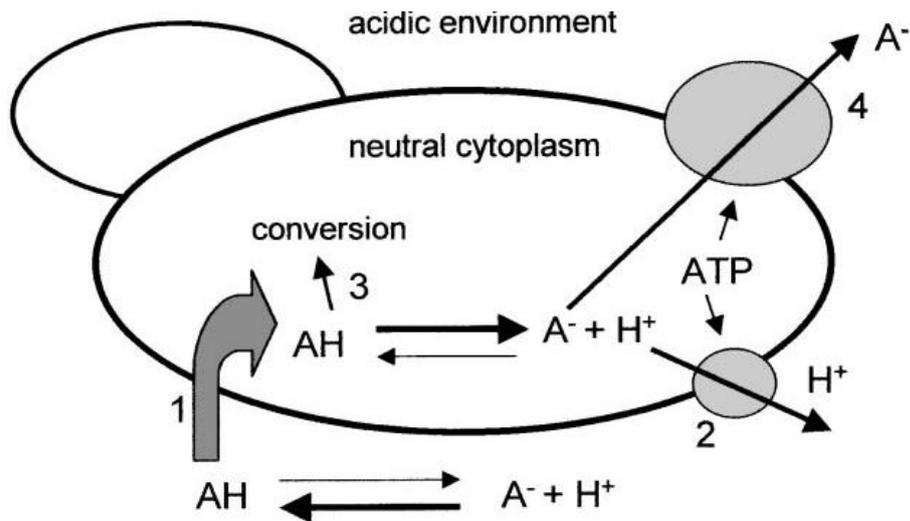


Figure 2: Schematic representation of the mode of action of organic acids in the yeast cell. The weak acid undissociated in the extracellular acidic environment diffuses through the membrane into the cytoplasm (neutral pH), occurring the dissociation that results in intracellular acidification and accumulation of protons and anions. The preservative resistance mechanism includes: (1) reduction of the acid into the cell, (2) increasing the ability of expelling H^+ , (3) converting the conservative into an innocuous compound, and (4) inducing anions extrusion. Reproduced from Loureiro (2000), with permission.

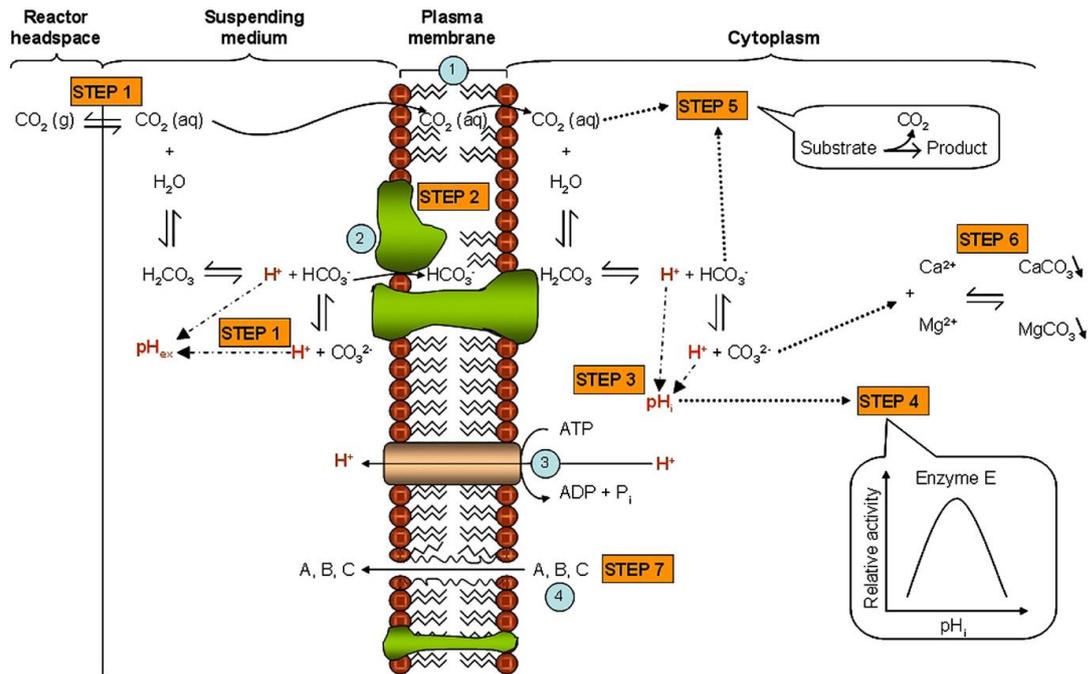


Figure 3: Schematic diagram of the lethal effect of CO₂ on bacteria. The numbers in the circles mean: 1) phospholipids layer, 2) integrating membrane proteins 3) H⁺-ATPase enzyme, and 4) intracellular substances. Reproduced from Garcia-Gonzales et al (2007), with permission.

Table 1: Yeasts associated with soft drink ingredients, processing, environment and final products.

Source	Specie	Reference
Wasps	<i>Candida davenportii sp</i>	Stratford et al., 2002.
Fruit soft drinks, and guarana	<i>Z. rouxii, Rhodotorula mucilaginosa, Criptococcus albidus</i>	Morais et al., 2003.
Soft drink orange flavor without essential oils and artificial coloring	<i>S. cerevisiae</i>	Ndagijimana et al., 2004.
Glass bottle, cork, rinse water, process water, sugar, ambient air, filler spout, metal plug	<i>Saccharomyces, Pichia, Hansenula, Zygosacharomyces, Kloeckera and Rhodotorula.</i>	Rocha, 2006.
Soft drink orange flavor, apple	<i>Debaromyces hansenii, D. polymorphus, Z. bailii, Pichia anômala, P. subpelliculosa, P. jadinii</i>	Ancasi et al., 2006.

CAPÍTULO III

SEGURANÇA DO ALIMENTO: PERCEPÇÃO DOS CONSUMIDORES SOBRE OS ADITIVOS ALIMENTARES.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a percepção dos consumidores no tocante a segurança dos aditivos em alimentos. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP) da Universidade Castelo Branco, sob o protocolo 015/2016. A partir da aplicação de um conjunto de afirmativas estruturadas, na forma de *survey*, os respondentes tiveram acesso a questões e a uma escala de respostas, baseada em cinco pontos, de acordo com Likert. Dados demográficos referentes a gênero, idade, educação e renda familiar foram incluídos na pesquisa. Em um segundo momento, avaliou-se o impacto da transmissão das informações sobre aditivos alimentares, em especial o corante artificial amarelo tartrazina, na aceitação de balas mastigáveis. Foram recrutados 100 voluntários, que participaram de três sessões. Em todas as sessões, o julgador recebeu uma ficha para cada amostra em que foi solicitado indicar em escala hedônica de 7 pontos sua aceitação do produto. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste do qui-quadrado (χ^2) e ANOVA. De acordo com o teste do χ^2 , constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no tocante ao gênero e renda. As mulheres demonstraram menor confiança no consumo de alimentos que contêm aditivos e nas instituições regulamentadoras do que os homens. Os consumidores com renda acima de 10 salários mínimos concordaram que os aditivos podem formar compostos tóxicos nos alimentos. Os consumidores reconheceram o papel dos aditivos, bem como as reações adversas promovidas pelos corantes artificiais. Entretanto, possuem dificuldade na interpretação dos rótulos dos alimentos. Observou-se que a percepção do risco não impacta diretamente a atitude assumida pelo consumidor. Destaca-se a necessidade de uma comunicação de risco mais efetiva por parte dos órgãos regulamentadores.

Palavras-chave: rótulo, educação do consumidor, tartrazina, benzeno, 4-metilimidazol.

FOOD SAFETY: CONSUMER'S PERCEPTION ABOUT THE FOOD ADDITIVES

Abstract

The aim of this study was to evaluate consumers' safety perception of additives in processed foods, via survey questionnaire based on five points according to Likert. The research project was approved by the Research Ethics Committee (COMEP) of the Castelo Branco University, under protocol 015/2016. Demographic data on gender, age, education and household income were included. This study also evaluated the impacts of information transmission on food additives, particularly tartrazine, in a candies' liking. Hundred consumers were recruited to participate in three sessions. In all sessions, the judge received a leaflet for each sample to indicate in 7-point hedonic scale liking of the product. The results were analyzed by chi-square test (χ^2) and ANOVA. According to χ^2 test, it was found a significant difference ($p < 0.05$) with respect to gender and income. The women showed less confidence in the consumption of foods containing additives and the food regulatory than men. Consumers with incomes above 10 minimum agreed that additives could form toxic compounds in food. Consumers have recognized the role of the additives as well as adverse reactions promoted by artificial colorants. However, they have difficulty in interpreting food labels. It was observed that the perception of risk does not affect the attitude assumed by the consumer. This study suggests that a effective risk communication by the government must be developed.

Key-words: label, consumer's education, tartrazine, 4- methylimidazole.

1 Introdução

A partir da segunda metade do século XX, observou-se uma redução no consumo de alimentos *in natura* e o conseqüente aumento da demanda por alimentos industrializados. Essa mudança foi influenciada por diversos fatores, como melhoria do poder aquisitivo das famílias, a influência da mídia, a urbanização das cidades, a globalização, a atuação profissional da mulher e a praticidade que tais produtos proporcionam. Desse modo, os aditivos químicos tornaram-se cada vez mais prevalentes na dieta, reforçando a necessidade de uma regulamentação rigorosa, suscitando dúvidas e discussões envolvendo a comunidade científica, os consumidores, a indústria e os órgãos regulamentadores quanto aos efeitos adversos à saúde desencadeados por essas substâncias, a partir do elevado número de estudos que produzem resultados conflitantes. Pode-se afirmar que a controvérsia dos aditivos alimentares reside entre a necessidade e a segurança do uso (POLÔNIO e PERES, 2009; TOLONI et al., 2011; VARELA e FISZMAN, 2013).

De fato, os produtos industrializados geralmente vêm acompanhados de quantidades excessivas de açúcares, gorduras, sódio e aditivos que podem causar doenças tais como as crônico-degenerativas, alergias e intolerâncias alimentares, alterações neurocomportamentais e carcinogenicidade (McCANN et al., 2007; KEMP, 2008; MEHEDI et al., 2009; POLÔNIO e PERES, 2010; CONCEIÇÃO e SOUSA, 2011). Entretanto, importa considerar que o emprego dos aditivos só se justifica por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais (BRASIL, 1997), não devendo substituir as boas práticas de fabricação e não exceder os limites estabelecidos de Ingestão Diária Aceitável (IDA). A IDA é a quantidade de um aditivo alimentar, que pode ser ingerida diariamente e de forma crônica, expressa em miligramas por quilo de peso corpóreo, sem provocar danos à saúde (BRASIL, 2009). A IDA é baseada na dose de uma substância que quando administrada num extenso período de tempo, não produza efeitos tóxicos aparentes ou nível de efeito não observável – NOEL (*no observed effect level*), que pode ser extrapolado para o homem, através de um fator de segurança (100, por exemplo). Cabe acrescentar que esse fator leva em consideração a heterogeneidade da população humana e ainda a diferença entre animais e homens (MÍDIO e MARTINS, 2000).

Para a aprovação do uso de aditivos alimentares, com seus respectivos limites máximos e categorias de alimentos permitidas, faz-se necessário uma avaliação toxicológica, sendo as principais referências: as monografias toxicológicas do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), que é um comitê científico que realiza a avaliação de segurança de uso de aditivos; assessorando o *Codex Alimentarius* em suas decisões, a Autoridade Europeia

em Segurança Alimentar – *European Food Safety Authority* (EFSA) e o FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos (CAROCHO et al., 2014). É importante esclarecer que as harmonizações internacionais servem de base para a internalização de legislações nacionais e no âmbito do MERCOSUL- Mercado Comum do Sul.

A Portaria nº 540 de 27/10/1997 (BRASIL, 1997) estabelece os princípios fundamentais referentes ao emprego de aditivos alimentares. De acordo com esta legislação, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se, poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Ainda, de acordo com o Codex (CODEX/GSFA, 2015), aditivo alimentar é qualquer substância que não se consome como alimento nem tampouco se utiliza como ingrediente básico.

A declaração de aditivos alimentares deve fazer parte da lista de ingredientes, na rotulagem dos alimentos, constando nesta a função principal ou fundamental do aditivo no alimento e seu nome completo ou seu número INS (Sistema Internacional de Numeração, *Codex Alimentarius* FAO/OMS), ou ambos (Resolução RDC n.º 259/2002 – ANVISA) (BRASIL, 2002).

As informações presentes nos rótulos dos alimentos industrializados constituem em uma fonte auxiliar às escolhas alimentares e conferem à rotulagem o caráter de uma atividade de promoção da saúde, configurando-se num elo de comunicação entre as indústrias e os consumidores. A rotulagem dos alimentos orienta o consumidor sobre a quantidade e a qualidade dos constituintes nutricionais dos produtos, auxiliando escolhas alimentares mais apropriadas (TABAI et al., 2006).

Vários episódios, veiculados na mídia, têm levado os consumidores a questionarem a segurança dos alimentos, em especial dos refrigerantes. Em 2009, a PROTESTE - Associação de Consumidores, ao analisar 24 amostras de bebida sabor laranja, de diferentes marcas, detectou a presença de benzeno em 7 amostras; em duas amostras, a concentração de benzeno estava acima dos limites considerados aceitáveis para a saúde humana (PROTESTE, 2009). O ministério público federal se mobilizou em conjunto com os órgãos de defesa do consumidor, resultando na assinatura de um termo de ajustamento de conduta (TAC) pelos maiores fabricantes da bebida, que se comprometeram a manter o teor de benzeno nas bebidas semelhante ao estipulado pela legislação para água potável (5 µg/L) (PROTESTE, 2011).

Em 2012, o PROTESTE divulgou dados de análises conduzidas pelo CSPI (*Center for Science in the Public Interest*), que revelaram que refrigerantes tipo cola, vendidos no Brasil contêm 267 µg (microgramas) em 355 mL de 4-MI (4- metilimidazol), sendo essa concentração cerca de 5 vezes maior do que a encontrada nas bebidas comercializadas na China, por exemplo. Esse composto pode ser encontrado no corante caramelo classe IV¹⁰ ou 150d (obtido pelo processo sulfito-amônia) utilizado para conferir cor em bebidas tipo cola e guaraná. O 4-MI foi avaliado pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como possivelmente carcinogênico ao homem (IARC, 2010; PROTESTE, 2012).

Tendo em vista a importância do tema e a escassez de pesquisas com esse enfoque, o presente estudo objetivou (i) avaliar a percepção dos consumidores com relação a segurança dos aditivos em alimentos processados; (ii) investigar o efeito da transmissão de informações sobre os aditivos alimentares, em especial o corante amarelo tartrazina, na aceitabilidade de balas mastigáveis utilizadas como estímulo.

2 Material e Métodos

2.1 Estudo I- Percepção do consumidor sobre a segurança dos aditivos em alimentos processados.

A partir de perguntas e respostas sobre aditivos alimentares disponibilizadas no site da Anvisa¹¹ - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, elaborou-se um conjunto de afirmativas estruturado na forma de *survey*. A aplicação do questionário foi realizada através do envio por *e-mail*, solicitando o preenchimento, disponível através de um link de acesso direto ao usuário entrevistado. A difusão da pesquisa foi caracterizada como uma amostra não probabilística por conveniência (CARRILO, VARELA e FISZMAN, 2012) e foi obtida por meio das redes de contatos pessoais da equipe de pesquisa. O estudo ainda coletou dados socioeconômicos e

¹⁰ Os corantes caramelos são misturas complexas de componentes, elaborados a partir do aquecimento de carboidratos (como glicose ou frutose), com ou sem ácidos, substâncias alcalinas ou sais, sendo classificados de acordo com os reagentes usados na sua fabricação. O caramelo IV é preparado pelo aquecimento de carboidratos com ou sem substâncias ácidas ou alcalinas, na presença de compostos amônia e sulfitos, cujo teor de 4 MI não deve exceder a 200mg/kg de produto (BRASIL, 2015).

¹¹ Disponível em :

http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!/lut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3jvQA9PdwMDI0v_EAsXA0-TkPerCAPS29nfzdDQ_2CbEdFAMdr5_s!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A//Anvisa%20Portal/Anvisa/Perguntas%20Frequentes/Alimentos/a9fa1e00404f94f9a364ab89c90d54b4. Acesso em 13 Jan.2013

demográficos dos participantes. Os respondentes leram cada uma das afirmativas (Quadro 1) e expressaram o grau de concordância e discordância de cada item através da escala de *Likert*¹² de 5 pontos.

Quadro 1. Afirmativas apresentadas no formato de *survey*

Questões

É seguro o uso de aditivos alimentares autorizados pela Anvisa.

É seguro comprar alimentos que contenham aditivos.

Os aditivos servem para melhorar o valor nutritivo, conservação, estabilidade e aparência dos alimentos.

Os aditivos alimentares são informados no rótulo dos alimentos.

Aditivos podem formar compostos tóxicos nos alimentos.

Corantes artificiais podem causar reações alérgicas nos consumidores.

Após a coleta das respostas, os itens da escala receberam os valores atribuídos a cada categoria: na categoria “concordo totalmente” foi computada a nota 5; na categoria “concordo” foi computada a nota 4, a nota 3 foi computada como “não concordo nem discordo (não sei)”; a nota 2 foi computada como discordo e a nota 1 na categoria “discordo totalmente”.

2.2 Estudo II- Impacto da informação sobre aditivos alimentares, em especial corantes artificiais, na aceitação de balas mastigáveis.

Os dados foram coletados em uma amostra obtida por conveniência, composta por alunos de graduação em Nutrição de uma universidade particular localizada no Rio de Janeiro. O critério de seleção da amostra foi a facilidade de acesso a esses alunos. Os 100 alunos, maiores de 18 anos, foram recrutados aleatoriamente e divididos em cinco grupos. Houve predominância do gênero feminino, característico dos estudantes dessa área de formação. Para a condução do teste, utilizou-se uma amostra de bala mastigável recheada e drageada, de diferentes sabores, colorida e aromatizada artificialmente como estímulo.

¹² Embora a escala de *Likert* possua limitações em relação ao seu uso como variável intervalar, ela é amplamente utilizada para a análise de comportamento do consumidor (BEARDEN e NETEMEYER, 1999).

Os testes de aceitação foram realizados em cabines individuais, divididos em três sessões, que foram aplicadas com intervalo de uma semana cada.

Na primeira sessão, os voluntários degustaram a amostra do produto, codificada com 3 dígitos, sem obter qualquer informação prévia sobre a sua composição. Na segunda sessão foi apresentado ao voluntário um texto informativo sobre o corante amarelo tartrazina (Figura 6), com base no informe técnico n.30 de 24 de Julho de 2007 (BRASIL, 2007) da Anvisa. Posteriormente, o voluntário recebeu um cartão (Figura 7) que descrevia a lista de ingredientes do produto, de acordo com o rótulo. Na terceira sessão, o voluntário recebeu a mesma amostra de bala mastigável (da sessão 1) e o cartão com a lista de ingredientes.

Em todas as sessões, o julgador recebeu uma ficha para cada amostra em que foi solicitado indicar em escala hedônica de 7 pontos (com extremos entre gostei extremamente- desgostei extremamente) sua aceitação do produto. A escala hedônica foi utilizada com o objetivo de reconhecer as atitudes do consumidor antes e após ter acesso ao conteúdo técnico descrito no rótulo da bala.

Para a realização da análise de frequência dos escores hedônicos para cada amostra e sessão, considerou-se os escores entre 5-7 como positivos, sinalizando que os consumidores gostaram da amostra e os escores de 1-4 como negativos, indicando que os consumidores não gostaram da amostra, de acordo com o proposto por Milagres et al., 2014.

É importante esclarecer que o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP) da Universidade Castelo Branco sob o número de protocolo 015/16.

Estudos realizados demonstraram casos de reações alérgicas ao corante amarelo tartrazina como asma, bronquite, rinite, náusea, broncoespasmos, urticária, eczema e dor de cabeça. A declaração do nome tartrazina por extenso nos rótulos dos alimentos que o contém é obrigatória segundo a resolução n.340/2002 da Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Figura 6: Texto informativo sobre o corante amarelo tartrazina.

Ingredientes: açúcar, xarope de glicose, gordura vegetal, maltodextrina, gelatina bovina, acidulantes (ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico), aromatizantes, estabilizante lecitina de soja, espessante goma arábica, glaceante cera de carnaúba, corante inorgânico dióxido de titânio, corantes artificiais (vermelho 40, amarelo tartrazina, amarelo crenúsculo, azul brilhante).

Figura 7: Lista de ingredientes retirada do rótulo da amostra testada.

2.3 Análise Estatística

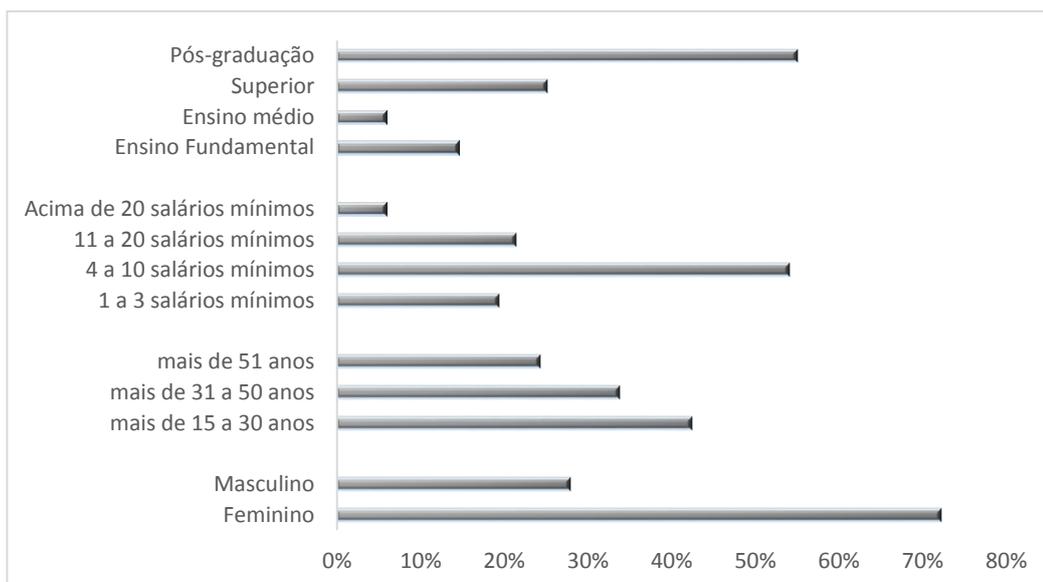
O programa *xlstat-sensory analysis and costumer insight* versão 2014 (*Addinsoft Inc.*) foi usado para a avaliação dos dados coletados na pesquisa. O teste de Qui-quadrado (χ^2) e a análise de variância (ANOVA) foram empregados para a significância estatística de $p < 0,05$.

O coeficiente alfa de Cronbach calculado foi de aproximadamente 0,7. O alfa de Cronbach é um coeficiente de confiabilidade utilizado para medir a consistência interna do questionário. Seu valor pode variar de 0 – 1. Valores entre 0,6 – 0,7 indicam confiabilidade aceitável (KLINE, 1999).

3. Resultados e Discussão

3.1. I- Percepção do consumidor sobre a segurança dos aditivos alimentares em alimentos processados.

Dos 110 respondentes, 6 foram descartados pois não atenderam aos critérios de inclusão. A adesão ao questionário foi de 94,5%. Os dados socioeconômicos e demográficos são apresentados na Figura 8.



(*) sm= 1 salário mínimo que na época da entrevista correspondia a R\$802,53.

Figura 8. Características sócio demográficas da população em estudo (n=104).

Do total de participantes, 72% era composto de mulheres com idade de 21 a 30 anos. Em relação a variável renda familiar, a maioria (53,9%) pertencia ao estrato de 4 a 10 salários mínimos e somente 6% possuía renda superior a 20 salários mínimos. Quanto a escolaridade, observou-se que um percentual representativo havia cursado o ensino superior, sendo que a maioria dos respondentes (54,8%) cursou pós-graduação.

De acordo com o teste do χ^2 , constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na percepção da segurança do uso de aditivos no tocante ao gênero e renda. Observou-se que as mulheres demonstraram menor confiança no consumo de alimentos que contenham aditivos do que os homens. Fonseca e Salay (2005) verificaram que os homens possuem maior preocupação referente aos perigos químicos, destacando-se os agrotóxicos, conservadores, corantes e produtos químicos em geral. Por outro lado, as mulheres são mais preocupadas com a saúde e com a segurança do alimento do que os homens (MENDES, 2002; SHIM et al., 2011). Neste sentido, as mulheres têm atitude mais reticente em relação a novas tecnologias no processo de industrialização, especialmente no tocante aos OGMs (Organismos Geneticamente Modificados) e a irradiação do que os homens (COSTA-FONT et al., 2008; BIEBERSTEIN e ROOSEN, 2015). No presente estudo, a percepção negativa das mulheres se estendeu ainda a regulamentação dos aditivos pela Anvisa, pois discordaram (escore médio =2,04) que os aditivos aprovados sejam seguros, refletindo a perda de confiança nas instituições relacionadas as questões da segurança dos alimentos. Neste contexto, a percepção do risco por parte do consumidor torna-se maior. Para Hansen et al. (2003) a avaliação de risco de um aditivo

alimentar é um processo complexo, de âmbito científico e de difícil entendimento para o consumidor leigo.

Os respondentes com renda acima de 10 salários mínimos, independente do gênero, concordaram que os aditivos podem formar compostos tóxicos nos alimentos. Pode-se inferir que pessoas com alta renda e conseqüentemente maior escolaridade (SALVATO, FERREIRA e DUARTE, 2010) tem uma percepção melhor acerca da relação entre a dieta e saúde. O consumidor atual, em face ao aumento do acesso às informações, tornou-se mais exigente (SPERS, 2003) apresentando a preocupação em adquirir alimentos que não causem danos à saúde, principalmente quando tem notícia de que algum produto colocado no mercado não está em conformidade com as normas de higiene e segurança. Há uma relação direta entre as divulgações desfavoráveis veiculadas na mídia e o consumo de determinado alimento envolvido em uma crise de segurança (BARRETO, 2014).

Levando-se em consideração o total de respondentes (62,5%), observou-se que os mesmos reconheceram a função, ou seja, a que se destinam os aditivos nos alimentos, destacando-se como um dado positivo. Pesquisa realizada com universitários demonstrou que 64,6% desconheciam o que era um aditivo e admitiram (58,8%) que não pagariam mais caro por um produto sem aditivo, justificando que o preço seria um fator determinante para a sua escolha negativa (PIMENTA, 2003). Este fato evidencia que consumidores mais conscientes apresentam um melhor poder de escolha.

Um dado interessante é que 86,5% dos entrevistados apresentaram conhecimento a respeito das reações adversas promovidas pelos corantes artificiais, entretanto, desconhecem que o rótulo é a principal fonte de informação sobre os aditivos. Este resultado sugere que os consumidores não buscam a informação sobre os ingredientes e aditivos no rótulo. Adicionalmente, o consumidor tem dificuldade em compreender o código através do qual o aditivo é representado, de acordo com o sistema numérico internacional de aditivos ou mesmo o nome específico do aditivo. Embora o consumidor tenha por hábito a leitura do rótulo, observando como primeira informação a data de validade, seguido das calorias e composição nutricional e por fim, o modo de preparo do produto (MACHADO et al., 2006) a dificuldade em pronunciar o nome dos aditivos, confere as pessoas leigas, uma impressão de desconhecimento e conseqüentemente aumenta a percepção de risco à saúde (SONG e SCHWARZ, 2009; KOYRATY, AUMJAUD e NEELIAH, 2014).

3.2. Estudo II – Impacto da informação sobre aditivos alimentares, em especial corantes artificiais, na aceitabilidade de balas mastigáveis.

O resultado da análise de frequência (Figura 9), permitiu observar que houve um aumento do percentual de escores negativos quando foi fornecida a informação sobre o corante amarelo tartrazina e quando os voluntários foram apresentados ao rótulo do produto. Na primeira sessão, o escore médio de aceitação foi de aproximadamente 6, sinalizando que os consumidores gostaram da amostra testada. Após terem acesso as informações sobre a tartrazina e ao conteúdo do rótulo, o escore médio de aceitação foi aproximadamente 5, correspondente ao termo hedônico não gostei/nem desgostei. Na terceira sessão, o mesmo escore se manteve. A análise de variância (ANOVA) não indicou diferença significativa ($p>0,05$) nas três sessões realizadas.

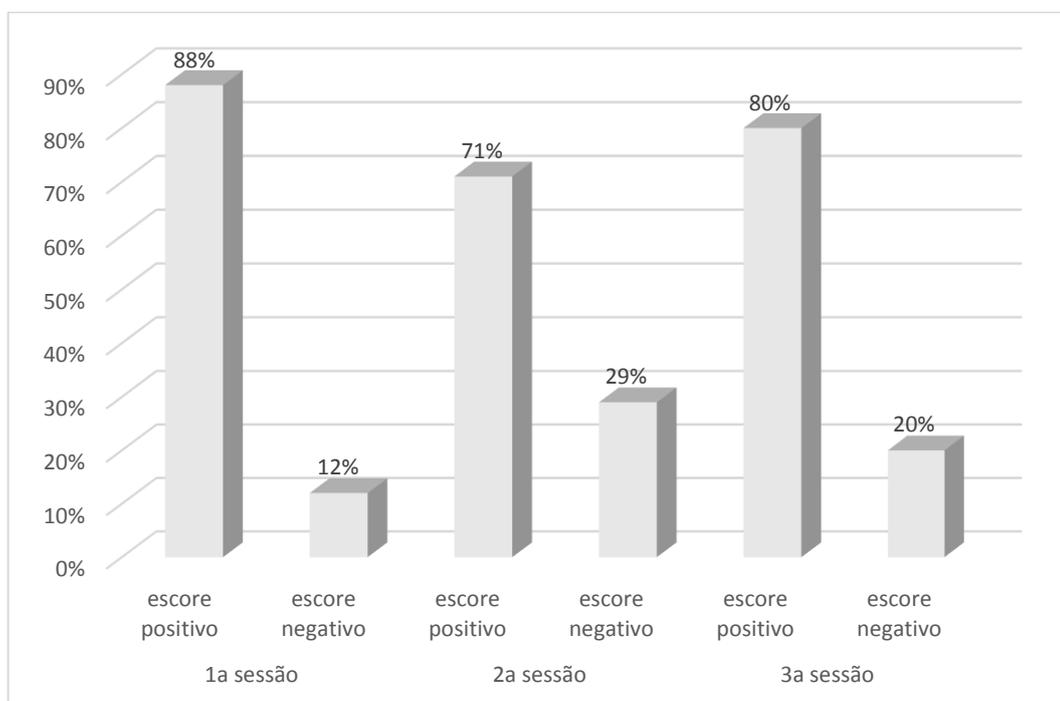


Figura 9: Frequência de escores (positivos/negativos) atribuídos pelos consumidores nas três sessões.

Pode-se afirmar que os voluntários não se mostraram suficientemente sensibilizados a respeito do risco, que a presença do corante, em especial a tartrazina pode representar à saúde deles, conferindo maior importância ao sabor do produto. Isto reflete a distância entre a percepção do risco e a atitude assumida pelo consumidor. Cabe considerar se o comportamento apresentado pelo grupo analisado é cultural. Em estudo conduzido na Alemanha, BEARTH, COUSIN e SIEGRIST (2014) observaram uma preocupação por parte dos consumidores, com

os corantes artificiais, até superior a existente em relação aos edulcorantes, tendo sido relatadas reações negativas e termos como inúteis, nocivos e prejudiciais, principalmente às crianças, fraude e camuflagem.

Outro ponto a ser considerado é que o grupo pesquisado envolveu estudantes universitários, que habitualmente ingerem uma quantidade acentuada de doces, chocolates e biscoitos em períodos de maior atividade acadêmica como forma de aliviar o estresse físico e mental (DUARTE, ALMEIDA e MARTINS, 2013). Neste contexto, a presença de corantes artificiais nos alimentos consumidos adquire uma importância secundária.

4. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo podem servir como incentivo para a criação de mecanismos que resultem em uma comunicação de risco mais efetiva por parte dos órgãos regulamentadores, de forma a tornar o consumidor capaz de tomar decisões mais acertadas no momento da compra de um alimento. A interatividade com o consumidor pode ser delineada através de campanhas de esclarecimento com vistas à função dos aditivos alimentares, rotulagem, toxicidade e aspectos relacionados a regulamentação. O papel da mídia neste contexto é de fundamental importância, devendo-se atentar, entretanto, para divulgações que reflitam opiniões tendenciosas e/ou alarmistas.

Outro ponto a se considerar é a adoção de estratégias relacionadas a educação para o consumo, um dos direitos fundamentais previstos no Código de Defesa do Consumidor (CDC). Os consumidores, uma vez conscientes, podem ter papel fundamental no estímulo à produção de alimentos com apelo mais natural e saudável, adequados ao conceito *clean label*. Neste sentido, não há uma definição legal para este termo, porém tem como premissa o uso de nomes, na lista de ingredientes, que pareçam familiar ao consumidor, transmitindo a percepção da ausência de “químicos” como ingredientes.

Espera-se que pesquisas como esta possam contribuir na consolidação de um mecanismo eficiente para a construção das políticas públicas de segurança dos alimentos, através do maior acesso à alimentação segura, especialmente aumentar o consumo seguro de aditivos alimentares.

Apesar dos avanços, a inocuidade dos alimentos no Brasil ainda é um desafio. Por isso, se faz necessário legitimar algumas políticas que estão sendo feitas nessa área.

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DE REFRIGERANTE DE LARANJA ADICIONADO DE CONCENTRADO DE CENOURA E MAÇÃ

Resumo

A cor é um dos atributos mais importantes na aquisição do alimento pelo consumidor. Embora de caráter subjetivo, é fundamental na indução da sensação global resultante de parâmetros como o aroma, o sabor, textura e a doçura dos alimentos. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma formulação de refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã. Em paralelo, desenvolveu-se uma formulação controle contendo corantes artificiais (amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP) da Universidade Castelo Branco sob o protocolo 016/16. Foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial das formulações durante o período de armazenamento de 150 dias. Observou-se o atendimento ao padrão de identidade e qualidade e estabilidade das formulações em relação aos parâmetros físico-químicos. Entretanto, na análise colorimétrica observou-se uma degradação de cor perceptível ao consumidor na amostra contendo o concentrado de cenoura e maçã. No que se refere as análises microbiológicas, ambas as formulações atenderam aos parâmetros preconizados pela legislação. A contagem de bolores e leveduras apresentou crescimento de 1 ciclo log na formulação contendo o concentrado de cenoura e maçã, sugerindo que a robustez da matriz desenvolvida pode ser afetada, se as condições de higienização da linha de processamento não forem observadas. Em relação a análise sensorial, os provadores (n=120) selecionados eram em sua maioria, homens (78%), adolescentes, habitualmente consumidores de refrigerantes. Os voluntários avaliaram 8 amostras durante cada sessão, sendo 6 amostras oriundas do comércio. Utilizou-se escala hedônica estruturada de 9 pontos, em que 9 representava a nota máxima “gostei muitíssimo” e 1 a nota mínima “desgostei muitíssimo”. Para avaliação da cor, utilizou-se escala JAR ancorada nos termos 1 “extremamente menos do que o ideal” a 9 “extremamente mais do que o ideal”. Verificou-se que a cor foi a característica sensorial que mais influenciou os consumidores com relação a aceitabilidade das amostras, sinalizando que esse parâmetro interferiu, de forma significativa na avaliação do sabor e aparência. Este estudo demonstra que os consumidores ainda não estão habituados ao emprego de corantes naturais nas formulações de alimentos e bebidas, mantendo como parâmetro para avaliação de cor, os corantes sintéticos comumente empregados.

Palavras-chave: bebida carbonatada, carotenoide, cor, amarelo crepúsculo, tartrazina.

DEVELOPMENT OF AN ORANGE SODA WITH APPLE AND CARROT CONCENTRATE.

Abstract

Color is one of the most important attributes in the acquisition of food by consumers. Although its subjective character, it induces the sensation resulting from global parameters such as the aroma, the taste, texture and sweetness of the food. The aim of this study was to develop an orange soda formula with carrot and apple concentrate. In parallel, we developed a standard formula containing tartrazine and sunset yellow. This research project was approved by the Research Ethics Committee (COMEP) of the Castelo Branco University under protocol 016/2016. Physicochemical and microbiological parameters were performed during the period of 150 days. It was observed that there were no changes in physicochemical parameters. However, the colorimetric analysis revealed a short shelf life in the sample containing the carrot and apple concentrate. Regarding microbiology, both formulations were according to regulation by public health agencies. The yeasts and molds counts presented 1 log cycle growth in the formula containing carrot and apple concentrate, suggesting that the robustness of the developed matrix may be affected, if the hygiene conditions of processing line sanitation are not observed. Regarding sensory analysis, the consumers (n = 120) selected were mostly men (78%), in the age group of teenagers, usually soft drinks consumer's. The volunteers rated 8 samples during each session; 6 samples were come from the trade. It used 9-point hedonic scale, in which 9 represented "like extremely" and 1 "dislike extremely". JAR scales were used to color evaluate anchored under 1 "extremely less than ideal" and 9 "extremely more than ideal". It was found that the color was the sensory characteristic that most influenced consumers regarding the acceptability of the samples, signaling that this parameter interfered significantly in evaluating flavor and appearance. This study demonstrates that consumers are not yet accustomed to the use of natural colours in food and beverage formula, keeping as a parameter for color evaluation the commonly used artificial colors.

Key-words: carbonated beverages, carotenoid, color, sunset yellow, tartrazine.

1. Introdução

A cor é uma propriedade sensorial com uma forte influência sobre a aceitação dos alimentos e bebidas. Embora de caráter subjetivo, é fundamental na indução da sensação global resultante de parâmetros como o aroma, o sabor, textura e a doçura dos alimentos. Isto pode estar associado ao fato do homem “enxergar” sabores através da cor. Adicionalmente, a cor das bebidas também pode influenciar a sensação de saciar a sede e refrescância (WEI et al., 2013). É senso comum que durante o processamento vários fatores como luz, ar, temperatura, pH, umidade e condições de armazenamento podem interferir na cor do produto final. Assim, surge a necessidade do uso de aditivos alimentares que contribuam para restaurar, ou ainda, uniformizar a cor dos produtos cujo tom original foi afetado (CEJUDO-BASTANTE et al., 2014).

A Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNPA – nº 44 de 1977 definiu corante como a “substância ou mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração do alimento e bebida”. A Portaria da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde – SVS/MS – nº 540 de 1997, define-o como a “substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento” (BRASIL, 1977; 1997). A classificação dos corantes é apresentada abaixo (Figura 10). A legislação brasileira supracitada prevê o uso de 16 corantes artificiais, divididos em corantes que propiciam tons amarelos (amarelo tartrazina, amarelo de quinoleína e amarelo crepúsculo), tons vermelho a alaranjado (azorrubina, amaranto, vermelho 40, vermelho 2G, Ponceau, Litol rubina BK), tons azul a esverdeado (azul patente, indigotina, azul brilhante, verde rápido FCF) e tons marrom a preto (negro brilhante BN e marrom HT).

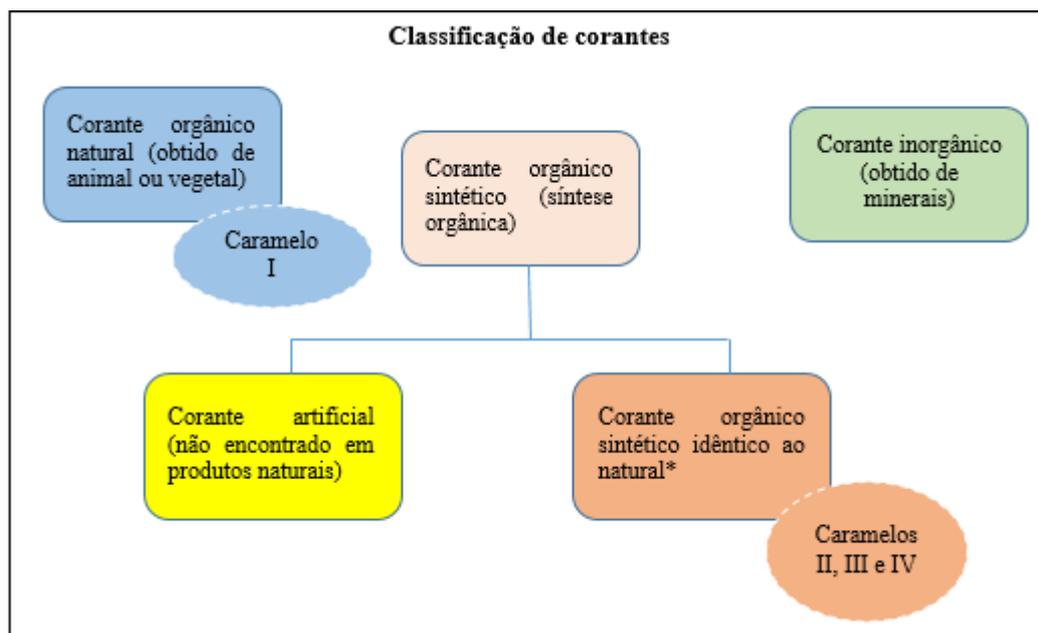


Figura 10: Classificação de corantes de acordo com a Resolução nº 44/CNNPA (1977).
Fonte: BRASIL (2015).

*Estrutura química semelhante a isolada de corante orgânico natural.

O corante caramelo classe I (INS 150a) é obtido através do aquecimento de carboidratos com ou sem substâncias ácidas ou alcalinas, não sendo utilizados componentes de amônia e sulfitos, portanto é um corante natural. Os corantes caramelo II, III e IV (respectivamente INS 150b, INS 150c e INS 150d) são classificados como corantes orgânicos sintéticos idênticos ao natural, uma subcategoria distinta dos corantes artificiais.

Os corantes artificiais são extensamente utilizados pela indústria de alimentos, devido a sua boa estabilidade e a seu poder de coloração, variedade de cores e tonalidades e sobretudo, por apresentarem baixo custo. Entretanto, estudos demonstram que do ponto de vista toxicológico, os corantes artificiais são mais danosos à saúde do que os corantes naturais, devido a sua complexidade química, processo de síntese e presença de metais tóxicos (LINDINO et al., 2008). Além das reações alérgicas, existem evidências relacionadas ao consumo de corantes artificiais, como o amarelo tartrazina, e a ocorrência de patologias como o déficit de atenção e a hiperatividade (McCANN et al., 2007; MASONE e CHANFORAN, 2015). Nesse contexto, o estudo conduzido por McCann ou *Southampton Study* deu origem as novas diretrizes sobre a rotulagem de alimentos na União Europeia, que preconiza que os alimentos fontes dos corantes artificiais sejam rotulados com a seguinte informação: pode ter efeito adverso na atividade e atenção de crianças (EFSA, 2008), promovendo um aumento considerável no mercado de corantes naturais na Europa (GHIDOUCHE et al., 2013).

Atualmente há uma grande demanda por ingredientes naturais, dado o apelo por uma alimentação mais saudável, ausente de efeitos tóxicos e que promova benefícios à saúde. O uso

de pigmentos naturais em substituição aos corantes artificiais pela indústria de alimentos vem sendo fomentado, embora ainda não haja um consenso sobre a segurança relacionada ao seu uso, especialmente no que concerne ao pigmento carmim cochonilha, associado a reação anafilática (MARTINS et al., 2016). Uma outra perspectiva para o uso de corantes naturais é a necessidade de uma comunicação transparente entre consumidor e rótulo (KATZ e WILLIAM, 2011) seguindo o movimento *clean-label*, iniciado na Europa, que verificou que o novo consumidor revela maior aceitação sobre produtos rotulados como orgânico, natural, livre de aditivos e conservadores (INGREDION CONSUMER RESEARCH, 2014).

Pigmentos naturais são aqueles obtidos através de organismos vivos, sendo extraídos de plantas, insetos, algas, cianobactérias, bactérias e fungos (SHAHID; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, 2013). Além de colorir, as principais vantagens advindas do seu uso residem nas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas e efeito anticolesterolêmico (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; ALI E EL-MOHAMEDY, 2011; PATAKOVA, 2013).

Os carotenoides são considerados os compostos bioativos de maior distribuição na natureza (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). O principal papel dos carotenoides na dieta é a sua capacidade de atuarem como precursores da vitamina A, função atribuída especialmente ao β -caroteno, devido aos seus dois anéis β -ionona, que proporcionam 100% de atividade. Como os carotenoides não são sintetizados pelo organismo humano, a obtenção desses compostos é realizada pela dieta (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008).

As propriedades biológicas envolvendo a atividade antioxidante dos carotenoides, através da capacidade de sequestrar formas altamente reativas de oxigênio e desativar radicais livres, têm sido objeto de estudo (RIOS, ANTUNES e BIANCHI, 2009). Adicionalmente, os carotenoides são reconhecidos pelas suas atividades antiinflamatória, fotoprotetora da pele, anticarcinogênico, na prevenção da catarata e na degeneração da mácula (SOMMER e VYAS, 2012; ELDAHSHAN e SINGAB, 2013).

A capacidade de colorir dos carotenoides também é bastante apreciada, sendo particularmente aplicados em alimentos como margarinas, produtos extrusados, confeitos e drageados, produtos lácteos, preparado de frutas, bebidas não alcóolicas, molhos, marinados, coberturas e misturas de especiarias (CAROCHO, MORALES e FERREIRA, 2015). Entretanto, a substituição dos corantes artificiais pelos naturais representa um desafio para a indústria. Nesse contexto, os corantes naturais estão associados a proteínas e carboidratos que podem interagir com matriz do alimento e promover reações secundárias, comprometendo,

dentre outros parâmetros, a estabilidade das formulações e conseqüentemente, o tempo de prateleira do produto final (GHIDOUCHE et al., 2013). Por outro lado, o mercado global de carotenoides alcançou 1.5 bilhões de dólares em 2014. A expectativa é de que até 2019 este mercado alcance 1.8 bilhões de dólares, com uma taxa anual de crescimento de 3,9%, indicando que possivelmente os corantes naturais possam ultrapassar os sintéticos em valor de mercado. O β -caroteno ainda constitui o produto mais relevante desse segmento (MÄRZ, 2015), representando uma oportunidade para a indústria de alimentos desenvolver produtos mais naturais.

Face ao exposto, o objetivo do presente estudo foi (i) desenvolver um refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã em substituição aos corantes artificiais (amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina) comumente utilizados; (ii) desenvolver uma formulação convencional de refrigerante de laranja adicionado de corantes artificiais; (iii) caracterizar as bebidas desenvolvidas quanto aos parâmetros físico-químico, microbiológico e sensorial.

2. Material e Métodos

O trabalho experimental para elaboração da bebida foi dividido em 3 fases: i) seleção do corante natural, ii) desenvolvimento das formulações, iii) produção do refrigerante.

2.1 Seleção do corante natural

Os critérios para a seleção do corante natural foram obtidos através de consulta a literatura e em entrevista com gestores da indústria de bebidas, das áreas de qualidade, desenvolvimento de produtos e gerente industrial. Os critérios elencados foram: Não pertencer a classe de um corante sintético idêntico ao natural; não conter conservadores na formulação. Nesse aspecto, alguns corantes naturais contêm sorbato de potássio; apresentar-se na forma líquida, para aplicação em bebidas; apresentar boa solubilidade em água, pois a bebida representa uma matriz aquosa; ser estável em pH ácido e a luz e fornecer tom amarelo alaranjado para aplicação em bebida sabor laranja.

A partir das características citadas, elaborou-se uma lista com os principais fornecedores de corantes naturais e realizou-se o contato com os mesmos através de participação em um grande evento do setor de ingredientes alimentícios. Optou-se pelo concentrado de cenoura e maçã (nome comercial: Exberry Laranja Outono) da empresa GNT.

2.1.1 Desenvolvimento das formulações

Os ingredientes das formulações testadas foram: água carbonatada, açúcar cristal, suco de laranja, suco de limão, ácido cítrico, concentrado de cenoura e maçã, emulsão sem corantes, emulsão com corante amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo, sorbato de potássio, benzoato de sódio e aroma natural de laranja.

As formulações foram desenvolvidas em um laboratório de uma indústria de refrigerantes. Foram elaboradas duas formulações: a primeira contendo o concentrado de cenoura e maçã denominada **F 1** e a segunda caracterizada como controle (**F 2**) contendo os corantes artificiais amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo. A concentração adequada de cada matéria-prima foi consensada através de testes de triagem sensorial realizados pelo grupo de pesquisa e por técnicos da indústria supracitada. Ambas as formulações foram padronizadas com teores de sólidos solúveis em 12 °Brix com adição de sacarose, pH fixado em 3,3 com a utilização de ácido cítrico e carbonatadas com teor de CO₂ igual a 3 volumes.

2.1.2 Produção do refrigerante

As formulações foram produzidas de acordo com o fluxograma (Figura 11).

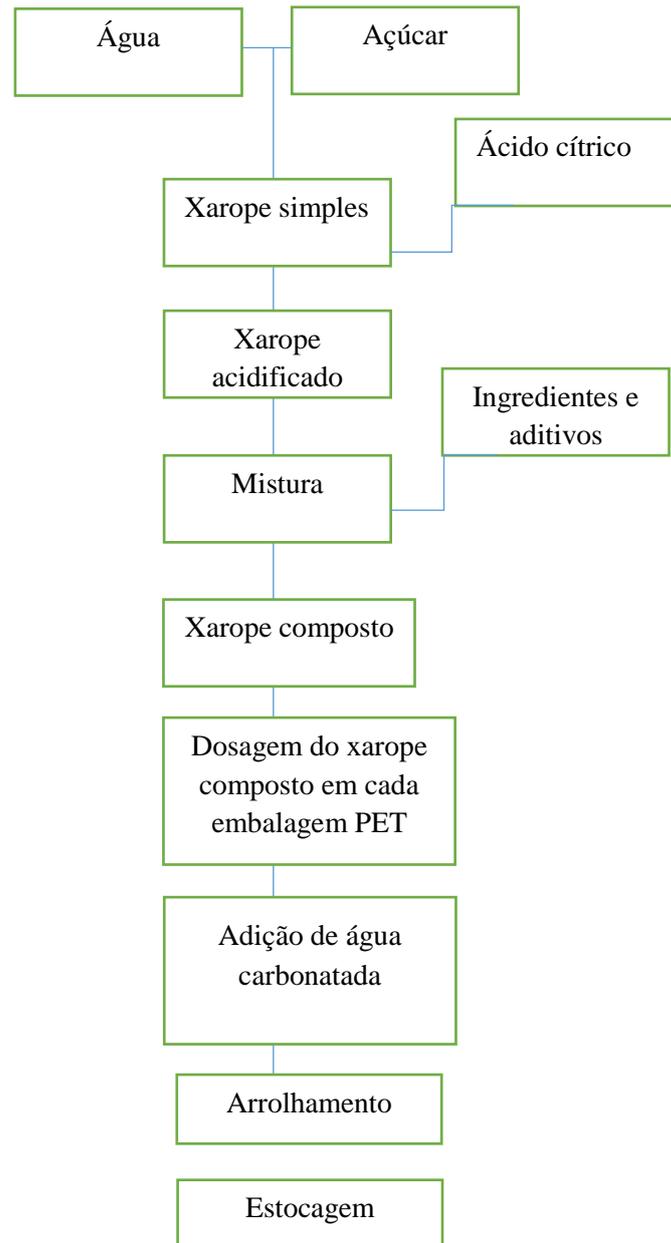


Figura 11. Produção de refrigerante de laranja.

As bebidas foram carbonatadas através de um *post mix*, conforme sugerido por ARORA e AGGARWAL (2009) e imediatamente arrolhada em garrafas PET (polietileno tereftalato) de 600 mL. As bebidas carbonatadas foram estocadas por 150 dias a temperatura ambiente em ausência de luz e foram analisadas no tempo zero e a cada 30 dias, a partir da data de produção. O tempo de 150 dias foi selecionado por representar a extensão de 1 mês do prazo de validade do refrigerante de laranja. Cinco amostras (n=5) dos lotes produzidos foram retiradas aleatoriamente, para realização das análises microbiológicas e físico-química nos tempos assinalados.

2.2 Análises físico-químicas

A estabilidade das bebidas desenvolvidas foi determinada através de análises de pH, ATT - acidez total titulável (expressos em g/ 100 mL de ácido cítrico), sólidos solúveis totais (SST), determinado à 20 °C com o auxílio de um refratômetro de bancada (ABBE EEQ-9001) e o resultado expresso em (°Brix). As amostras foram descarbonatas e analisadas, em triplicata, conforme metodologia descrita por Adolfo Lutz (2005). O volume de gás carbônico, foi avaliado através de medidor do grau de carbonatação (ZEGLA).

Os resultados das análises físico-químicas foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), considerando valor de $p < 0,05$. Médias com diferença significativa entre si foram comparadas ao teste de Tukey, utilizando-se o software XLSTAT-versão 2014 (Addinsoft Inc.).

2.2.1 Análise Colorimétrica

Os parâmetros colorimétricos foram determinados em colorímetro digital CR-400 (Konica Minolta Japão), com sistema CIELAB, escala $L^*a^*b^*$ e fonte de luz D65 (ângulo de observação de 10°). Para cada amostra, cinco determinações foram realizadas. O sistema CIELAB é composto pela variável L^* , que significa luminosidade (brilho) e varia entre os valores 0 a 100, tendo como limite o preto e o branco, respectivamente; a^* , indica as coordenadas cromáticas, sendo que a^{*+} direciona para o vermelho e a^{*-} para o verde; e b^* , onde b^{*+} direciona para o amarelo e b^{*-} para o azul. A partir das coordenadas de cores, calculou-se o (ΔE_{ab^*}), usando a fórmula: $\Delta E_{ab^*} = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$

2.2.2 Análises microbiológicas

As bebidas desenvolvidas foram avaliadas de acordo com os parâmetros microbiológicos para refrigerantes segundo a RDC nº12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). A metodologia executada foi a preconizada por DOWNES e ITO (2001). Além da determinação de coliformes a 35 °C adotada pela legislação supracitada, as contagens de bolores e leveduras, bactérias lácticas, bactérias aeróbias estritas e leveduras resistentes a conservadores foi executada. As amostras foram analisadas de acordo com a técnica de membrana filtrante.

Para a análise de coliformes a 35 °C foram filtradas 5 porções de 10 mL do refrigerante de forma a atender a especificação da legislação: ausência em 50 mL. O meio de cultura utilizado foi o agar Chromocult (incubação a 35 °C/48h). Para a contagem de bactérias lácticas,

a incubação do meio MRS (Man, Rogosa e Sharp) foi realizada em condições de microaerofilia a 35 °C/72h. A contagem de bactérias aeróbias estritas foi conduzida em meio PCA (Plate Count Agar) e incubação a 35 °C/48h. A contagem de bolores e leveduras foi realizada em Agar BDA (Batata Dextrose Agar) acidificado até pH 3,5 com ácido tartárico 10 % e a incubação a temperatura de 25 °C/3-5dias. O meio de cultura PRY (*Preservative Resistant Yeasts Medium*) foi utilizado na contagem de leveduras resistentes a conservadores e incubado a 30 °C/48-72h.

2.3 Análise sensorial

2.3.1 Amostras

Avaliou-se as duas formulações produzidas (F 1 e F 2) e outras seis amostras comerciais adquiridas em supermercados. É importante esclarecer que essas amostras são representativas do grupo de produtos sabor laranja, disponíveis nos supermercados, da cidade do Rio de Janeiro. Os ingredientes e as características físico-químicas das amostras comerciais são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Ingredientes e características físico-químicas das amostras de refrigerantes comerciais.

Marca	% de* suco	Corantes*	Volume CO ₂	Sólidos Solúveis (°Brix)	%ATT (g/ 100 mL ác.cítrico)	pH
Fanta Laranja	5,0	Amarelo crepúsculo FCF	3,0	10	0,12	3,0
Laranja Convenção	5,0	Amarelo crepúsculo INS 110	3,0	11	0,21	2,4
Schin Laranja	5,1	INS 110	3,4	10	0,15	2,7
Sukita	5,1	Amarelo crepúsculo FCF	3,1	9,2	0,13	2,9
Xamego	5,0	Amarelo crepúsculo, ponceau 4R, corante natural antocianinas	3,3	11,1	0,2	3,2
H2OH	5,0	Corante amarelo crepúsculo FCF	2,0	0,6	0,2	2,6

*Informações adquiridas no rótulo (lista de ingredientes).

** As amostras possuíam açúcar em sua composição, com exceção do refrigerante H2OH (24mg/100mL de aspartame e 6,5mg/100mL de acessulfame K).

***As amostras foram adquiridas em embalagens PET (polietileno tereftalato) de 1,5L e 2L, com exceção do refrigerante Schin Laranja (embalagem de 250mL).

**** Os resultados representados por volume de CO₂, °Brix, %ATT e pH foram obtidos através da realização de análises.

2.3.2 Teste afetivo de aceitação

Os 120 consumidores foram selecionados através de um protocolo de triagem, onde responderam questões sobre hábitos de consumo de refrigerantes, marca preferida, frequência de consumo e se possuíam alguma restrição alimentar. Ao final, responderam se gostariam de participar de uma degustação de refrigerante sabor laranja. Antes da apresentação das amostras, os voluntários preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE. O projeto de pesquisa teve sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP) da Universidade Castelo Branco, sob o protocolo 016/2016.

As amostras foram servidas em blocos completos balanceados, em copos plásticos de 50mL codificados com algarismos de 3 dígitos. Foram servidos 15 mL das amostras à temperatura de refrigeração ($9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os voluntários avaliaram as 8 amostras durante cada sessão. Junto com as amostras foi servido um copo de água filtrada a temperatura ambiente e um biscoito água e sal para os provadores durante as avaliações, visando minimizar o efeito *carryover*. Os testes foram realizados em cabines sensoriais com luz branca apropriadas para análise sensorial. Utilizou-se escala hedônica estruturada de 9 pontos, em que 9 representava a nota máxima “gostei muitíssimo” e 1 a nota mínima “desgostei muitíssimo”. Para o atributo cor laranja, utilizou-se uma escala JAR (*Just About Right*) onde o consumidor deveria indicar a intensidade de cor da amostra, em relação a uma intensidade ideal, onde 9 correspondia a “extremamente mais do que o ideal” e 1 a “extremamente menos que o ideal”.

2.4 Análise estatística

Os resultados do teste afetivo de aceitação foram analisados por análise de variância (ANOVA) e testes de média de Tukey, considerando um nível de 5% de significância.

Para uma melhor compreensão das características sensoriais aplicou-se a técnica multivariada de Análise de Componentes Principais (ACP). Mapas de preferência interno foram obtidos utilizando-se os dados de aceitação. Os dados foram organizados numa matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas), sendo avaliados a partir da matriz de covariâncias. Os resultados foram expressos em gráficos de dispersão das amostras (tratamentos) e de cada consumidor em relação às duas primeiras dimensões principais (REIS et al., 2010).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software *xlstat-sensory analysis and customer insight* versão 2014 (Addinsoft Inc.)

3 Resultados e Discussão

3.1 Análises físico-químicas

As características relacionadas ao Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) dos refrigerantes sabor laranja estabelecidas pela legislação brasileira (BRASIL,1998; BRASIL, 2013) devem ser usadas como parâmetro para avaliação da sua estabilidade. Nesse sentido, várias modificações podem iniciar imediatamente após o envase, especialmente aquelas relacionadas a alteração do volume de gás da bebida e a cor. Os resultados das análises físico-químicas dos refrigerantes referentes as formulações F 1 e F 2, encontram-se disponíveis na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados das análises físico-químicas das amostras de refrigerante produzidas com concentrado de cenoura e maçã (F 1) e controle (F 2), durante o tempo de armazenamento de 150 dias.

Amostras	Dias de armazenamento	Sólidos Solúveis (°Brix)	% ATT (g/ 100 mL de ác. cítrico)	pH	Volume CO ₂
F 1	0	11,83 ^{aA}	0,15 ^{aA}	3,36 ^{aA}	3,05 ^{aA}
	30	11,77 ^{aA}	0,14 ^{bA}	3,38 ^{bA}	3,02 ^{bA}
	60	11,83 ^{aA}	0,14 ^{aA}	3,37 ^{bA}	2,98 ^{aA}
	90	11,63 ^{aCD}	0,15 ^{aA}	3,35 ^{aA}	2,91 ^{aA}
	120	11,57 ^{aCDE}	0,15 ^{aA}	3,39 ^{aA}	3,00 ^{aA}
	150	11,77 ^{aA}	0,15 ^{aA}	3,35 ^{bA}	2,99 ^{ab}
F 2	0	11,80 ^{aA}	0,15 ^{aA}	3,45 ^{aAB}	3,11 ^{aA}
	30	11,67 ^{aAE}	0,15 ^{aA}	3,42 ^{aAB}	3,07 ^{aA}
	60	11,76 ^{aA}	0,15 ^{aA}	3,44 ^{aAB}	3,09 ^{aA}
	90	11,70 ^{aAF}	0,15 ^{aA}	3,43 ^{aAB}	3,00 ^{aA}
	120	11,60 ^{aBDE}	0,14 ^{aB}	3,47 ^{aB}	2,89 ^{aB}
	150	11,70 ^{aAF}	0,14 ^{aA}	3,43 ^{aAB}	2,87 ^{aA}

*Médias com letras iguais numa mesma coluna indica que não há diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não houve variação significativa nos parâmetros físico-químicos ($p \geq 0,05$) de acordo com o período de tempo (150 dias) e as condições de estocagem estudadas, sugerindo que ambas as formulações são estáveis. Embora a literatura seja escassa, alguns estudos conduzidos com amostras de refrigerantes à base de frutas (laranja, maracujá e acerola) também obtiveram os mesmos resultados (SALATA, 2003; BARNABÉ e VENTURINI-FILHO, 2004; CRIVELETTO, 2012). Cabe notar ainda que, o teor de CO₂ nas bebidas não variou durante o

tempo de estocagem, isto se deve ao fato das garrafas não terem sido expostas a condições que promovam a perda de gás. Segundo LOPES (2013) o transporte das garrafas e a exposição ao sol são fatores que concorrem para alterações no teor de CO₂ em refrigerantes.

Em relação a alteração de cor sofrida durante o tempo de armazenamento, observou-se através do cálculo da diferença de cor (ΔE^*) que a formulação contendo concentrado de cenoura e maçã (F 2), apresentou um valor acima de 5,0. Segundo GHIDOUICHE (2013), deve-se considerar que quando (ΔE^*) é maior do que 3-5 unidades, a variação de cor pode ser percebida pelo consumidor, e resultar em rejeição do produto. Em relação a formulação controle (F 1), a cor manteve-se estável, o que era esperado, devido a maior estabilidade dos corantes artificiais. Destaca-se que a estocagem do refrigerante referente a formulação F 2 poderia ser realizada sob refrigeração, o que resultaria na melhor estabilidade do carotenoide. Entretanto, deve-se considerar que a baixa condição de temperatura representaria um custo elevado que refletiria em um aumento no valor do produto final.

3.2 Análises microbiológicas

De acordo com os resultados da análise microbiológica de coliformes a 35 °C, as formulações F 1 e F 2 atenderam aos parâmetros preconizados pela legislação, apresentando-se seguras para consumo. De fato, os coliformes a 35 °C não se multiplicam devido as condições físico-químicas da bebida, entretanto, se a água industrial não foi tratada adequadamente, os coliformes, especialmente as espécies termotolerantes, podem representar um risco (AKOND et al., 2009). A análise de coliformes se justifica especialmente para refrigerantes vendidos em *post mix*, pois a sua presença estará intimamente relacionada a qualidade da água utilizada no ponto de venda (WHITE et al., 2010) e a higiene empregada na limpeza e manutenção do equipamento. A estabilidade microbiológica das formulações também foi avaliada durante o tempo de prateleira (150 dias). Os dados obtidos podem ser observados na Figura 11.

A contagem de bolores e leveduras apresentou um aumento equivalente a 1 ciclo log, na formulação F 1 durante o período de 150 dias de armazenamento, indicando que a robustez da matriz desenvolvida pode ser afetada quando adicionado o ingrediente - concentrado de cenoura e maçã, tornando a bebida mais suscetível a multiplicação microbiana. Ressalta-se, no entanto, que as características visuais do refrigerante em relação a formação de sedimento, diminuição significativa do brix, formação de odores indesejáveis e turvação não foram observadas. É importante mencionar que os bolores só se multiplicarão na bebida se houver perda de CO₂ durante o armazenamento, uma vez que a maior parte das espécies são aeróbias

estritas. Nesse sentido, a embalagem PET pela sua permeabilidade, pode influenciar nesta contaminação (AZEREDO et al., 2016). No entanto, as leveduras constituem o principal grupo deteriorante de bebidas carbonatadas, devido a sua habilidade de se multiplicar em soluções com alta concentração de açúcar e tolerarem ambiente ácido. Desse modo, a higienização rigorosa da linha de processamento, é uma medida de controle importante (CLAVERO, 2010).

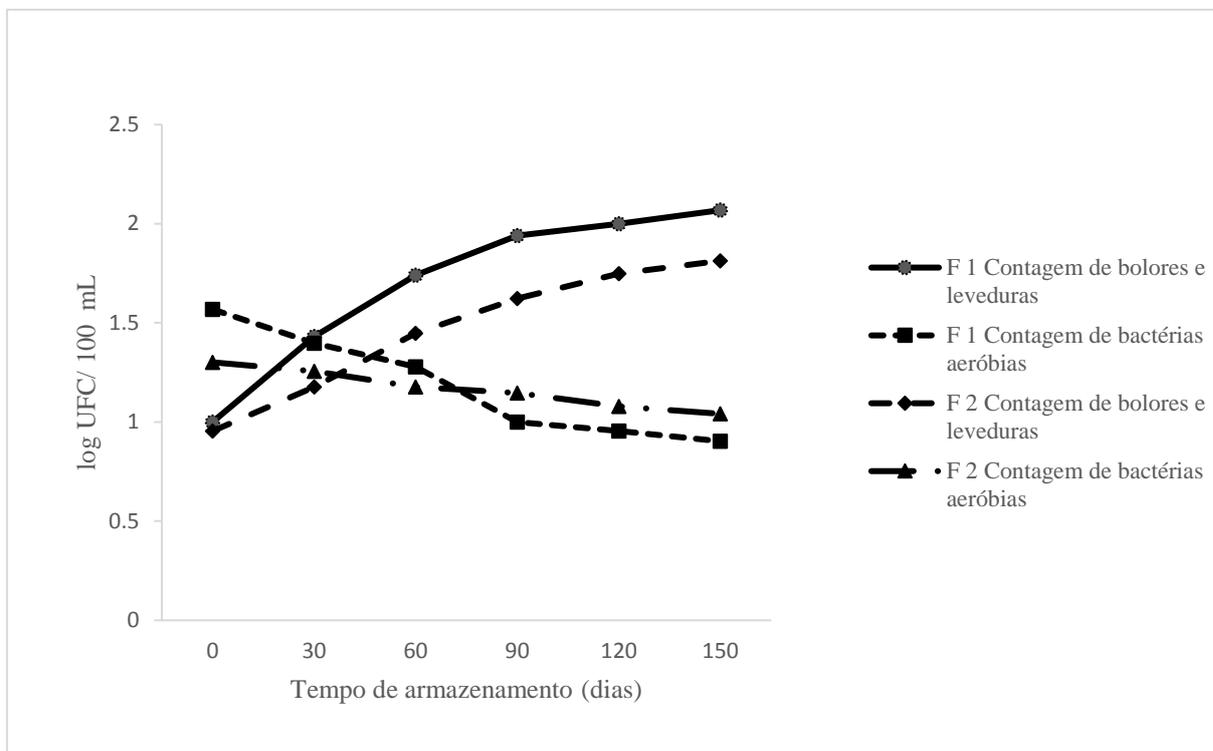


Figura 12: Contagem de bolores e leveduras e bactérias aeróbias totais nas formulações F 1 e F 2.

A contagem de bactérias aeróbias estritas, em ambas formulações, apresentou um declínio ao longo do tempo observado. Este fato pode ser justificado, pois as características do refrigerante como baixo teor de oxigênio, pH ácido e presença de conservadores tornam-se um meio inadequado para a multiplicação dessas espécies. A contagem de bactérias lácticas e de leveduras resistentes a conservadores se manteve inalterada durante o tempo avaliado, ou seja, ausente em 100 mL, o que demonstra que a bebida foi produzida de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.

3.3 Análise sensorial

Os provadores (n=120) selecionados para a análise sensorial são consumidores habituais de refrigerante; 61% consomem a bebida regularmente (2 a 4 vezes por semana). Os sabores

preferidos são cola, guaraná, laranja, uva e limão. O estrato por gênero e idade dos participantes pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9: Segmentação por gênero e idade dos participantes da análise sensorial

	<20	20-29	>30	Total (%)
Homens	60	3	15	78
Mulheres	21	14	7	42
	81 (67,5%)	17 (14,2%)	22 (18,3%)	120 (100%)

A maior parte dos interessados em participar do estudo pertencia ao gênero masculino, confirmando dados da literatura que atestam que os homens consomem mais refrigerantes do que as mulheres (IBGE, 2014). Nesse aspecto, também pode-se levar em consideração a faixa etária. Os resultados referentes ao teste afetivo de aceitação encontram-se na Tabela 10.

As amostras comerciais de Fanta laranja, Sukita, Schin laranja, Xamego e Laranja Convenção e a amostra F 2 apresentaram médias relacionadas a impressão global dentro da região de aceitabilidade, acima do valor de 5,0 – referente ao conceito indiferente. As amostras H2OH e F 1 foram menos preferidas em relação as demais. Observou-se que a cor foi a característica sensorial que mais influenciou os consumidores com relação ao grau de aceitação das amostras, sinalizando que esse parâmetro interferiu, de forma significativa na avaliação de aspectos relacionados ao sabor e aparência, corroborando dados da literatura (FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, 2011). Nota-se uma rejeição das amostras consideradas mais claras, de acordo com o indicado pelos provadores, com base na escala JAR proposta, onde 5 é a intensidade de laranja ideal. Esse resultado foi confirmado pelo Mapa de Preferência interno (Figura 13).

Tabela 10: Média das notas atribuídas pelos consumidores para aparência, aroma, sabor, textura, impressão global e cor para as 8 amostras testadas.

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão global	Cor
Fanta Laranja	7,30 ^a	7,26 ^a	7,43 ^a	6,95 ^a	7,02 ^a	4,97 ^{cd}
Sukita	6,85 ^{ab}	6,10 ^b	5,64 ^b	6,27 ^{ab}	6,11 ^b	5,21 ^{bcd}
Schin Laranja	6,76 ^{ab}	5,86 ^{bc}	5,29 ^{bc}	6,22 ^b	5,73 ^b	5,34 ^{bc}
Xamego	6,79 ^{ab}	5,72 ^{bcd}	4,73 ^{cd}	6,03 ^{bc}	5,48 ^b	5,63 ^b
Laranja Convenção	6,33 ^b	5,39 ^{cde}	4,82 ^{cd}	5,86 ^{bc}	5,46 ^b	4,66 ^d
F 2**	6,18 ^b	4,96 ^{ef}	3,64 ^e	5,47 ^{cd}	5,58 ^c	6,33 ^a
H2OH	4,24 ^c	5,20 ^{def}	4,42 ^{de}	5,10 ^{de}	4,71 ^c	3,10 ^e
F 1***	4,56 ^c	4,56 ^f	4,23 ^{de}	4,54 ^e	4,74 ^c	2,81 ^e

*Médias com letras iguais numa mesma coluna indica que não há diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

** Controle

*** Formulação adicionada de concentrado de cenoura e maçã

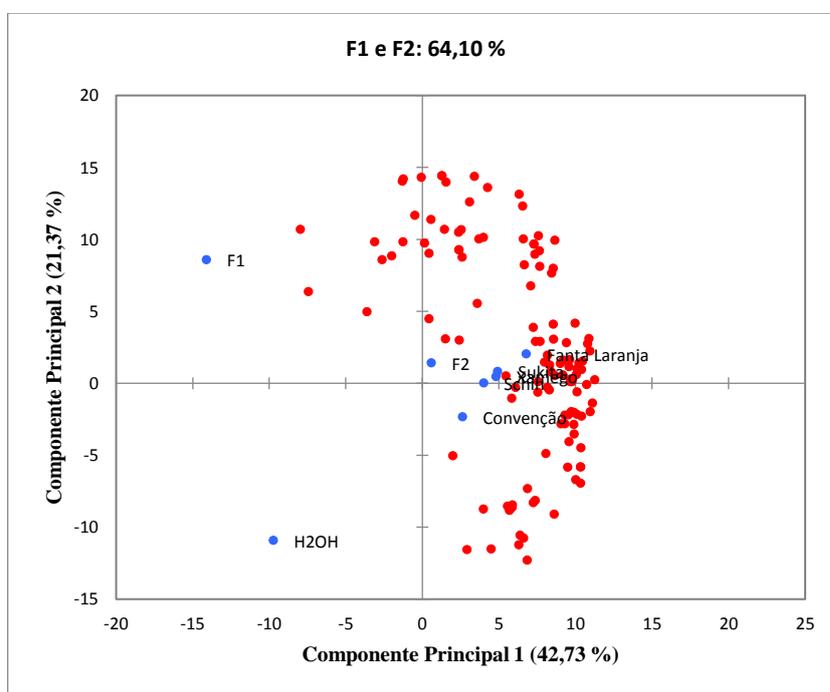


Figura 13: Figura bidimensional do mapa de preferência interno das 8 amostras de refrigerante de laranja avaliadas.

O Mapa de Preferência interno das amostras foi construído de forma a considerar as preferências individuais de cada um dos 120 consumidores. A primeira e a segunda dimensões geradas explicam conjuntamente cerca de 64,10% da variabilidade das respostas.

Evidencia-se três segmentos distintos das amostras com referência aos níveis de aceitação. As amostras situadas à direita no mapa, concentram o maior grupo de consumidores, constituindo àquelas que obtiveram melhores notas, nos atributos avaliados, de acordo com a escala hedônica. Nesse aspecto, é importante sinalizar que esse grupo de amostras possuem corantes artificiais em sua formulação (Tabela 7). Quanto as amostras situadas à esquerda; a amostra F 1 obteve aceitação intermediária, ao passo que a bebida H2OH representa o último grupo de preferência, ou seja, a amostra que teve a menor aceitação. O que pode ser observado pela menor concentração de consumidores e pela distância das demais amostras. Este fato pode ser explicado, pois ambas as bebidas representam características bem diferenciadas das demais, não só relacionadas a cor, mas especialmente a bebida H2OH por ser levemente gaseificada. De acordo com estudos conduzidos por Kaushal, Kaushal e Sharma (2004) em refrigerantes de maçã e pera, a carbonatação melhora o corpo da bebida, o sabor, a intensidade do aroma e otimiza a acidez, contribuindo para uma maior aceitabilidade da bebida. Outro ponto a considerar é que essa bebida é adoçada com edulcorantes, o que pode conferir um sabor metálico, amargo, comumente associado aos adoçantes artificiais (LEKSRISOMPONG et al., 2013).

4. Conclusão

Os resultados obtidos permitem observar que, nas condições testadas, ambas as formulações atenderam ao padrão de identidade e qualidade e se apresentaram estáveis em relação aos parâmetros físico-químicos. Entretanto, a análise colorimétrica revelou uma degradação de cor perceptível ao consumidor na amostra contendo o concentrado de cenoura e maçã durante o tempo de prateleira avaliado.

De acordo com os parâmetros preconizados pela legislação microbiológica, as formulações se mostraram seguras para consumo, demonstrando que as mesmas foram produzidas de acordo com as boas práticas de fabricação. A formulação adicionada de concentrado de cenoura e maçã apresentou um aumento equivalente a 1 ciclo log na contagem de bolores e leveduras, sugerindo que a robustez da matriz desenvolvida pode ser afetada se as condições de higienização da linha de processamento não forem observadas.

Verificou-se que a cor foi a característica sensorial que mais influenciou os consumidores com relação a aceitabilidade das amostras, sinalizando que esse parâmetro interferiu de forma significativa na avaliação de aspectos relacionados ao sabor e aparência, bem como na impressão global.

Este estudo demonstra que os consumidores ainda não estão habituados ao emprego de corantes naturais nas formulações de alimentos e bebidas, mantendo como parâmetro para avaliação de cor, os corantes sintéticos comumente empregados.

É provável que se os provadores soubessem acerca dos benefícios dos corantes naturais à saúde, a aceitabilidade da amostra contendo concentrado de cenoura e maçã teria sido superior as demais.

CAPÍTULO V

APLICAÇÃO DO TESTE DESAFIO E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MULTIPLICAÇÃO MICROBANA (δ) PARA VALIDAÇÃO DE FORMULAÇÃO DE REFRIGERANTE DE LARANJA ADICIONADO DE CONCENTRADO DE CENOURA E MAÇÃ

Resumo

O teste desafio é utilizado para prever a multiplicação microbiana em uma determinada matriz alimentícia. O potencial de multiplicação microbiana (δ) pode ser determinado através da diferença entre a população de micro-organismos ao final do tempo de prateleira e sua população inicial, com o propósito de assegurar a robustez das formulações. O objetivo do presente estudo foi aplicar o teste desafio e determinar o potencial de multiplicação microbiana em diferentes formulações de refrigerante de laranja e no ingrediente - concentrado de cenoura e maçã. O teste desafio foi conduzido inoculando 10^4 UFC/mL de micro-organismos isolados de amostras deterioradas de refrigerantes, oriundas de um banco de culturas de uma indústria de bebidas. Os resultados referentes ao potencial de multiplicação microbiana (δ) indicaram que as leveduras e bactérias lácticas são capazes de se multiplicar na formulação adicionada de concentrado de cenoura e maçã sem conservadores ($\delta \geq 0,5 \log_{10}$), sinalizando que a formulação é sensível. As bactérias acéticas, nessas condições, foram inibidas. Nas formulações preservadas quimicamente com adição de concentrado de cenoura e maçã e a adicionada de corantes artificiais, os resultados referentes ao potencial de multiplicação microbiana (δ) indicaram que as leveduras e bactérias lácticas foram inibidas ($\delta \leq 0,5 \log_{10}$) em ambas as formulações. Entretanto, as leveduras resistentes a conservadores apresentaram habilidade de crescimento ($\delta \geq 0,5 \log_{10}$). No ingrediente concentrado de cenoura e maçã, observou-se que as leveduras, bactérias lácticas e o fungo *Penicillium citrinum* foram inibidos, indicando que o concentrado não deve ser considerado uma fonte de nutriente para a multiplicação microbiana que afetaria a robustez da formulação. Constatou-se a multiplicação das leveduras resistentes a conservadores, com potencial de multiplicação $\delta \geq 0,5 \log_{10}$ em todas as formulações e ingrediente avaliados. Os dados obtidos sinalizam que o desenvolvimento de alimentos mais naturais ainda representa um desafio para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: microbiologia, corante natural, conservadores, ingrediente, bebida carbonatada.

MICROBIAL CHALLENGE TEST (MCT) AND DETERMINATION OF GROWTH POTENTIAL (δ) TO VALIDATE AN ORANGE SOFT DRINK ADDED WITH CARROT AND APPLE CONCENTRATE.

Abstract

Microbiological challenge test (MCT) is used to predict microbial growth in a particular food matrix. The growth potential (δ) can be defined as the difference between the population of a microorganism at the end of shelf life and its initial population, in order to ensure the formula robustness. The aim of this study was to apply the MCT and to determine the growth potential in different formulas of orange soft drink and in the ingredient - carrot and apple concentrate. The MCT was conducting inoculating $\pm 4 \log$ CFU / mL of microorganisms isolated from spoiled soft drinks. Growth potential (δ) indicated that yeast and lactic acid bacteria are able to multiply in the formula containing carrot and apple concentrate without preservatives ($\delta \geq 0.5 \log_{10}$), indicating that the formula is sensitive. Acid acetic bacteria, in these conditions, were inhibited. A preserved formula with the addition of carrot and apple concentrate and other formula with the addition of artificial colors were prepared. The results referring to the growth potential (δ) indicated that yeast and lactic acid bacteria were inhibited ($\delta \leq 0.5 \log_{10}$) in both formulas. However, the preservative resistant yeasts presented growth ability ($\delta \geq 0.5 \log_{10}$). In the apple and carrot concentrate, it was observed that yeast, lactic acid bacteria and fungus *Penicillium citrinum* were inhibited, indicating that this ingredient should not be considered a nutrient source for microbial multiplication that would affect the formula robustness. It was verified the growth of the preservative resistant yeasts (growth potential $\delta \geq 0,5 \log_{10}$) in all the evaluated formulas and ingredient. The data obtained indicate that the development of more natural foods still represents a challenge for the food industry.

Key-words: microbiology, natural color, preservative, ingredient, carbonated soft drink

1. Introdução

Atualmente o consumidor anseia por alimentos mais naturais, saudáveis, a preços acessíveis, que promovam benefícios à saúde e que sejam isentos de aditivos (SPILLMANN, SIEGRIST e KELLER, 2011; BEARTH, COUSIN e SIEGRIST, 2014; KOOIJMANS e FLORES-PALACIO, 2014). Nesse contexto, a composição química dos refrigerantes, especialmente no que concerne aos corantes artificiais e conservadores pode representar riscos ao consumidor (McCANN et al., 2007; MASONE e CHANFORAN, 2015). Por outro lado, os desafios tecnológicos enfrentados pela indústria de alimentos, em um mercado bastante competitivo, demandam muitas questões, além das relacionadas a melhoria dos aspectos sensoriais do produto final. A inovação de produto, consistindo na substituição de aditivos alimentares por ingredientes naturais representa um desafio, pois deve atender aos aspectos relacionados a regulamentação, a qualidade e a segurança do alimento.

De acordo com a legislação, refrigerantes são bebidas gaseificadas, obtidas pela dissolução, em água potável, de suco de fruta ou extrato vegetal de sua origem, adicionados de açúcares ou edulcorantes, acidulantes, aromatizantes, corantes e conservadores. São preservados quimicamente, possuindo pH ácido (faixa de 2,5-4,0) e acima de 2,5 volumes de CO₂ (BRASIL, 1998; BRASIL, 2013). Os refrigerantes são envasados a frio em garrafas PET, de vidro ou latas de alumínio (CERVIERI et al. 2014), sendo considerados produtos tipicamente estáveis a temperatura ambiente.

No que tange aos aspectos de qualidade e segurança, a estabilidade microbiológica dos refrigerantes está relacionada a obstáculos como pH ácido, conservadores e teor de gás carbônico. Além disso, são bebidas adicionadas de açúcar, suco, dissolvidos em uma matriz aquosa, representando alta atividade de água e fonte de carbono significativa para o crescimento microbiano, restringindo somente a multiplicação de espécies patogênicas (MASSA et al., 1998).

As leveduras oxidativas e fermentativas, constituem o principal grupo deteriorador de refrigerantes, uma vez que suportam pH ácido, altas concentrações de CO₂ e ainda algumas espécies apresentam comportamento de resistência aos conservadores usuais de bebidas (STRATFORD, 2006; MARTORELL et al., 2007). Esse mesmo comportamento é exibido pelas bactérias acéticas - *Acinetobacter calcoaceticus* e *Gluconobacter oxydans* (BATTEY & SCHAFFNER, 2001), que só se multiplicarão, se houver perda de gás pela bebida. As bactérias lácticas também sobrevivem em ambientes com baixa tensão de oxigênio e pH ácido, relacionando-se aos ingredientes da bebida e as condições de higienização da linha de processo, uma vez que são capazes de formar biofilmes (LAWLOR, 2009). Os esporos e fragmentos de

micélios de fungos filamentosos podem contaminar o refrigerante, como resultado da qualidade inadequada dos ingredientes, higienização inadequada da linha de processamento e sobretudo da qualidade microbiológica do ar ambiente, em especial da área de envase (DELGADO et al., 2012). A multiplicação dos fungos filamentosos só ocorrerá se houver perda de CO₂ pela bebida (AZEREDO et al., 2016). Contudo, é importante considerar que os micro-organismos citados irão exibir esse comportamento, em função de determinada matriz alimentícia. Caso haja modificações na formulação, temperatura de armazenamento, substituição ou adição de novos ingredientes, a segurança do alimento e conseqüentemente a saúde do consumidor pode ser comprometida.

A indústria de alimentos conduz testes desafio para verificar a multiplicação microbiana numa determinada matriz. Para isso, faz-se necessário descrever o produto e a tecnologia; conduzir a análise de perigos biológicos e determinar a etapa específica envolvida do processo, que pode inibir ou promover o crescimento microbiano. Algumas considerações devem ser feitas em relação aos fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a multiplicação microbiana, métodos de conservação usados para a destruição de patógenos e análise dos dados sobre a segurança do produto (NACMCF, 2010).

Outros objetivos também podem ser alcançados com a aplicação do teste desafio, como a extensão do tempo de prateleira de um produto sob determinadas condições de estocagem, determinar o comportamento microbiano quando o produto permanece em temperaturas de abuso, caracterizar alimentos produzidos localmente (*local food*), avaliar a eficácia de um conservador ou quando o conhecimento a respeito do perigo biológico em potencial ainda não está completamente elucidado (GOMES, FLORIANI e MURAKAMI, 2012; SERRAINO e GIACOMETTI, 2014; PEREIRA et al., 2015). A literatura aborda estudos associando teste desafio e patógenos, especialmente *Listeria monocytogenes* (UYTTENDAELE et al., 2009; AUGUSTIN et al., 2011; SANT'ANNA et al., 2012; EVERIS e BETTS, 2013). Entretanto, estudos envolvendo micro-organismos deterioradores são escassos.

O potencial de multiplicação microbiana (δ) pode ser determinado através de estudos de teste desafio durante o desenvolvimento de produtos, com o objetivo de assegurar a robustez e a qualidade das formulações. Esse potencial pode ser determinado pela diferença entre as contagens (log₁₀ UFC/g) final e inicial de cada micro-organismo durante a vida de prateleira do alimento (BEAUFORT, 2011).

De acordo com o exposto, o presente estudo teve por objetivo aplicar o teste desafio em diferentes matrizes, a saber: (i) refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e

maçã sem adição de conservadores (ii) refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã com conservadores (iii) refrigerante de laranja adicionado de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo com adição de conservadores – formulação controle (iii) ingrediente - concentrado de cenoura e maçã.

2. Material e Métodos

2.1 Desenvolvimento das formulações

Para a condução do teste desafio foram desenvolvidas as formulações, conforme indicado na Tabela 11. Os conservadores sorbato de potássio e benzoato de sódio foram ajustados de forma a atender ao teor de benzeno na bebida final (5µg/L). Todas as formulações foram padronizadas com teores de sólidos solúveis em 12°Brix com adição de sacarose, pH fixado em 3,3 com a utilização de ácido cítrico e carbonatadas com 3,0 volumes de CO₂.

Tabela 11: Formulações desenvolvidas para a condução do teste de desafio microbiológico

Amostras	Corantes artificiais - amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo	Concentrado de cenoura e maçã	Conservadores sorbato de potássio e benzoato de sódio
F 1		X	
F 2		X	X
F 3	X		X

Nota: X significa o ingrediente presente na formulação

O concentrado de cenoura e maçã (nome comercial: Exberry Laranja Outono) foi gentilmente cedido pela empresa GNT.

2.1.1 Produção do refrigerante

As formulações foram produzidas de acordo com o fluxograma disposto na Figura 11.

2.2 Caracterização físico-química das formulações

As amostras foram caracterizadas de acordo com o PIQ (Padrão de Identidade e Qualidade) estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1998; BRASIL, 2013). Foi realizada a determinação do pH através de um pHmetro (Digimed model DM-20), Acidez Total Titulável (ATT) expressa em % de ácido cítrico/100 mL, Atividade de água (Aa) (Aqualab model 4TE *water activity analyser*), SST (sólidos solúveis totais) usando um refratômetro de

bancada ATAGO, determinado à 20 °C e o resultado expressos em (°Brix). As amostras foram descarbonatas e analisadas, em triplicata, conforme metodologia descrita por Adolfo Lutz (2005). O volume de gás carbônico, foi avaliado através de medidor do grau de carbonatação (ZEGLA).

2.3 Teste Desafio

Na condução do teste desafio, determinados fatores devem ser levados em consideração, isso inclui: (i) seleção apropriada de patógenos ou micro-organismos substitutos. Nesse aspecto, o “pool” de micro-organismos deve ter sido isolado de uma formulação similar; patógenos envolvidos em surtos alimentares devem ser incluídos; (ii) concentração do inóculo; (iii) preparação do inóculo e método de inoculação; (iv) tempo de duração do estudo e (v) fatores intrínsecos da formulação e estocagem (IFT, 2003; NACMCF, 2010).

2.3.1 Seleção dos micro-organismos

As culturas selecionadas para o teste foram cedidas por um banco de culturas de uma indústria de refrigerantes. Os micro-organismos são relacionados na Tabela 12.

Tabela 12: Culturas selecionadas para o teste desafio microbiológico.

Micro-organismos	
Leveduras	<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Leveduras resistentes a conservadores	<i>Candida krusei</i> <i>Zygosaccharomyces baillii</i>
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus mali</i>
Bactérias acéticas	<i>Gluconobacter oxydurans</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>

2.3.2 Ativação das culturas

As culturas selecionadas eram mantidas em biofreezer a - 80 °C. Para sua ativação, as cepas de leveduras foram inoculadas em caldo extrato de malte e incubadas a 25 °C/5dias. As cepas de bactérias lácticas foram inoculadas em leite desnatado a 5 % e incubadas a 30 °C/3

dias. Para as cepas de bactérias acéticas, utilizou-se o caldo soro de laranja e incubação a 30 °C/3 dias.

2.3.3 Preparo do inóculo

As culturas ativadas em caldo foram estriadas em meio de cultura sólido. As leveduras foram inoculadas em Agar Batata Dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10 % até pH 3,5; as bactérias lácticas e as bactérias acéticas foram inoculadas em OSA (Agar Soro de Laranja). A incubação seguiu os mesmos parâmetros relatados acima. Após esse período, as culturas foram suspensas em solução salina a 0,85 % acidificada, com o objetivo de permanecerem no pH da bebida. Nesse sentido, é muito importante a manutenção das características do alimento durante o preparo do inóculo. As culturas foram preparadas para que chegassem a uma turvação correspondente ao nível de inóculo de 2×10^7 UFC/mL. A suspensão de leveduras foi padronizada de acordo com unidade 5 da escala de McFarland (Densimat, bioMérieux). Os inóculos de bactérias lácticas e acéticas foram padronizados de acordo a unidade 1,5 da escala de Mcfarland (Densimat, bioMérieux). Experimentos prévios foram realizados correlacionando-se a contagem padrão em placas das cepas utilizadas e a leitura no Densimat.

2.3.4 Inoculação da suspensão de micro-organismos nas amostras de bebidas

As amostras foram inoculadas em triplicata, com as suspensões dos micro-organismos de forma a alcançar um nível desejado de 10^4 UFC/ mL. Após a inoculação, as garrafas foram homogeneizadas. No momento da inoculação, as amostras (acondicionadas em garrafas de 600 mL) foram mantidas em banho de gelo visando minimizar a perda de gás. Após a inoculação, as amostras foram mantidas à 25 °C-30 °C.

2.3.5. Monitoramento do crescimento dos micro-organismos nas amostras inoculadas

Para o monitoramento do crescimento dos micro-organismos inoculados, alíquotas de refrigerante foram descarbonatadas e inoculadas por profundidade em agar BDA acidificado até pH 3,5 (para enumeração de bolores e leveduras), seguido de incubação a 25 °C durante 5 dias. As bactérias lácticas foram contadas através de inoculação de 1 mL de amostra em profundidade em OSA, seguido de incubação, em condições de microaerofilia, a 30 °C/3 dias.

As bactérias acéticas foram contadas em agar OSA, através da inoculação de 1mL de amostra. A incubação ocorreu a 30 °C/3 dias.

Nas amostras não inoculadas (denominadas BR) foi feita a contagem por plaqueamento em profundidade em meios de cultura BDA e OSA, incubado nas condições mencionadas. Para a contagem de bactérias acéticas, a contagem foi realizada por plaqueamento em superfície em meio OSA e seguidas as mesmas condições de incubação mencionadas.

Todas as amostras foram avaliadas no tempo zero e em triplicata em cada ponto. O IFT-Institute of Food Technologists (2003) recomenda que cinco ou sete pontos sejam retirados durante a condução do estudo. Seguindo essa recomendação, os tempos estudados foram 0,14, 28, 35, 42 e 60 dias.

As contagens microbiológicas assinaladas no presente estudo foram realizadas em conformidade com o preconizado por DOWNES e ITO (2001).

2.3.6 Inoculação das suspensões de micro-organismos na amostra de concentrado de cenoura e maçã

As cepas selecionadas para o teste desafio em amostras de concentrado de cenoura e maçã foram igualmente isoladas de bebidas envolvidas em problemas de deterioração, consistindo em “pool” de leveduras, “pool” de leveduras resistentes a conservadores, bactérias lácticas e o fungo *Penicillium citrinum*. Cabe a ressalva de que a concentração de inóculo referente as leveduras, leveduras resistentes a conservadores e bactérias lácticas foi de 10¹ UFC/mL. O procedimento adotado foi semelhante ao anteriormente relatado, porém a ativação dos esporos fúngicos requereu técnica diferenciada. A cepa mantida em biofreezer a -80 °C foi ativada em agar extrato de malte, mantido em garrafas Roux. Após a incubação por 7 a 10 dias, procedeu-se a lavagem do inóculo com cerca de 20 mL de solução salina (0,85 %) acidificada adicionada de tween 80, através do auxílio de uma alça de drigalsky. As hifas e esporos desprendidos foram submetidos a filtração, inicialmente em filtro estéril com porosidade de 100 µm e em seguida em filtro com porosidade de 40µm, com o objetivo de selecionar somente os esporos. Após, realizou-se a contagem de esporos, em câmara de Neubauer. A concentração de esporos em torno 10⁵ células/mL foi inoculada em 100 mL de concentrado de cenoura e maçã, em triplicata.

De igual modo, a enumeração dos micro-organismos selecionados seguiu o descrito no item 2.3.5.

Entretanto, nas amostras não inoculadas (BR) foram feitas contagens de micro-organismos acidófilos, através da técnica de inoculação de 0,1mL da amostra em superfície de agar mGreen e por inoculação de 1mL da diluição 10^1 da amostra, em profundidade, em agar BDA acidificado, seguido de incubação a 25 °C/5 dias. Adicionalmente, foram realizadas contagens por inoculação de 1 mL da diluição 10^1 da amostra, por plaqueamento em profundidade em OSA seguido de incubação a 30 °C/3 dias em microaerofilia.

2.3.7 Determinação do potencial de multiplicação microbiana (δ)

O potencial de crescimento microbiano das formulações foi calculado pela diferença entre as contagens (\log_{10} UFC/g) final (60 dias) e inicial (tempo zero) de cada micro-organismo inoculado. A formulação foi considerada sensível quando o crescimento do micro-organismo foi $> 0,5 \log_{10}$, o que corresponde a incerteza dos métodos microbiológicos. A formulação foi considerada robusta quando o valor de δ for negativo ou $< 0,5 \log_{10}$ (AFSSA, 2004).

3. Resultados e Discussão

No presente estudo, de acordo com as características das bebidas formuladas (pH $< 4,2$ e a atividade de água $> 0,92$) (Tabela 13), a aplicação do teste desafio refere-se a segurança percebida pelo consumidor, que implica nos aspectos relacionados a deterioração do produto, resultando em perdas econômicas e na rejeição do consumidor.

Tabela 13. Fatores intrínsecos característicos das formulações desenvolvidas.

Parâmetros físico-químicos	Valores ^a
pH	3,3±0,03
Atividade de água (Aa)	0,990±0,001
Acidez Total Titulável (% g/ 100 mL de ácido cítrico)	0,15±0,06
Volume CO ₂	3,0±0,14
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	11,93±0,23

^aMédia e desvio-padrão correspondentes as amostras em triplicata.

A aplicação do teste desafio na formulação (F 1) (Figura 13), resultou em um aumento de 1 ciclo log (UFC/ mL) para as bactérias lácticas e 2 ciclos log (UFC/ mL) para as leveduras e leveduras resistentes a conservadores, durante o período de 14 dias. Em consequência, observou-se o abaulamento das embalagens PET e a formação de odores indesejáveis. Os

resultados referentes ao potencial de multiplicação microbiana (δ) (Tabela 14), indicaram que as leveduras e bactérias lácticas são capazes de se multiplicar na formulação sem conservadores ($\delta \geq 0,5 \log_{10}$), sinalizando que a formulação é sensível. As bactérias acéticas foram inibidas, razão pela qual, nos experimentos posteriores, esse grupo microbiano não foi mais utilizado.

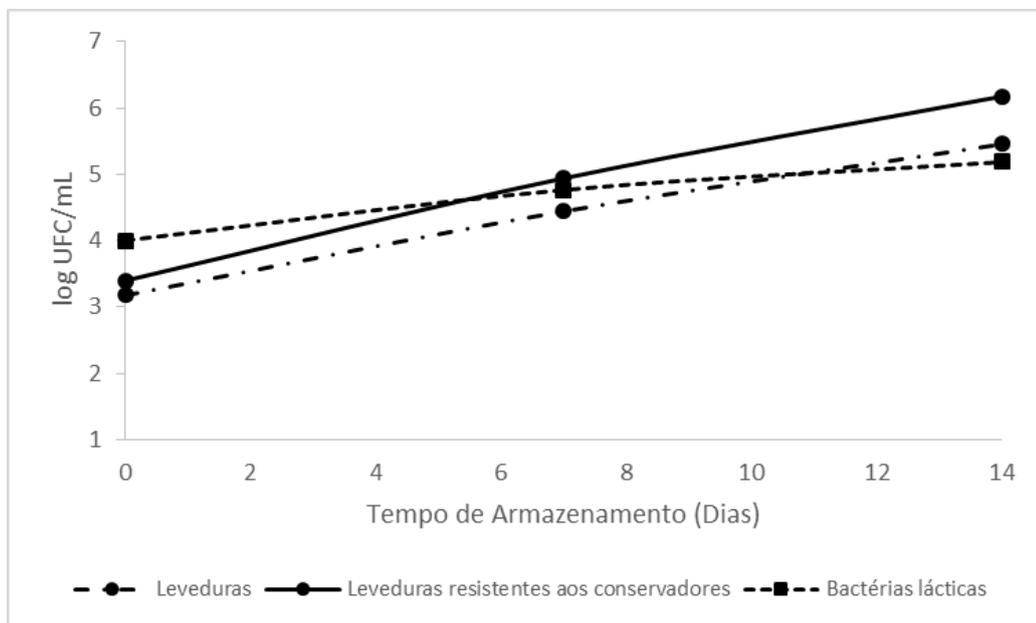


Figura 14. **Formulação F 1.** Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã, sem adição de conservadores (pH 3,3; Aa 0,990 e CO₂ 3,0 v).

Atentos a questão da necessidade da adição dos conservadores no desenvolvimento das formulações, aplicou-se o teste desafio nas matrizes F 2 e F 3 (Figuras 14 e 15), com o objetivo de avaliar se o ingrediente, concentrado de cenoura e maçã, agregava sensibilidade a fórmula.

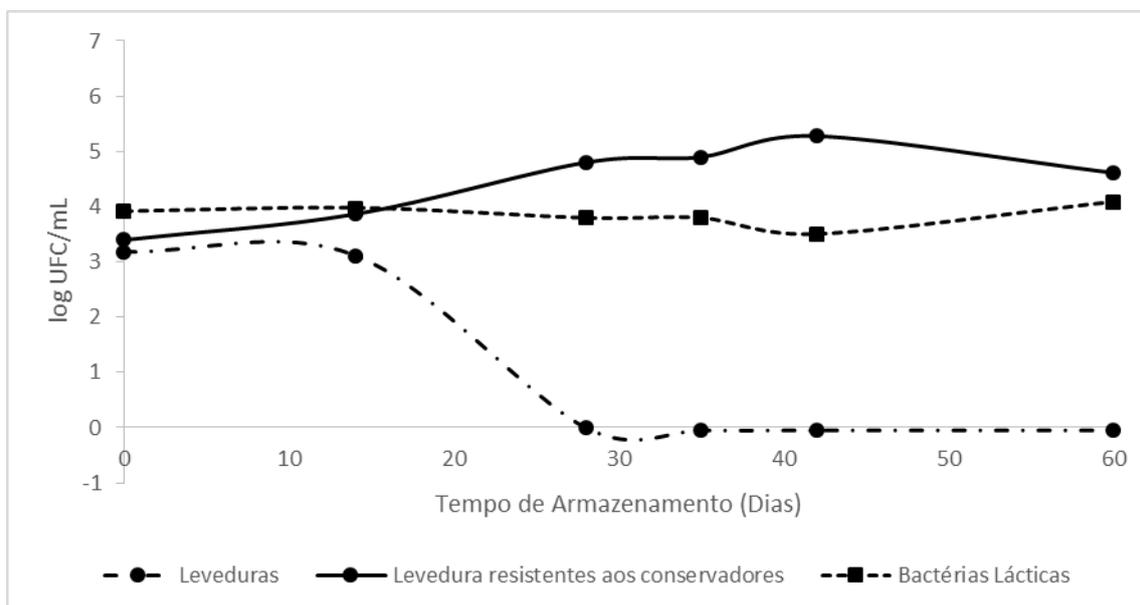


Figura 15. **Formulação F 2.** Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em refrigerante de laranja preservado quimicamente, adicionado de concentrado de cenoura e maçã (pH 3,3; Aa 0,990 e CO₂ 3,0v).

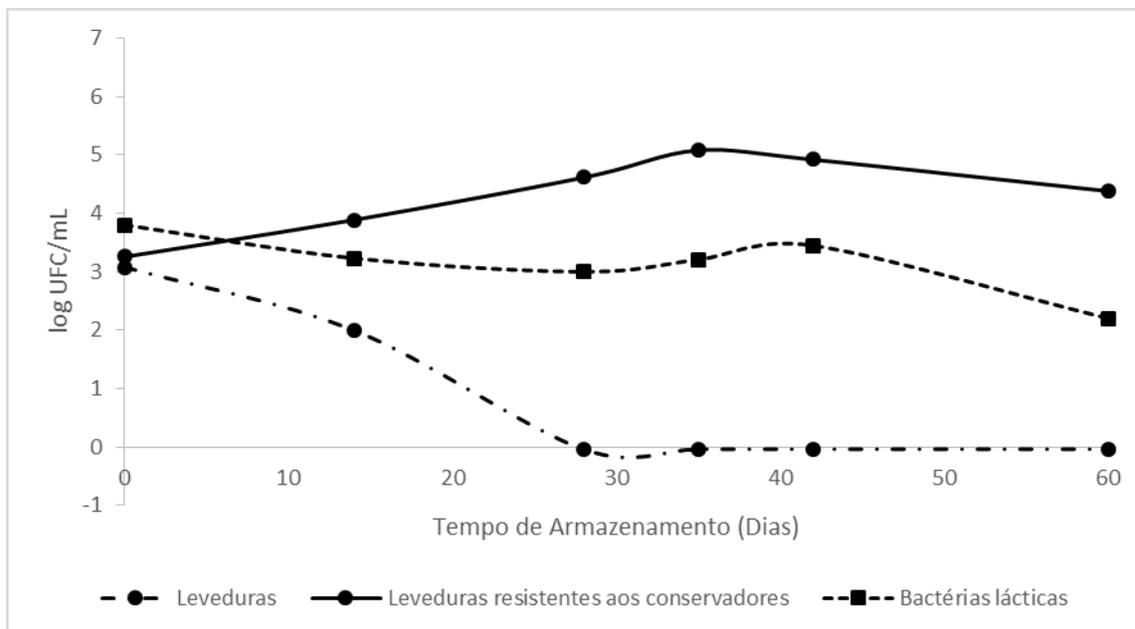


Figura 16. **Formulação F 3.** Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em refrigerante de laranja preservado quimicamente adicionado de corantes artificiais – amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo (pH 3,3; Aa 0,990 e CO₂ 3,0v).

Nas condições testadas, os resultados referentes ao potencial de multiplicação microbiana (δ) (Tabela 14) indicaram que as leveduras e bactérias lácticas foram inibidas ($\delta \leq 0,5 \log_{10}$) em ambas as formulações. Entretanto, as leveduras resistentes a conservadores apresentaram habilidade de crescimento ($\delta \geq 0,5 \log_{10}$). A presença desse grupo de deterioradores está relacionada, especialmente a ingredientes com altas concentrações de açúcar, como no caso dos xaropes utilizados e ainda estão associados a resistência a certos sanificantes, indicando que a higienização da linha de processo pode encontrar-se em condições bastante insatisfatórias (FRISÓN et al., 2015). Sendo assim, as leveduras resistentes aos conservadores podem ser controladas através de um programa de asseguarção da qualidade das matérias-primas e ainda pelo uso de recursos efetivos no planejamento da higienização da planta de processo. Nesse sentido, recomenda-se a troca periódica do princípio ativo dos sanificantes, a adoção do CIP (*cleaning in place*) à quente entre as operações de envase e o uso da bioluminescência, para controle da última água de enxágue oriunda da higienização dos equipamentos.

Destaca-se ainda que, em relação as bactérias lácticas, na formulação adicionada de concentrado de cenoura e maçã, potencial de multiplicação microbiana (δ) (Tabela 14) é superior ao detectado na formulação controle, não alcançando, contudo, o valor $\geq 0,5 \log_{10}$, sugestivo de que a formulação não seria robusta o suficiente. Nesse sentido, considera-se a adoção de medidas de controle mais rígidas, quando do processamento da formulação contendo o concentrado de cenoura e maçã. Ainda, o controle das matérias-primas, sobretudo dos sucos, constitui aspecto de fundamental importância. A higienização de equipamentos, sobretudo da enchedora, realizando-se *swabs* periódicos e a análise da última água de enxágue constituem medidas efetivas. Um plano de higienização que enfoque o planejamento de desmontagem periódica da linha de processamento, com vistas a prevenção da formação de biofilmes, também representa um item crucial.

Aplicou-se o teste desafio no concentrado de cenoura e maçã (Figura 16), com o objetivo de avaliar a habilidade de crescimento e/ou sobrevivência dos micro-organismos testados em um ingrediente natural. Observou-se que as leveduras, bactérias lácticas e o fungo *Penicillium citrinum* foram inibidos, indicando que o concentrado não deve ser considerado como uma fonte de nutriente para o crescimento microbiano que afetaria a robustez da formulação. Entretanto, constatou-se a multiplicação das leveduras resistentes a conservadores, com potencial de multiplicação $\delta \geq 0,5 \log_{10}$ (Tabela 14). Esses micro-organismos representaram um perigo significativo para todas as formulações e ingrediente avaliado, podendo colocar em risco a imagem da empresa junto aos consumidores e ocasionar perdas econômicas. Dessa maneira, todos os esforços devem ser voltados ao controle desses micro-organismos, especialmente quando do planejamento de alimentos seguros.

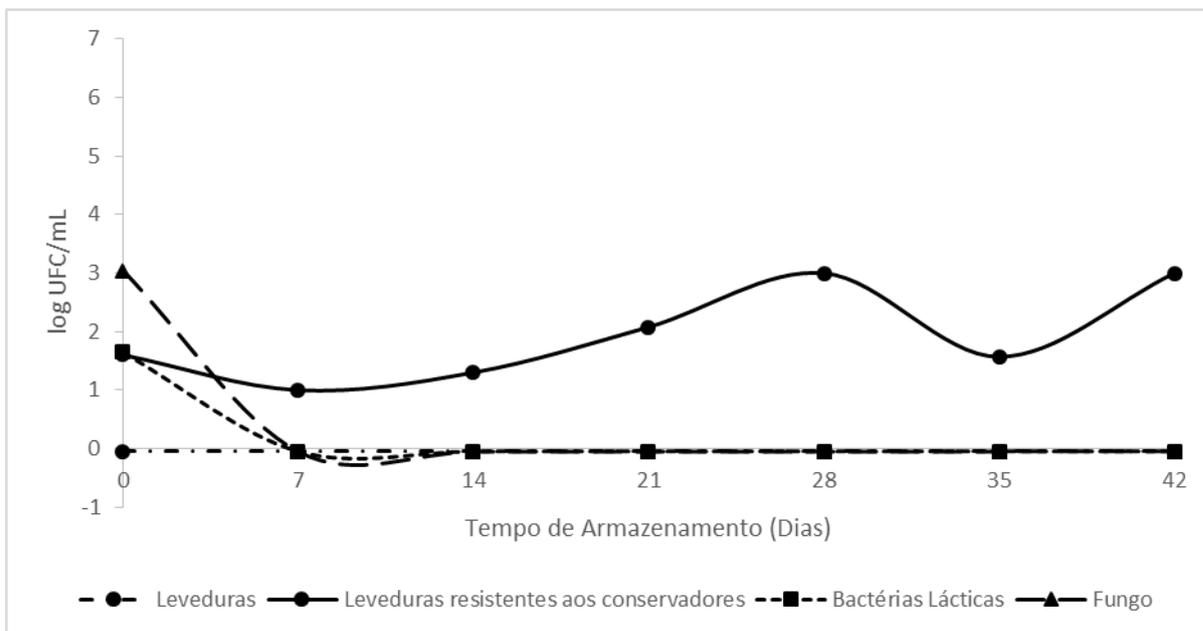


Figura 17. **Concentrado de cenoura e maçã.** Crescimento de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores, bactérias lácticas e fungo.

Tabela 14: Potencial de multiplicação microbiana de leveduras, leveduras resistentes aos conservadores e bactérias lácticas em diferentes formulações de refrigerante sabor laranja e em concentrado de cenoura e maçã.

Formulação	Micro-organismos	Potencial de multiplicação microbiana (δ)(log ₁₀)
F 1	Leveduras	2,29
	Leveduras resistentes a conservadores	2,78
	Bactérias lácticas	1,19
	Bactérias acéticas	inibidas
F 2	Leveduras	-3,22
	Leveduras resistentes a conservadores	1,21
	Bactérias lácticas	0,17
F 3	Leveduras	-3,12
	Leveduras resistentes a conservadores	1,12
	Bactérias lácticas	-1,60
Concentrado de cenoura e maçã	Leveduras resistentes a conservadores	1,40
	Leveduras	inibidas
	Bactérias lácticas	-1,70
	Fungo	-3,09

4. Conclusão

Os resultados obtidos permitem observar que, nas condições testadas, não foi possível desenvolver um refrigerante de laranja adicionado de concentrado de cenoura e maçã livre de conservadores. Cabe frisar que o refrigerante constitui uma bebida que não sofre tratamento térmico, sendo os conservadores o principal obstáculo a multiplicação microbiana.

A formulação adicionada de concentrado de cenoura e maçã e conservadores se mostrou tão robusta quanto a formulação controle, considerando-se os dados relativos ao potencial de multiplicação microbiana (δ). Ainda, o ingrediente concentrado de cenoura e maçã não foi considerado uma fonte de nutriente para o crescimento microbiano, que afetaria a robustez da formulação.

As leveduras resistentes aos conservadores apresentaram habilidade de se multiplicar em todas as formulações desenvolvidas e ingrediente. Destaca-se que esse grupo microbiano é raro no ambiente de processo, contudo deve-se assegurar que as medidas de controle relativas ao plano de higienização da indústria sejam efetivas.

CONCLUSÕES GERAIS

Os corantes artificiais e conservadores presentes nos refrigerantes, sobretudo, no sabor laranja, podem representar um risco à saúde do consumidor. Nessa pesquisa, inicialmente, desenvolveu-se uma formulação, contendo os conservadores benzoato de sódio e sorbato de potássio, na qual os corantes artificiais – amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo foram substituídos por concentrado de cenoura e maçã. Em paralelo, desenvolveu-se ainda uma formulação controle. Foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial das formulações durante o período de armazenamento de 150 dias. Observou-se o atendimento ao padrão de identidade e qualidade e estabilidade das formulações em relação aos parâmetros físico-químicos. Entretanto, na análise colorimétrica observou-se uma degradação de cor perceptível ao consumidor na amostra contendo o concentrado de cenoura e maçã. Em relação as análises microbiológicas, ambas as formulações atenderam aos parâmetros preconizados pela legislação, e no que se refere aos corantes artificiais, a sua substituição pelo concentrado de cenoura e maçã não impactou a estabilidade microbiológica do produto. Em relação a análise sensorial, verificou-se que a cor foi a característica sensorial que mais influenciou os consumidores com relação a aceitabilidade das amostras, sinalizando que esse parâmetro interferiu, de forma significativa na avaliação do sabor e aparência. Através da aplicação do teste desafio e da determinação do potencial de multiplicação microbiana, em uma formulação contendo o concentrado de cenoura e maçã, livre de conservadores, constatou-se que os refrigerantes de laranja não se mostraram estáveis. Nesse sentido, cabe considerar que os refrigerantes não sofrem tratamento térmico, constituindo os conservadores o principal obstáculo à multiplicação microbiana. O concentrado de cenoura e maçã também não se mostrou uma fonte de nutriente para o crescimento microbiano, de forma a afetar a robustez da formulação. Este estudo sinalizou que os consumidores ainda não estão habituados ao emprego de corantes naturais nas formulações de alimentos e bebidas, mantendo como parâmetro para avaliação de cor, os corantes sintéticos comumente empregados. Espera-se que pesquisas como esta possam contribuir na consolidação de mecanismos eficientes para a construção das políticas públicas de segurança dos alimentos, especialmente possibilitar o consumo seguro de aditivos alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não Alcoólicas. Consumo per capita do mercado brasileiro de refrigerantes dos anos 2010 a 2014. Disponível em: <http://abir.org.br/o-setor/dados/refrigerantes/> Acesso em: 27 dez.2015.
- ABRANTES, V.R.S. Avaliação da exposição de crianças pré-escolares ao corante amarelo tartrazina. 20p. 2011. TCC. Especialização em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. v.1, 4ed. Brasília, 2005, 1018p.
- AFREBRAS. Associação dos Fabricantes de Refrigerantes do Brasil. Composição de mercado. Disponível em: <http://afrebras.org.br/setor/bebidas-nao-alcoolicas/composicao-de-mercado/> Acesso em: 27 dez.2015.
- AKOND, M.A., ALAM, S., HASAN, S.M.R., MUBASSARA, S., UDDIN, S.N., SHIRIN, M. Bacterial contaminants in carbonated soft drinks sold in Bangladesh markets. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p. 156–158, 2009.
- ALI, N.F. EL-MOHAMEDY, R.S.R. Eco-friendly and protective natural dye from red prickly pear (*Opuntia Lasiacantha Pfeiffer*) plant. **Journal of Saudi Chemical Society**, 15, p.257-261, 2011.
- AMIN, K. A.; ABDEL HAMEID, H.; ABDELSTTAR, A. H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2994-99, 2010.
- ANCASI, E.G., CARRILO, L., AHRENDTS, M.R.B. Mohos y levaduras em água envasada y bebidas sin alcohol. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.38, p.93-96, 2006.
- AQUINO, F.W.B., FRANCO, D.W. Dextrans in sugars from São Paulo State. **Química Nova**, v.31, p. 1034-1037, 2008.
- ARES, G., GIMÉNEZ, A., GÁMBARO, A. Influence of nutritional knowledge on perceived healthiness and willingness to try functional foods. **Appetite**, v.51, p.663-668, 2008.
- ARORA, S.; AGGARWAL, P. Effect of method of preservation of pulp on the quality of carbonated and noncarbonated beverages prepared from peach fruit. **Journal of Food Quality**, v. 32, p. 695–708, 2009.
- AUGUSTIN, J.C. et al. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. **Food Microbiology**. v.28, p.746-754, 2011.
- AXON, A. et al. Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. **Toxicology**, v. 298, p.40–51, 2012.
- AZEREDO, D.R.P., ALVARENGA, V., SANT'ANA, A.S., SABAA-SRUR, A.O.U. An overview of microorganisms and factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks. **Food Research International**, v.82, p.136-144, 2016.
- BACK, W., BOHAK, I., EHRMANN, M., LUDWIG, W., POT, B., KERTERS, K., SCHLEIFER, K.H. *Lactobacillus perolens* sp. nov. a soft drink spoilage bacterium. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p.354-359, 1999.
- BARNABÉ, D.; VENTURINI FILHO, W.G. Refrigerantes. In: **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Editora Blucher, 2010, v.2. Coordenação: VENTURINI FILHO, W.G.

BARRETO, C.L.A. Crises de segurança do alimento e a demanda por carne bovina no Brasil: Uma análise de Cointegração. 58p. 2014. **Monografia**. Universidade de Brasília, Brasília, DF.

BATTEY, A.S., DUFFY, S., SCHAFFNER, D. W. Modeling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1901–1906, 2002.

BATTEY, A.S., SCHAFFNER, D.W. Modeling bacterial spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.237-247, 2001.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p. 1-20, 2004.

BEARTH, A., COUSIN, M.E.; SIEGRIST, M. The consumer`s perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risks and benefit perceptions. **Food Quality and Preference**, v.38, p.14-23, 2014.

BEAUFORT, A. Determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. **Food Control**, v.22, p.1498-1502, 2011.

BEUCHAT, L.R., GOLDEN, D. A. Antimicrobials occurring naturally in foods. **Food Technology**, v.43, p.134- 142, 1989.

BIEBERSTEIN, A.; RUTTA, J. Gender differences in the meanings associated with food hazards: A means-end chain analysis. **Food Quality and Preference**, v.42, p.165-176, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira. 2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/guia_pedidos.pdf. Acesso em 02 mai. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Informe Técnico n. 68, de 3 de setembro de 2015. Assunto: Classificação dos corantes caramelos II, III e IV e dos demais corantes autorizados para uso em alimentos. Disponível em: <http://novoportal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+68%2C+de+3+de+setembro+de+2015/b4c841fc-b6b5-4d5a-af18-d4b9ad16158f>.

Acesso em 13 dez.2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.5 de 15 de Janeiro de 2007a. Aprova o Regulamento Técnico sobre Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos: Bebidas Não Alcoólicas, Subcategoria: Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas”.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.18 de 24 de março de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. **D.O.U. 25 mar. 2008.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares. 28.11.2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/aditivo.htm> Acesso em: 30 dez. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF, **D.O.U. 14 dez. 2011.** Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acesso em: 09.ago.2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perguntas frequentes sobre aditivos alimentares. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzP

[y8xBz9CP0os3jvQA9PdwMDI0v_EAsXA0-TkPerCAPS29nfzdDQ_2CbEdFAMdr5_s!/?1dmy&uril=wcm%3Apath%3A//Anvisa%20Portal/Anvisa/Perguntas%20Frequentes/Alimentos/a9fa1e00404f94f9a364ab89c90d54b4](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm). Acesso em 13 Jan.2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **D. O. U.**, Brasília, DF, 28 de out. 1997.

BRASIL. Decreto nº8592 de 16 de dezembro de 2015. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que 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. Brasília, DF, **D.O.U. 17 dez. 2015**. Seção 1.

BRASIL. Decreto-lei nº 6.871 de 04 de Junho de 2009a. 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, **D.O.U. 04 jun. 2009**. Seção 1, p. 20.

BRASIL. Informe Técnico nº 30, de 24 de Julho de 2007b. Considerações sobre o corante amarelo tartazina. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm. Acesso em 01 dez.2015.

BRASIL. Informe Técnico nº. 40, de 2 de junho de 2009b. Esclarecimentos sobre o uso do edulcorante ciclamato em alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/40_020609.htm. Acesso em: 05 dez. 2015.

BRASIL. Instrução normativa nº 19, de 19 de Junho de 2013. Estabelece em todo território nacional a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as seguintes bebidas: refresco, refrigerante, bebida composta, chá pronto para consumo e soda. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, **D.O.U. 20 jun. 2013**. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa SDA nº30 de 27 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a bebida dietética e a de baixa caloria. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília, DF, **D.O.U. 29 set.1999**.

BRASIL. Lei nº 8918 de 14 de Julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, **D.O.U. 15 jul. 1994**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **D.O.U. - Diário Oficial da União. Poder executivo, de 10 de janeiro de 2001**. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/portarias/868_98.htm. Acesso em 20 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Rotulagem geral de alimentos embalados. Resolução RDC n.º 259 de 20 de setembro de 2002. Brasília: Ministério da Saúde; 2002. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/259_02rdc.htm> Acesso em: 04 de dez. 2015.

BRASIL. Portaria nº. 544, de 16 de novembro de 1998. Aprova os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília, DF, **D.O.U. 17 nov.1998**

BRASIL. Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNPA - nº 44 de 1977. Considera corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida). **D.O.U. - Diário**

Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de fevereiro de 1978. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ca4ac38045bd9a5898e6fed7a095f735/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 16 jun. 2015.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC – nº 340 de 13 de dezembro de 2002. As empresas fabricantes de alimentos que contenham na sua composição o corante tartrazina (INS 102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/340_02rdc.htm>. Acesso em 17 jun. 2015.

BROWN, J.L., ROSS, T., MCMEEKIN, T.A., NICHOLS, P.D. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, 37, 163–173, 1997.

CAMARGO, G.A., BONACIO, B.B., ZACARCHENCO, P.B. Mercado de bebidas não alcólicas e produtos lácteos com frutas e vegetais. **Leite & Derivados**. n.148, p.60-65, Julho, 2014.

CAMPOS, H.M.; OLIVEIRA, L.H. Estratégias da indústria de refrigerantes: um estudo sobre as tubaínas. **Anais do 2º Encontro Científico da CNEC**. PPGA CNEC/FACECA, Varginha, MG. 2004. Disponível em: <<file:///C:/Users/Denise/Downloads/estrategias-da-industria-de-refrigerantes-um-estudo-sobre-as-tubainas.pdf>>. Acesso em: 27 dez.2015

CAO, X. L; CASEY, V; SEAMAN, S; TAGUE, B; BECALSKI, A. Determination of Benzene in soft Drinks and Other Beverages by Isotope Dilution Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v 90. n.2. p. 479-484. 2007.

CARMO, M.B., TORAL, N. SILVA, M.V., SLATER, B. Consumo de doces, refrigerantes e bebidas com adição de açúcar entre adolescentes da rede pública de ensino de Piracicaba, São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.9, n.1, p.121-130, 2006.

CAROCHO, M. et al. Adding molecules to food, pros and cros: a review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.13, p. 377-399, 2014.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I.C.F.R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v.45, p. 284-295, 2015.

CARRILLO, E.; VARELA, P.; FISZMAN, S. Influence of nutritional knowledge on the use and interpretation of Spanish nutritional food labels. **Journal of Food Science**. v. 71, n.1, 2012.

CAVALCANTI, F. **Veja como é produzido o refrigerante de guaraná**. Ambev, 2013. Disponível em: <http://economia.uol.com.br/album/2013/01/14/veja-como-e-produzido-o-guarana.htm#fotoNav=1>. Acesso em 03 dez. 2015.

CEJUDO-BASTANTE, M.J. et al. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. **Food Research International**, v.64, p. 465-471, 2014.

CELESTINO, S.M.C. **Produção de refrigerantes de frutas**. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF. 2010. 29p.

CERVIERI, O.J., JUNIOR, J.R.T., GALINARI, R., RAWET, E.L., SILVEIRA, C.T. J. O setor de bebidas no Brasil. **BNDES setorial** 40. 2014. p.93-130. Biblioteca Digital. Disponível em:<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%200bebidas%20no%20Brasil_P.pdf>. Acesso em: 27 dez.2015.

CEYHAN, B.M.; et al. Effects of maternally exposed coloring food additives in receptor expressions related to learning and memory rats. **Food Chem Toxicol**. v.56, p. 145–148. 2013.

CHANG, S.-S., KANG, D.-H. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history characteristics and current isolation, detection procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p.55–74, 2004.

CLAVERO, R. Solving microbial spoilage problems in processed food. In: KORNACKI, J.L. (Ed). **Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment**. (p. 63-78). New York: Springer-Verlag, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. About Codex. Update on 01.02.2016. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/> Acesso em 24 mar.2016.

CODEX/GFSA – General Food Standard for Food Additives - CODEX STAN 192-1995 Adopted in 1995. Last revision: 2015. 396p. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gfsa/en/> Acesso em: 02 mai.2016

CONCEIÇÃO, F.V.E. da; SOUSA, R.J. Classificação dos teores de gorduras, açúcar e sódio através da rotulagem nutricional em alimentos industrializados consumidos pelo público infantil. 26p. 2011. **TCC**. Especialização em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

CRUZ, G.F.B. Fabricação de refrigerantes. Rede de Tecnologia e Inovação do Rio de Janeiro – REDETEC. 2012. 35p. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc2NTQ=>. Acesso em 18 jul. 2014.

DAMAR, S., BALABAN, M.O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. **Journal of Food Science**, v.71, p.1-11, 2006.

DataMonitor. Consumer and Innovation Trends in Carbonated Soft Drinks 2013. Canadean Ltda. 117p. 2013.

DAVENPORT, R. R. Forensic microbiology for soft drinks business. **Soft Drinks Management International**, p.34-35, 1996.

DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers and other process controls. **Food Technology**, v.56, p.69–78, 2002.

DAVIDSON, P.M., SOFOS, J.N., BRANEN, A.L. **Antimicrobials in Food**. 3ed. Boca Raton: CRC Press. 679p. 2005.

DELGADO, D.A., SANT’ANA, A.S., GRANATO, D., MASSAGUER, P.R. Inactivation of *Neosartorya fischeri* and *Paecilomyces variotii* on paperboard packaging material by hydrogen peroxide and heat. **Food Control**, v.23, p.165-170, 2012a.

DELGADO, D.A., SANT’ANA, A.S., MASSAGUER, P.R. Occurrence of molds on laminated paperboard for aseptic packaging, selection of the most hydrogen peroxide- and heat-resistant isolates and determination of their thermal death kinetics in sterile distilled water. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.2609-2614. 2012b.

DHINGRA, R., SULLIVAN, L., JACQUES, P.F., WANG, T. J., FOX, C.S., MEIGS, J.B., D’AGOSTINO, R.B., GAZIANO, J.M., VASAN, R.S. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**, v.116, p.480-488, 2007.

DIAS, M.I.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARREIRO, M.F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food Funct.** v.6, p.1035-1052, 2015.

DONG, C.; WANG, W. Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages. **Analytical Chimica Acta**, v.562, p.23-29, 2006.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association. Washington:USA, 4th edition, 2001.

DUARTE, F.M.; ALMEIDA, S.D.S.de; MARTINS, K.A. Alimentação fora do domicílio de universitários de alguns cursos da área de saúde de uma instituição privada. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.37, n.3, p.288-298, 2013.

EFSA. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on food additives. 2008. Disponível em: <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+REPORT+A7-2011-0177+0+DOC+PDF+V0//EN>. Acesso em: 23 out. 2015.

ESTIMA, C.C.P., PHILIPPI, S.T., ARAKI, E.L., LEAL, G.V.S., MARTINEZ, M.F., ALVARENGA, M.S. Consumo de bebidas e refrigerantes por adolescentes de uma escola pública. **Revista Paulista de Pediatria**. n.29, v.1. p.41-5. 2011.

EVANS, G.; de CHALLEMAISON, B.; COX, D.N. Consumer's ratings of the natural and unnatural qualities of foods. **Appetite**, v. 54, p.557–563, 2010.

EVERIS, L., BETTS, G. Evaluation of *Listeria* challenge testing protocols: A practical study using sliced ham. **Food control**. v.29, p.61-65, 2013.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **Benzene in Soft Drinks**.13 apr. 2006 Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108636>. Acesso em: 14 nov. 2015.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **Data on benzene in soft drinks and other beverages**. May 16, 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm055815.htm#table1> Acesso em: 14 nov. 2015.

FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al. Visual and Instrumental evaluation of orange juice color. A consumer's preference study. **Journal of Sensory Studies**, v.26, p.436-444, 2011.

FERRARI, C.C., SOARES, L.M.V. Concentrações de sódio em bebidas carbonatadas nacionais. **Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.3, p.414-417, 2003.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J. SAMSON, R. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. In: Samson, R., Hoekstra, E. and Frisvad, J. (Ed). **Introduction to food- and airborne fungi**. p. 306-320. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004.

FONSECA, M. da C.P. da; SALAY, E. Opinião dos consumidores do município de Campinas (SP) sobre riscos à saúde provenientes dos alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 12, n.1, p.10-25, 2005.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FREITAS, A.S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**. v.7, n.2, p. 65-72, 2012.

FRISÓN, L.N., CHIERICATTI, C.A., ARÍNGOLI, E.E., BASÍLICO, J.C., BASÍLICO, M.Z. Effect of different sanitizers against *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p.4619-4624, 2015.

GARCIA-GONZALEZ, L., GEERAERD, A.H., SPILIMBERGO, S., ELST, K., VAN GINNEKEN, L., DEBEVERE, J., VAN IMPE, J.F., DEVLIEGHERE, F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.1-28, 2007.

GARDNER, L. K.; LAWRENCE, G. D. Benzene Production from Decarboxylation of Benzoic Acid in the Presence of Ascorbic Acid and a Transition-Metal Catalyst. **Journal of Agricultural and Chemistry Food**, New York, v. 41, n. 5, p. 693-695, 1993.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. 2 Edição. ed. São Paulo: Nobel, v.1, 2008. 512 p.

GOMES, M.S.; FLORIANI, L.R; MURAKAMI, F.S. Controle de qualidade microbiológico e avaliação da eficácia de conservante em bebida energética a base de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil). **Rev. Bras. Farm.**, v.93, n.3, p.326-330, 2012.

GHIDOUCHE, S. et al. A rapid tool for the stability assessment of natural food colours. **Food Chemistry**, v. 139, p.978–985, 2013.

HANSEN et al. Beyond the knowledge deficit: recent research into lay and experts attitudes to food risks. **Appetite**, v.41, n.2 p.111-121, 2003.

HARA-KUDO, Y., GOTO, K., ONOUE, Y., WATANABE, M., LEE, K., KUMAGAI, S., SUGITA-KONISHI, Y., OHNISHI, T. Analysis of consumer complaints related to microbial contamination in soft drinks. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.50, p.315-320, 2009.

HILL, C., O'DRISCOLL, B., BOOTH. Acid adaption and food poisoning microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.245–254, 1995.

HORSÁKOVÁ, I., VOLDŘICH, M., ČEŘOVSKÝ, M., SEDLÁČKOVÁ, P., ŠICNEROVÁ, P., ULBRICH, P. *Asaia* sp. as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. **Czech Journal of Food Sciences**, v.27, p.362-365, 2009.

IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 4-methylimidazole. 27 dec.2010. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-015.pdf>. Acesso em: 02 mai. 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF)2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_coonsumo/pofanalise_2008_2009.pdf. Acesso em 18 dez.2015

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde. 2013. Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf>. Acesso em 18 dez.2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF)2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/pof2002a_nalise.pdf. Acesso em 18 dez.2015

ICBA - INTERNATIONAL COUNCIL OF BEVERAGES ASSOCIATIONS. Documento Guia para Redução do Potencial de formação de Benzeno em Bebidas. 2006. Disponível em: <http://www.icba-net.org/files/resources/benzene-portuguese.pdf>. Acesso em 14 nov.2015.

IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. Ponto para o consumidor: empresas tem até dezembro para informar a quantidade de frutas no rótulo de bebidas. 04 dez. 2014. Disponível em: <http://www.idec.org.br/em-acao/em-foco/ponto-para-o-consumidor-empresas-tem-ate-dezembro-para-informar-a-quantidade-de-fruta-nos-rotulos-de-bebidas>. Acesso em 15 dez.2015.

IFT - Institute of Food Technologists. Microbiological challenge testing. **Compr. Rev.Food Sci. Food Saf.** v.2 (supplement), p.46–50, 2003.

INGREDION CONSUMER RESEARCH. The Clean label guide to Europe. 20p. 2014. Disponível em: <http://emea.ingredion.com/Campaign/Clean-Label-Guide.html>. Acesso em: 05 jan.2016.

ISON, R.W., GUTTERIDGE, C.S. Determination of the carbonation tolerance of yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.11-13, 1987.

JUVONEN, R., VIRKAJÄRVI, V., OUTI, P., LAITILA, A. **Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverage**. VTT Research Notes 2599. Vuorimiehentie: Julkaisija – Utgivare, 107p. 2011.

KATZ, B.; WILLIAMS, L.A. Cleaning up processed food. **Food Technology**, v.65, n.12, p.33-37, 2011.

KAUSHAL, N.K.; KAUSHAL, B.B..L.; SHARMA, P.C. Optimization of total soluble solids and carbon dioxide gas pressure for the preparation of carbonated beverages from apple and pear juices. **J Food Sci Technol**, v.41, p.142-149, 2004.

KEMP, A. Evidence supports a trial period of eliminating colourings and preservatives from the diet. **British Medical Journal**, v.336, p.1144, 2008.

KLINE, P. **The handbook of psychological testing** (2nded.). London, UK: Routledge.1999.

KOOIJMANS, A.; FLORES-PALACIO, F. Is eating science or common sense? Knowledge about “natural foods” among self-identified “natural food” consumers, vendors and procedures in rural and urban Mexico. **Appetite**, v.81, p.37-43, 2014.

KORNACKI, J.L. Where these contaminants are found? In: KORNACKI, J.L. (Ed). **Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment**. New York: Springer-Verlag, p.79-102, 2010.

KOYRATTY, B.N.S; AUMJAUD, B.; NEELIAH, S.A. Food additive control: a survey among selected consumers and manufacturers. **British Food Journal**, v.116, n.2, p.353-372, 2014.

KRIEDEL, D. Health safety of soft drinks: contents, containers and microorganisms – review article. **BioMed Research International**, article ID 128697, 15p. 2015.

LACHANCE, M-A., BOWLES, J.M., DIAZ, M.M.C., JANZEN, D.H. *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi* and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1201–1207, 2001.

LAWLOR, K. A., SCHUMAN, J.D., SIMPSON, P.G., TAORMINA, P.J. Microbiological Spoilage of Beverages. In: **Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages**. Editors: SPERBER, W.H., DOYLE, M.P. Springer, 2009. DOI: 10.1007/978-1-4419-0826.

LEGRAS, J.L., ERNY, C., LE, J.C., LOLLIER, M., ADOLPHE, Y., DEMUYTER, C., DELOBEL, P., BLONDIN, B., KARST, F. Activation of two different resistant mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to octanoic and decanoic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.7526-7535, 2010.

LEKSRISOMPONG, P.P. Preference mapping of lemon lime carbonated beverages with regular and diet beverage consumers. **Journal of Food Science**, v.78, n.2, 2013.

LEVANTESI, C., BONADONNA, B., BRIANCESCO, R., GROHMANN, E., TOZE, S., TANDOI, V. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. **Food Research International**, v.45, p.587-602, 2012.

LINDINO, C.A. et al. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. **Acta Science and Technology**, Maringá, v.30, n.1, p.93-98, 2008.

LINO, C.M.; PENA, A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. **Food Chemistry**, v.121, p.503-508, 2010.

LONGO-SILVA, G.; TOLONI, M.H.de A.; MENEZES, R.C.E. de; OLIVEIRA, M.A.A.; TADDEI, J.A. de A.C. Introdução de refrigerantes e sucos industrializados na dieta de lactentes que frequentam creches públicas. **Revista Paulista de Pediatria**. v.33, n.1, p.34-41, 2015.

LOPES, A.S. Simulação do efeito do transporte e da estocagem sobre a qualidade de refrigerantes de uva acondicionados em garrafas PET. **Dissertação** (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2013.

LOUREIRO, V. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. **Food Research International**, v.33, p.247-256, 2000.

LOUREIRO, V., QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.356-365, 1999.

MACHADO, R.M.D., TFOUNI, A.V., VITORINO, S.H.P., VICENTE, E., TOLEDO, M.C.F. Presença dos ácidos benzoico e sórbico em vinhos e sidras produzidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p.847-850, 2007.

MACHADO, S.S.et al. Comportamento dos consumidores com relação à leitura de rótulo de produtos alimentícios. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.17, n.1, p.97-103, jan/mar, 2006.

MAHAN, K.L.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 10.ed. São Paulo: Roca, 2005.

MARTINS, C. G.; OLIVEIRA, A. L. de A.; KAWASHIMA, L. M. Determinação de corante tartrazina em bebidas nacionais não alcoólicas. 2010. Disponível em: http://www.umc.br/XIII_congresso/projetos/Cinthia%20Goncalves%20Martins.pdf. Acesso em: 17 jun. 2015.

MARTINS, N. et al. Food Colorants: challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v.52, p.1-15, 2016.

MARTORELL, P., STRATFORD, M., STEELS, H., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., QUEROL, A. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p.234–242, 2007

MÄRZ, U. **The Global Market of Carotenoids**. A BCC Research Food & Beverage Reports. July, 2015. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-market-fod025c.html> Acesso em: 13 mai. 2016.

MASONE, D.; CHANFORAN, C. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: a computational point of view. **Computational Biology and Chemistry**. v.56, p.252-158, 2015.

MASSA, S., FACCIOLONGO, M., RABASCO, E., CARUSO, M. Survival of indicator/pathogenic bacteria in orange soft drink. **Food Microbiology**, v.15, p.253-257, 1998.

MATA, C.A., BARCELOS, F.A., MARTINS, J.D.L. Pesquisa de *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus coagulase positiva*, bolores e leveduras em superfície de latas de refrigerantes e cerveja. **Revista Higiene Alimentar**, v.24, p. 122-127, 2010.

McCANN, D., BARRETT, A., COOPER, A., CRUMPLER, D., DALEN, L., GRIMSHAW, K., KITCHIN, E., LOK, K., PORTEOUS, L., PRINCE, E., SONUGA-BARKE, E., WARNER, J.O., STEVENSON, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **Lancet**, n. 370, p. 1560–1567, 2007.

MCKNIGHT, I.C., EIROA, M.N.U., SANT'ANA, A.S., MASSAGUER, P.R. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. **Food Microbiology**, v.27, p.1016-1022, 2010.

MEHEDI, N. et al. Reproductive toxicology of tartrazina (FD and C Yellow No.5) in Swiss Albino Mice. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 130-135, 2009.

MEHEDI, N. et al. Reproductive toxicology of tartrazina (FD and C Yellow No.5) in Swiss Albino Mice. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 130-135, 2009.

MENDES, C.M. **Disposição de pagar por alimentos seguros: o caso dos hortifrutícolas sem resíduos de agrotóxicos**. 2002. 71f. Tese (Doutorado em Economia Aplicada). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”; São Paulo. 2002.

MÍDIO, A.F. MARTINS, D.I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000.

MILAGRES, M.P. et al. Impacto da informação sobre a melatonina na aceitabilidade de leite. **B.CEPPA**, Curitiba, v.32, n.1, p.125-134, jan/jun, 2014.

MISLIVEC, P.B., BEUCHAT, L.R., COUSIN, M.A. Yeasts and Molds. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** Washington DC: American Public Health Association, p.239-243. 1992.

MOLLAPOUR, M., PIPER, P.W. Hog1p MAP kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.274–1280, 2006.

MOORE, J.E., MCCALMONT, M., XU, J., MILLAR, B.C., HEANEY, N. *Asaia* sp., an unusual spoilage organism of fruit-flavored bottled water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4130–4131, 2002a.

MOORE, J.E., XU, J., HEANEY, N., MILLAR, B.C. Spoilage of fruit-flavoured bottled water by *Gluconacetobacter sacchari*. **Food Microbiology**, v.19, p.399-401, 2002b.

MORAIS, V.A.D., MADEIRA, J.E.G.C., DIAS, E.C., BONCOMPAGNI, A.C., GONÇALVES, R.C.P., CARVALHO, E. Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, p.1-4, 2003.

MOUTINHO, I.L.D., BERTGES, L.C., ASSIS, R.V.C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow no. 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Braz J Biol**. v. 47, p.141–145, 2007.

MPOUNTOUKAS, P. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food Chem Toxicol**. v. 48, p.2934–2944, 2010.

MPOUNTOUKAS, P., PANTAZAKI, A., KOSTARELI, E., CHRISTODOULOU, P., KARELIA, K., POLILIOU, S., MOURELATOS, C., LAMBROPOULOU, V., LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorantsamaranth, erythrosine and tartrazine. **Food Chem Toxicol**. v.48, p.2934–2944, 2010.

NACMCF. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. **Journal of Food Protection**, v.73, n.1, p.140-202, 2010.

NDAGIJIMANA, M., BELLETI, N., LANCIOTTI, R., GUERZONI, M.E., GARDINI. Effect of aroma compounds on the microbial stabilization of orange-based soft drinks. **Journal of Food Science**, v.69, p. 21-24, 2004.

NEVES, L.C. Inovação Urgente. Desafios do setor de refrigerantes em um mercado em que os consumidores querem cada vez mais produtos saudáveis. **Engarrafador Moderno**. Abr.2015. Disponível em: <http://engarrafadormoderno.com.br/ingredientes/inovacao-urgente>. Acesso em: 17 dez.2015

NOGUEIRA, F.A.M., SICHIERI, R. Associação entre consumo de refrigerantes, sucos e leite, com o índice de massa corporal em escolares da rede pública de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saude Publica**. v.25, n.12, p.2715-24, 2009.

NOGUEIRA, V. Coca-cola Life barrada no Brasil. **O GLOBO**, Rio de Janeiro. 15 jun. 2014. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/coca-cola-life-barrada-no-brasil-12805494>. Acesso em: 05 dez. 2015.

NYMAN, P. J. et al. Evaluation of Accelerated UV and Thermal Testing for Benzene Formation in Beverages Containing Benzoate and Ascorbic Acid. **J. of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 263-267, 2010.

NYMAN, P. J., DIACHENKO, G. W., PERFETTI, G. A., MCNEAL, T.P., HIATT, M. H. MOREHOUSE, K.M. Survey Results of Benzene in Soft Drinks and Other Beverages by Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.571–576, 2008.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

OS CORANTES. Dossiê técnico. Food Ingredients Brasil, nº9, ago/set. 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>. Acesso em: 05 jan.2016.

- OSTROSKI, I.; BARICATTI, R.A.; LINDINO, C.A. Estabilidade dos corantes amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em refrigerantes. **Acta Sci. Technol.** Maringá, v.27, n.2, p.101-106, July/Dec., 2005.
- OTEIZA, J.M., ARES, G., SANT'ANA, A.S., SOTO, S., GIANNUZZI, L. Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus spp.* in concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p.229 – 234, 2011.
- OTEIZA, J.M., SOTO, S., ALVARENGA, V.O., SANT'ANA, A.S., GIANUZZI, L. Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, 172, 119-124, 2014.
- OTEIZA, J.M., SOTO, S., ALVARENGA, V.O., SANT'ANA, A.S., GIANUZZI, L. Fate of *Alicyclobacillus spp.* in enrichment broth and in juice concentrates. **International Journal of Food Microbiology**, v.210, p.73-78, 2015.
- PATAKOVA, P. Monascus secondary metabolites: production and biological activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.40, n.2, p.169-181, 2013.
- PEREIRA, J.A. et al. Shelf life determination of sliced portuguese traditional blood sausage – Morcela de Arroz de Monchique through Microbiological Challenge and Consumer Test. **Journal of Food Science**, v.80, n.3, 2015.
- PIASINI, A., STULP, S., DAL BOSCO, S.M., ADAMI, F.S. Análise da concentração de tartrazina em alimentos consumidos por crianças e adolescentes. **Revista Uningá Review**, v.19, n.1, jul-set 2014, p.14-18.
- PIMENTA, S. de F. **Percepção da população do Distrito Federal quanto ao risco da presença de contaminantes químicos em alimentos**. 2003. 52f. Monografia de conclusão de curso (Especialização Qualidade dos Alimentos). Universidade de Brasília. Centro de Excelência em Turismo. Núcleo de Pesquisa em Produtos. 2003.
- PIPER, P., CALDERON, C.O., HATZIXANTHIS, K., MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v.147, p.2635–2642, 2001.
- PIPER, P.W. Resistance of yeasts to weak organic acid preservatives. **Advances in Applied Microbiology**, v.77, p.97-113, 2011.
- PITT, J.I., HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**, 2.ed. Maryland: Aspen Publishers Inc., 1999. 593p.
- POLÔNIO, M. T.; PERES, F. Consumo de corantes por pré-escolares de um município da Baixada Fluminense, RJ. In: **Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita, RJ**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010. Originalmente apresentada como Tese de Doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca– ENSP/ Fiocruz, 2010.
- POLÔNIO, M.T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.8, p.1653-1666, ago. 2009.
- PORTAL DO CONSUMIDOR. Falta clareza em acordo que restringe venda de refrigerantes nas escolas, avalia Idec. 23/06/2016. Disponível em: <http://www.portaldoconsumidor.gov.br/noticia.asp?busca=sim&id=30825>. Acesso em 23 jun.2016.
- POUL, M. Lack of genotoxicity effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food Chemistry and Toxicology**, v.47, p.443–448, 2009.
- PROTESTE – Associação de Consumidores. Refrigerantes – Os *diets* não escaparam. n.80, maio de 2009, p.21-23. Disponível em: http://p5.proteste.org.br/20111028/refrigerantes-Attach_s555271.pdf. Acesso em: 01 fev. 2013.

PROTESTE – Refrigerantes – Os *diets* não escaparam. n.80, maio de 2009, p.21-23. Disponível em: http://p5.proteste.org.br/20111028/refrigerantes-Attach_s555271.pdf. Acesso em: 14 nov.2015

PROTESTE- Associação de consumidores. PROTESTE pediu fim de corante da Coca. 27 ju.2012. A Coca Cola do Brasil tem maior concentração de corante potencialmente cancerígeno. Há refrigerantes que já usam o caramelo natural, mais seguro. Disponível em: <http://www.proteste.org.br/saude/nc/noticia/proteste-pediu-fim-de-corante-da-coca>. Acesso em: 01 fev.2013.

PROTESTE- Associação de consumidores. Redução de benzeno em refrigerantes. 28 outubro 2011. Fabricantes fizeram acordo com o Ministério Público Federal após PROTESTE detectar a presença da substância cancerígena em sete marcas. Disponível em: <http://www.proteste.org.br/alimentacao/refrigerante/press-release/reducao-de-benzeno-em-refrigerantes>. Acesso em: 01 fev.2013.

RASPOR, P., GORANOVICH, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, p.101–124, 2008.

REIS, D. C. da C. Avaliação da concentração dos corantes amarelo crepúsculo e tartrazina em refrigerantes sabor laranja comercializados em Teresina – PI. Disponível em: <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNAPI2010/paper/viewFile/902/62>. Acesso em 3 dez. 2015.

REIS, R.C. et al. Mapa de Preferência. In: **Análise sensorial: Estudo com consumidores**. MINIM, V.P.R. 2ed. rev.e ampl. – Viçosa, MG: Ed.UFV, 2010, 308p.

RIBEIRO, D.B. Aplicação de Tecnologia Enzimática na Obtenção de β -Caroteno a partir de Óleo de Buriti (*Mauritia vinifera*). **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 2008.

RIOS, A.de O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M. de L.P. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.2, p. 343-350, jan./mar. 2009.

ROCHA, C.D. Determinação dos pontos críticos de contaminação por leveduras em refrigerantes. **Dissertação**. Curso de Pós-Graduação em Patologia, Parasitologia e Microbiologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. 39p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. et al. Update Brazilian database on food carotenoids. Factors affecting carotenoids composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, p.445–463, 2008.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J. P.; LEÃO, L. T. S. **Panorama do setor de bebidas no Brasil**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 23, p. 101-150, mar. 2006.

SALATA, C. da C. Produção de refrigerante a partir de suco integral congelado e suco desidratado de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*): avaliação físico-química, sensorial e econômica. **Dissertação**. Faculdade de Ciências Agrônomicas- UNESP, Botucatu, São Paulo, 2013.

SALVATO, M.A.; FERREIRA, P.C.G.; DUARTE, A.J.M. O impacto da escolaridade sobre a distribuição de renda. **EST. ECON.** São Paulo, v.40, n.4, p.753-791, out-dez, 2010.

SANT'ANA, A.S., DANTIGNY, P., TAHARA, A.C., ROSENTHAL, A., MASSAGUER, P.R. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssochlamys fulva* in clarified apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, 137, 299-302, 2010a.

SANT'ANA, A.S., ROSENTHAL, A., MASSAGUER, P.R. The fate of patulin in apple juice processing: A review. **Food Research International**, v.41, p.441-453, 2008.

SANT'ANA, A.S., SIMAS, R.C., ALMEIDA, C.A.A., CABRAL, E.C., RAUBER, R.H., MALLMANN, C.A., EBERLIN, M.N., ROSENTHAL, A., MASSAGUER, P.R. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.156-163, 2010b.

SANTOS, M.S.; RIBEIRO, F.M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB. 58p. 2005. Disponível em: http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf. Acesso em 3 dez.2015.

SANTOS, V.P.S.; SALGADO, A.M.; TORRES, A.G.; PEREIRA, K.S. Benzene as a chemical hazard in processed foods. Review article. **International Journal of Food Science**. v.2015, article ID 545640. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijfs/2015/545640/abs/> Acesso em: 14 nov. 2015.

SATO, J. Distribution of filamentous fungi in a manufacturing factory for plastic caps for soft drinks. **Biocontrol Science**, v.15, p.87-90, 2010.

SAYED, H.M.; et al. The modifying effect of selenium and vitamins A, C and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. **Mutation Research and Genetic Toxicology Environmental**, v. 744, p.145–153, 2012.

SCHOLTE, R., SAMSON, R., DIJKSTERHUIS J. Spoilage fungi in the industrial processing of foods. In: SAMSON, R., HOEKSTRA, E. AND FRISVAD, J. (Ed). **Introduction to Food and Airborne Fungi**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, p. 339-359, 2004.

SCHUMANN, S. P. A.; POLÔNIO, M. L. T.; GONÇALVES, E. C. B. de A. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 534-539, jul.-set., 2008.

SERRAINO, A.; GIACOMETTI, F. Introduction to challenge test and microbiological characterization of local products. **Italian Journal of Food Safety**, v.3, p.34-35, 2014.

SHAHID, M.; SHAHID,-UL-ISLAM, F.; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of a Cleaner Production**, v.53, p.310-331, 2013.

SHIM, S.-M. et al. Consumer's knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. **Food Control**, v.22, p.1054-1060, 2011.

SICOBEB- Sistema de Controle de Produção de Bebidas. Disponível em: http://gerencialpublico.cmb.gov.br/PROD_BEBIDAS_EMBALAGEM_REGIAO_2014_2015.html. Acesso em: 15 dez. 2015

SIDHU, M.S., LANGRSRUD, S., HOLCK, A. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. **Microbial Drug Resistance**, v.7, p.73-83, 2001.

SOMMER, A.; VYAS, K.S. A Global view on vitamin A and carotenoids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.96, supplement 5, p.1204S–1206S, 2012.

SONG, H., SCHWARZ, N. If it's difficult to pronounce, it must be risky: fluency, familiarity, and risk perception. **Psychological Science**, v.20, n.2, p.135-138, 2009.

SOUZA, A. Coca-Cola, Ambev e Schincariol comprometem-se a reduzir os níveis de benzeno em refrigerantes. **O GLOBO**, Rio de Janeiro. 03 nov. 2011. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/coca-cola-ambev-schincariol-comprometem-se-reduzir-niveis-de-benzeno-em-refrigerantes-3079992>. Acesso em: 14 nov.2015.

SOUZA, A.M.; PEREIRA, R.A.; YOKOO, E.M.; LEVY, B.R.; SICHIERI, R. Alimentos mais consumidos no Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, n.47 (1supl), p.190S-199S, 2013.

SPERS, E. E. Mecanismos de regulação da qualidade e segurança em alimentos. 2003. 136 p. **Tese**. Doutorado em Administração, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPILLMANN, M.D.; SIEGRIST, M.; KELLER, C. Attitudes toward chemicals are associated with preference for natural. **Food Quality and Preference**, v.22, p.149-156, 2011.

SPINELLI, A.C.N.F., SANT'ANA, A.S., RODRIGUES-JUNIOR, S., MASSAGUER, P.R. (2009). Influence of different filling, cooling, and storage conditions on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 in orange juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7409–16, 2009.

SPINELLI, A.C.N.F., SANT'ANA, A.S., PACHECO-SANCHEZ, C.P., MASSAGUER, P.R. Influence of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of decimal reductions and on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice stored at 35 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.295-298, 2010.

SPLITTSTOESSER, D.F., RANSON, D.P. Soft Drinks. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. (3^a ed.). Washington, DC: American Public Health Association, 1992.

SREY, S., JAHID, I.K., HA, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v.31, p.527-585, 2013.

STEELS, H. S., JAMES, A., ROBERTS, I. N., STRATFORD, M. Sorbic acid resistance: the inoculum effect. **Yeast**, v.16, p.1173–1183, 2000.

STEVENS, L.J. et al. Amounts of Artificial Food Colors in Commonly Consumed Beverages and Potential Behavioral Implications for Consumption in Children. **Clinical Pediatrics**, v. 53, n.2, p.133 –140, 2014.

STRATFORD, M. Food and beverage spoilage yeasts. In: QUEROL, H. AND FLEET, G. (Ed.), **Yeasts in food and beverages**. Berlin: Springer-Verlag, p. 335-379, 2006.

STRATFORD, M., BOND, C.J., JAMES, S.A., ROBERTS, I.N., STEELS, H. *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft drinks spoilage yeast isolated from a wasp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1369–1375, 2002.

STRATFORD, M., HOFMAN, P.D., COLE, M.B. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks. In: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. (Eds.) **The Microbiological Safety and Quality of Food**. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, p. 836-869, 2000.

STRATFORD, M., JAMES, S.A. Non-alcoholic beverages and yeasts. In: Boekhout, T. and Robert, V. (Ed.). **Yeasts in Food**. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co. p.309-345. 2003.

STRATFORD, M., NEBEN-VON-CARON, G., STEELS, H., NOVODVORSKA, M., HAYER, K., ARCHER, D.B. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage of *Zygosaccharomyces bailii*. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p.126-134, 2013b.

STRATFORD, M., PLUMRIDGE, A., ARCHER, D.B. Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts in associates with *PADI* gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.6534-6542, 2007.

STRATFORD, M., STEELS, H., NEBEN-VON-CARON, G., NOVODVORSKA, M., HAYER, K., ARCHER, D.B. Weak-acid preservative: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p.164–171, 2013a.

SYAL, R. Soft Drinks Found to Contain High Levels of Cancer-Causing Benzene. The Times.2006. Disponível em: https://www.organicconsumers.org/old_articles/foodsafety/benzene060303.php Acesso: 14 nov. 2015.

TABAI, K. C.; CASTELO BRANCO, N. D. S. D.; HELMS, M. COSTA, J. N. Rotulagem nutricional: situação no município de Seropédica, RJ, **Oikos** (Viçosa, Mg), v. 17, n. 1, p. 105-121, 2006.

TANAKA, T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 44, p.179–187, 2009.

TFOUNI, S.A.V., TOLEDO, M.C.F. Conservadores ácido benzoico e ácido sórbico – uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.35, p.41-53, 2001.

TOLONI, M. H. de A. et al. Introdução de alimentos industrializados e de alimentos de uso tradicional na dieta de crianças de creches públicas no município de São Paulo. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 1, p.61-70, jan./fev., 2011.

TRIBST, A.A.L., SANT'ANA, A.D.S., DE MASSAGUER, P.R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices - past, present and future perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, p.310-39, 2009.

UYTTENDAELE, M. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, p.94-104, 2009.

VARELA, P.; FISZMAN, S.M. Exploring consumer's knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredient. **Food hydrocolloids**, v.30, n.1, p.477-484, 2013.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Soft drinks. **In: VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Beverages: Technology, Chemistry and Microbiology**. London: Chapman & Hall, v.2, chapter 3, p.73-125, 1994.

VARNAM, A.H., SUTHERLAND, J.P. Soft drinks. **Beverages: technology, chemistry and microbiology**. London: Chapman & Hall, p. 73-125, 1994.

VIGITEL BRASIL 2013. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. Série G. Estatística e Informação em Saúde. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <https://biavati.files.wordpress.com/2014/05/vigitel-2013.pdf>. Acesso em 05 dez. 15.

WAREING, P. AND DAVENPORT, R. R. Microbiology of Soft Drinks and Fruit Juices. In: P. R. Ashurst (Ed.). **Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices** (2^a ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltda, 2004.

WEI et al. Optimisation of foods expectations using product colour and appearance. **Food Quality and Preference**, v.23, n.1, p.49-62, 2013.

WHITE, A.S., GODARD, R.D., BELLING, C., KASZA, V., BEACH, R.L. Beverages obtained from soda fountain machines in the U.S. contain microorganisms, including coliform bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.61-66, 2010.

YADAV, A. et al. Sunset yellow FCF, a permitted food dye, alters functional responses of splenocytes at a non-cytotoxic dose. **Toxicology Letters**, v.217, p.197-204. 2013.

YAMADA, Y., YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.15-24,