



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**ESTUDO DOS EFEITOS ESTERILIZANTES DA
APLICAÇÃO DE PULSOS ELÉTRICOS DE ALTA
VOLTAGEM EM ALIMENTOS LÍQUIDOS.**

Junko Tsukamoto
Engenheira Química

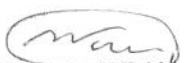
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Junko Tsukamoto**, aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de outubro de 2001.

Campinas, 04 de outubro de 2001

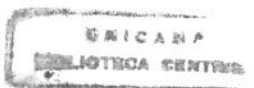
Prof. Dr. Satoshi Tobinaga.
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Co-orientador


Prof. Dr. Satoshi Tobinaga
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

LAMEFI
Campinas
Setembro/ 2001



200201347

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	T789e
V.	Ex.
TOMBO BC/	47130
PROC.	16-837102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12-01-2002
N.º CPD	

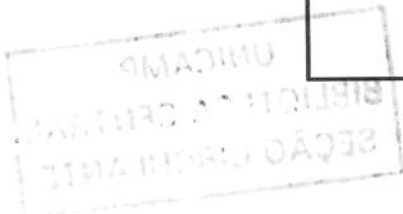
CM00162412-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

T789e Tsukamoto, Junko
Estudo dos efeitos esterilizantes da aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem em alimentos líquidos / Junko Tsukamoto. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Satoshi Tobinaga
Co-orientador: Marcelo Cristianini
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Suco de laranja. 2.*Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*. 3.*Lactobacillus plantarum*. I.Tobinaga, Satoshi. II.Cristianini, Marcelo. III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.Título



Banca Examinadora



Prof. Dr. Satoshi Tobinaga
Orientador (DEA/FEA/UNICAMP)



Prof. Dr. Ranulfo Montealegre
Membro Titular (DEA/FEA/UNICAMP)



Prof.ª Dr.ª Hillary C. Menezes
Membro Titular (DEA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Carlos Alberto Gasparetto
Suplente (DEA/FEA/UNICAMP)

Campinas, de Setembro de 2001.

"Já ancorado na Antártida, ouvi ruídos que pareciam de fritura.

Pensei:

Será que até aqui existem chineses fritando pastéis??

Eram cristais de água doce congelada que faziam aquele som quando entravam em contato com a água salgada. O efeito visual era belíssimo.

Pensei em fotografar, mas falei para mim mesmo:

Calma, você terá muito tempo para isso...

Nos 367 dias que se seguiram o fenômeno não se repetiu.

As oportunidades são únicas".

AMIR KLINK

Amizade: "As raízes são galhos que penetram fundo na terra. Os galhos são raízes que se estendem para o alto no ar".

RABINDRANATH TAGORE

Aos meus ilustríssimos e adorados Pais,
Mitsuho Tsukamoto e Yukiko Tsukamoto
Por serem muito além de especiais.
Amo vocês!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Satoshi Tobinaga por me aceitar como orientanda e que teve paciência comigo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Cristianini pela sugestão, correções contribuindo para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Ioshiaki Doi (FEEC) pelo apoio, discussões e sugestões durante o trabalho.

À banca examinadora, pela atenção, correções, sugestões contribuindo para a realização desta tese.

À minha valiosa família, Nobuko, Tomiko e Alexandre, Akiko e aos sobrinhos maravilhosos Willian Takao e Luane Tiyeke.

Aos meus amigos e colegas em São Paulo, Mário, Marcelo, Silvana e Gilmar, Ximena & família, Adriana V., Denise Pis., pela longa amizade e carinho.

À minha amigona e companheira de todas as situações, Miho.

As minhas amigas e colegas que continuam a nossa amizade mesmo distante, Lúcia de Fátima, Sabine Bejma, Sibille Engler, Frederic Gillet, Tomoko & Kozo Uda, Seiko Kanda e Saeko-san.

À Lyssa, Mara Elga, Silvania, Raquel, Kelly, Michele, Helen, Gláucia, Anoar, Deise, Mari, Eliana, Mami, Julian, Robson, Olim, Ribamar e todo pessoal da turma 99 e 00, pela amizade e carinho. Adoro vocês.

Aos amigos do Laboratório de Medidas Físicas Denise, Ângela Grandin, Elisângela (Ely), Éder, Paty, a amizade e por tudo no decorrer deste trabalho. A Suzi e Ânoar, pela grande ajuda nas correções, fico grata com isso. Obrigada.

À Luciana Ninni (Lasefi), Isaías (Refrigeração) pelo empréstimo de material e a amizade.

À Ana Lourdes (DTA), Fifa pelo empréstimo de material, local de trabalho e sugestões.

Às meninas da moradia casa E1: M.Cristina, A. Lygia, A. Cordeiro & Cia, Mirela, Camila Salles e o noivo, pela amizade e carinho. Adoro vocês.

À FEA pela oportunidade e à CAPES pelo auxílio financeiro.

À FRUTHIL S.A de São Carlos – SP pela doação dos sucos de laranja utilizados para o desenvolvimento da pesquisa.

Índice Geral

NOMENCLATURA.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 SUCO DE LARANJA.....	4
3.2 MICROBIOLOGIA.....	5
3.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i>	5
3.2.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	6
3.3 PROCESSOS UTILIZADOS NA ESTERILIZAÇÃO DE ALIMENTOS.....	6
3.4 PULSO DE CAMPO ELÉTRICO (PEF).....	8
3.5 GERADOR DE TENSÃO DE DIFERENTES FORMAS DE ONDAS.....	10
3.6 EFEITO DO CAMPO ELÉTRICO DE ALTA TENSÃO SOBRE OS MICRORGANISMOS.....	13
3.7 MECANISMOS DE RUPTURA DA MEMBRANA CELULAR.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 MATERIAL.....	21
4.1.1 Matéria-Prima.....	21
4.1.2 Equipamento.....	21
4.2 MÉTODOS.....	24
4.2.1 Cultura Teste.....	24
4.2.2 Inoculação.....	24
4.2.3 Propriedades Físicas Das Amostras.....	24
4.2.3.1 Condutividade elétrica.....	24
4.2.3.2 Viscosidade.....	25
4.2.3.3 pH.....	25

4.2.4	Teste I - Esterilização Em Sistema Contínuo	25
4.2.4.1	Controle do aparelho de PEF I	25
4.2.4.2	Processo de PEF I	25
4.2.4.3	Construção de sistema de geração de pulso elétrico de alta voltagem	26
4.2.4.4	Planejamento Experimental I	28
4.2.5	Teste II - Esterilização em sistema circular I	29
4.2.5.1	Controle do aparelho de PEF II	29
4.2.5.2	Processo de PEF II	29
4.2.5.3	Planejamento Experimental II	31
4.2.6	Teste III - Esterilização em sistema circular II	33
4.2.6.1	Controle de aparelho de PEF III	33
4.2.6.2	Planejamento Experimental III	33
4.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	34
4.4	ANÁLISES FÍSICOS-QUÍMICAS	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA E SOLUÇÃO SALINA	36
5.2	CONTROLE DO APARELHO DE PEF I, II E III	36
5.3	Teste I	36
5.3.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA EM SISTEMA CONTÍNUO	36
5.3.1.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	36
5.3.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i>	39
5.3.1.3	Sugestão e Modificação	42
5.4	Teste II	43
5.4.1	ANÁLISE EXPERIMENTAL EM SISTEMA CIRCULAR I	43
5.4.1.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	43
5.4.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i>	45
5.5	Teste III	48
5.5.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA EM SISTEMA CIRCULAR II	48
5.5.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i>	48
5.6	COR	54

5.7 AÇÚCAR REDUTOR.....	56
6 CONCLUSÃO.....	57
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	58
ANEXO.....	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

Índice de Figuras

Figura. 1	Circuito geral de pulso exponencial.	10
Figura 2	Circuito geral de pulso de ondas quadradas.	11
Figura 3	Circuito geral de pulso bipolar	12
Figura 4	Circuito geral de pulso oscilatório	13
Figura 5	Diagrama da ruptura elétrica reversível e irreversível.	19
Figura 6	Eletroporação da membrana celular	20
Figura 7	Diagrama esquemático de dois tipos de câmaras de tratamento: (A) Eletrodo Placa-Placa.; (B) Eletrodo Cilíndrico Coaxial.	22
Figura 8	Descrição física de câmara de tratamento placa-placa	22
Figura 9	Descrição física de câmara de tratamento coaxial	23
Figura 10	Esquema do procedimento experimental de esterilização em alta-voltagem em sistema contínuo.	26
Figura 11	Diagrama de bloco do circuito elétrico (sist. contínuo).	27
Figura 12	Esquema do processo experimental de esterilização em alta-voltagem em sistema circular.	30
Figura 13	Diagrama de bloco do circuito elétrico (sist. circular).	31
Figura 14	Efeito padronizado: <i>L. plantarum</i> , sistema contínuo, NaCl 0,2g/100 cm ³ , Suco de laranja. Intervalo de confiança: 95%.	37
Figura 15	Efeito padronizado: <i>S. c.var elliposoideus</i> , sistema contínuo, NaCl 0,2%, Suco de laranja. Intervalo de confiança: 95%.	40
Figura 16	Efeito padronizado: <i>L. plantarum</i> , sistema circular, NaCl 0,2%, Suco de laranja. Intervalo de confiança: 95%.	44
Figura 17	Efeito padronizado: <i>S. c.var elliposoideus</i> , sistema circular, NaCl 0,2%, Suco de laranja. Intervalo de confiança: 95%.	46
Figura 18	Efeito Padronizado <i>S. Cerevisiae</i> , sistema circular, Nacl 0,2%, Suco De Laranja,. Intervalo De Confiança 95%.	49

Figura 19	Aplicação de PEF sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i> em solução de NaCl 0,2g/100 cm ³ , 3,6 Hz e 7,5kV em sistema circular (v= 1ml/s).	51
Figura 20	Aplicação de PEF sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i> em suco de laranja, 7,5 kV e 3,6 Hz em sistema circular (v= 1 ml/s).	52
Figura 21	Efeitos de cor das amostras de suco de laranja tratadas pelo processo PEF.	56

Índice de Tabelas

Tabela 1	Microrganismos encontrados no suco	5
Tabela 2	Inativação de microrganismos por tratamento de PEF e de térmico	17
Tabela 3	Definição dos níveis dos fatores (Teste I)	28
Tabela 4	Matriz codificada pelo planejamento 2^3 (Teste I)	28
Tabela 5	Definição dos níveis dos fatores (Teste II)	31
Tabela 6	Valores de nº de ciclos calculados	32
Tabela 7	Matriz codificada pelo planejamento 2^3 (Teste II)	32
Tabela 8	Definição dos níveis dos dois fatores (Teste III)	33
Tabela 9	Matriz codificada pelo planejamento 2^2 (Teste III)	34
Tabela 10	Caracterização físico-química do suco de laranja e solução salina	36
Tabela 11	Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de <i>Lactobacillus plantarum</i> em sistema contínuo.	37
Tabela 12	Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i> em sistema contínuo.	39
Tabela 13	Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de <i>L. plantarum</i> em sistema circular I	43
Tabela 14	Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de <i>S.c.</i> var <i>cerevisiae</i> em sistema circular I.	45
Tabela 15	Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>ellipsoideus</i> em sistema circular II utilizando a câmara de tratamento placa-placa e vazão 1 ml/s.	48
Tabela 16	Médias amostrais do efeito de cor de suco de laranja antes e após o tratamento de PEF.	55
Tabela 17	Valores de análise de açúcar redutor – DNS	57
Tabela 18	Desenvolvimento de crescimento de levedura.	61
Tabela 19	Valores experimentais realizados com o teste I: <i>Lactobacillus plantarum</i> , sistema contínuo, suco de laranja.	63

Tabela 20	Valores experimentais realizados com o teste I: <i>Lactobacillus plantarum</i> , sistema contínuo, NaCl 0,2% (p/v).	64
Tabela 21	Valores experimentais realizados com o teste I: <i>Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus</i> , sistema contínuo, suco de laranja.	65
Tabela 22	Valores experimentais realizados com o teste I: <i>Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus</i> , sistema contínuo, NaCl 0,2%.	66
Tabela 23	Valores experimentais realizados com o teste II: <i>Lactobacillus plantarum</i> , sistema circular I, em suco de laranja.	67
Tabela 24	Valores experimentais realizados com o teste II: <i>Lactobacillus plantarum</i> , sistema circular I, em NaCl 0,2% (p/v).	68
Tabela 25	Valores experimentais realizados com o teste II: <i>Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus</i> , sistema circular I, suco de laranja.	69
Tabela 26	Valores experimentais realizados com o teste II: <i>Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus</i> , sistema circular I, NaCl 0,2% (p/v).	70
Tabela 27	Valores experimentais realizados em sistema circular II: suco de laranja, <i>Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus</i> , câmara de tratamento placa-placa, vazão 1 ml/s.	71
Tabela 28	Valores experimentais realizados em sistema circular II: solução salina (NaCl 0,2% (p/v)), <i>Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus</i> , câmara de tratamento placa-placa, vazão 1 ml/s.	72

Nomenclatura

τ	Tempo de carga e descarga	μ s (microsegundo) ms (milisegundo)
A_b	Área da base	
Abs	Absorbância	
AC	Corrente alternada	
ATCC	American Type Culture Collection	
C	capacitor	KpF (kilopico faraday); NF (nano faraday) kilo = 10^3 ; pico = 10^{12} . nano = 10^9
CD=T.C.	Câmara de descarga elétrica; de tratamento	
σ	Condutividade elétrica	MS/cm (miliSiemens por centímetro)
DC	Corrente contínuo	
E	Campo elétrico	kV/cm
e	Espessura	mm; μ m (micrômetro)
F	Frequência	Hz (Hertz)
IR	Interruptor rotativo	
L	comprimento	cm
NaCl 02g/ 100cm³	Solução salina de cloreto de sódio	
Número de pulsos ou pulsos	Relação de tempo de tratamento dentro da câmara sobre o "pulse width".	
PEF	Pulso de campo elétrico	
R	Resistência	Ω (ohm) k Ω (kilo ohm)
RAV	Retificador de alta voltagem	
TAV	Transformador de alta voltagem	
Ufc/ml	Unidade formadora de colônia por mililitro	
V	voltagem	kV
Vol	volume	ml
VV	Variador de voltagem	

Tese de Mestrado**Autora:** Junko Tsukamoto.**Orientador:** Satoshi Tobinaga PhD**Co-orientador:** Marcelo Cristianini PhD**Título:** “ESTUDO DOS EFEITOS ESTERILIZANTES DA APLICAÇÃO DE PULSOS ELÉTRICOS DE ALTA VOLTAGEM EM ALIMENTOS LÍQUIDOS.”**Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP****Resumo**

Existem muitos processos operacionais nas indústrias de alimentos que requerem aplicação de métodos de preservação, por esterilização, de alimentos líquidos. Os processos não-térmicos têm obtido a importância tecnológica vantajosa para conservação de alimentos, inativando os microrganismos e minimizando os aspectos negativos tais como a degradação de sabor, nutriente e vitaminas que ocorrem no tradicional tratamento térmico. Um dos processos não-térmicos que está sendo pesquisado no presente trabalho é o pulso de campo elétrico (PEF). O objetivo deste estudo foi a análise de redução de população de microrganismos pela aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem utilizando câmaras de tratamento com eletrodos de descarga dos tipos placa-placa e coaxial. Os microrganismos analisados foram *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* e *Lactobacillus plantarum* suspensos em amostras de soluções aquosas de NaCl 0,2 g/100 cm³ e suco de laranja com os mesmos valores de condutividade elétrica. As corridas experimentais foram realizadas em sistema contínuo e sistema de recirculação sendo bombeado a vazões constantes de 1 e de 2 ml/s de amostras, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, através da câmara de tratamento, onde eram mantidos pulsos elétricos de 7,5 kV e frequência de 1.1 e 4.4 Hz; e de 3.6 e 5.8 Hz. Os resultados indicaram que o sistema contínuo foi ineficiente na inativação dos dois microrganismos e o sistema de recirculação apresentou efeito positivo utilizando a câmara com os eletrodos placa-placa que foi mais eficiente para a levedura suspensa no suco de laranja, onde se observou a redução de no máximo 2 ciclos logarítmicos e na solução salina 1 ciclo logarítmico. A câmara com os eletrodos coaxiais foi menos eficiente na inativação. O lactobacilo apresentou redução de menos de um ciclo

logarítmico, quando inoculado em duas amostras líquidas processadas em sistema circular utilizando os eletrodos placa-placa e coaxial.

Não houve modificação na cor entre as amostras de suco de laranja antes e depois do PEF. Em relação ao açúcar redutor observado, houve diferença significativa entre o padrão e as amostras.

Palavras-chaves: pulsos de campo elétrico, suco de laranja, solução aquosa de NaCl 0,2 g/ 100cm³, inativação, *S. cerevisiae* var *ellipsoideus*, *Lactobacillus plantarum*.

Thesis of Master

Author: Junko Tsukamoto.

Adviser: Satoshi Tobinaga PhD

Co-adviser: Marcelo Cristianini PhD

Title: "STUDY OF INACTIVATION EFFECT BY PULSED ELECTRIC FIELD APPLICATION UNDER LIQUIDS FEED."

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Summary

Non-thermal food pasteurization and sterilization technologies are receiving increasing attention. The advantage is that of sterilizing contaminants in liquid foods without denaturation of some physiological compounds such as proteins and vitamins. In this research, the effects of the shape of the treatment chamber (plate-plate electrodes and coaxial) and inactivation of microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* and *Lactobacillus plantarum*) using a pulsed electric field (PEF) discharge suspended in orange juice and in a 0.2 g/100 cm³ NaCl solution, with the same conductivity, were studied. The suspension fluid was applied at a temperature of 26±1°C. The PEF processing conditions for both samples were 7.5 kV, 1.1 ~ 5.8 Hz frequency. The PEF treatment of liquid samples was accomplished by continuous and circulatory systems at a flow rate of 1 and 2 ml/s through PEF treatment chamber. The present experimental results indicate that the continuous system was inefficient in the destruction of both microorganisms. The results indicate that the cell destruction by PEF using the circulatory system was efficient, yeast cells dispersed in orange juice being almost all destroyed when the plate-plate electrodes were used with 7.5 kV and frequency (1.1 ~ 5.8 Hz). A 5 to 4 log reduction of that microorganism were observed. This value was lower than that required in the coaxial electrode. Yeast cells were more sensitive than the lactic organism in both liquid samples and that did not required in the both electrodes.

No difference in color modification was observed between the control and PEF treated samples. For reducing sugars, there was a significant difference between the standard and the PEF process treated samples.

Keywords: pulsed electric field, orange juice, 0.2g/100 cm³ saline solution, inactivation, *S. cerevisiae* var *ellipsoideus*, *Lactobacillus plantarum*.

1 INTRODUÇÃO

Esterilização é um termo absoluto que significa a destruição total de qualquer forma de vida (bactérias, fungos, vírus e esporos). A esterilização, por elevação de temperatura, é um dos métodos mais simples e largamente empregado na preservação de alimentos em função da sua confiabilidade e viabilidade econômica, mas apresenta algumas desvantagens. A alta resistência térmica de alguns microorganismos implica em submeter os alimentos a altas temperaturas, por períodos relativamente longos, o que pode provocar reações indesejáveis produzindo efeitos negativos na qualidade dos alimentos. Assim, em muitos casos não é aplicável até a exaustão da população microbiana devido a termosensibilidade dos alimentos.

Tratando-se de alimentos, não é possível pensar somente em efeitos que ocasionam a morte total dos microorganismos, para prolongar sua vida de prateleira. A qualidade do produto final, em termos de valores nutrientes e sensoriais (sabor, aroma e cor), deve ser levada em conta, juntamente com as condições que geram a morte dos microorganismos nocivos e de outras reações favoráveis e desfavoráveis. Os métodos denominados não térmicos de preservação de alimentos, há algum tempo, vem sendo pesquisados intensamente.

Pesquisas revelam que as bactérias e vírus podem ser destruídos por métodos não térmicos, tais como:

- por elevação de pressão estática Hayakawa *et al* (1994a), Hayakawa *et al* (1994b) e Barbosa Canovás *et al* (1998),
- por radiação eletromagnética, Barbosa-Cánovas *et al* (1998),
- por pulsos de alta-voltagem Mizuno e Hori (1988); Palaniapran e Sasty (1990); Sato *et al* (1990); Jayaram *et al* (1992); Sato *et al* (1996); Pothakamury *et al* (1995a); Pothakamury *et al* (1995b); Martin.O *et al* (1994); Zhang *et al* (1994a), Zhang *et al* (1994b), Zhang *et al* (1995); Liu *et al* (1994); Ho *et al* (1996); Wouters *et al* (1997), Bruhn *et al* (1997); Bai

et al (1998); Barbosa Cánovas *et al* (1998); Reina *et al* (1998); Jia *et al* (1999).

O uso da tecnologia não-térmica para a esterilização de alimentos causa menos alterações nas propriedades sensoriais e nutricionais nestes, apresentando-se mais vantajosa em relação à tecnologia térmica. Mas a aplicação da tecnologia não-térmica depende do tipo de alimento a ser processado. Por exemplo, a alta-pressão, campo magnético oscilante, agente antimicrobiano são benéficos aplicados em alimentos líquidos e sólidos, enquanto que o campo elétrico pulsado é mais adequado para alimentos líquidos. Já a irradiação é mais empregada para alimentos sólidos. (Barbosa-Cánovas *et al*, 1998).

Dentre essas tecnologias citadas, a alta-pressão hidrostática e radiação têm usado em escala comercial e as aplicações potenciais como, pulso de campo elétrico, campo magnético oscilado e pulsos a luz, para estabilização de alimentos, ainda estão em estudos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da aplicação de pulsos de campo elétrico na redução de carga microbiana de alimentos líquidos.

2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Análise dos efeitos da natureza dos líquidos, redução de população de microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* e *Lactobacillus plantarum*); comparar a eficiência dos dois tipos de eletrodos (placa-placa, coaxial) em dois tipos de meios (solução salina 0,2g/cm³ (NaCl) e suco de laranja); frequência dos pulsos, do tempo de descarga pela aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem e comparar a qualidade em termos de retenção de cor e açúcares.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUCO DE LARANJA

Segundo a Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos, cerca de 73,3% da produção de laranja produzida na safra de Junho/97 foi processada. Segundo reportagem de Aguiar (1997), os estados São Paulo e Flórida (USA) produzem conjuntamente 90% de todo o suco de laranja consumido no mundo. Pelo alto consumo de seu suco, os consumidores bebem-no pela alta quantidade de vitamina C e de sabor agradável (Jia *et al*, 1998).

O aroma de laranja consiste de mais de 200 compostos, e no suco está contido 0,02% do total do peso. O aroma é composto de 75 a 98% de hidrocarbonetos, 0,6 a 1,7% de aldeídos, 1% de ésteres, 1% de cetonas e 1 a 5% de álcoois.

O suco se deteriora facilmente por calor, contaminações microbiológicas, reações enzimáticas, oxidações e luz durante o processamento e estocagem. O tempo de prateleira do suco não-pasteurizado é somente doze dias a 4,4°C (Jia *et al*, 1998).

Baseados no conteúdo de nutrientes, no suco de laranja é capaz de desenvolver o crescimento de bactérias, leveduras e bolores. No entanto como o pH da fruta é um fator intrínseco, pode-se explicar a ausência de bactérias na deterioração incipiente dos frutos (Yokoya e Canhos, 1967).

Na Tabela 1 estão expostos alguns dos microrganismos que podem acompanhar o fruto até a indústria, alguns irão propagar a sua contaminação através do suco ou equipamento, outros (a maioria) serão destruídos ou terão condições desfavoráveis para o seu crescimento tais como pH, Brix, potencial de oxi-redução. Este fato fez com que as indústrias de suco investissem em tecnologia para a produção do suco

esterilizado por vários métodos, tais como pasteurização, alta pressão hidrostática, campo magnético oscilante, radiação, pulso de alta voltagem.

Tabela 1 – Microrganismos encontrados no suco

Leveduras	Bolores	Bactérias	
Hanseniaspora melliger	Asperigillus glaucus	Leuconostoc mesenteroides	Zymomonas
Candida pulcheerri	Asperigillus niger	Leuconostoc dextranicum	Escherichia coli
Hansenula anomala	Penicillium roquefortii	Lactobacillus hilgardi	Escherichia freundii
Trichosporon cutaneum	Mucor	Lactobacillus buchneri	Staphylococcus
Trichosporon pullulans	Botrytis cinerea	Lactobacillus fermenti	Streptococcus faecalis
S. cerevisiae var. ellipsoideus	Byssoschlamys nivea	Lactobacillus brevis	Streptococcus faecium
Saccharomyces rouxii	Citromyces	Lactobacillus plantarum	Streptococcus durans
Debaryomyces hansenii	Fusarium	Lactobacillus acidophilus	Acetobacter ananatis
Zygosaccharomyces vini	Paecilomyces	Bacillus subtilis	Achromobacter
		Enterobacter aerogenes	Erwinia
		Xanthomonas	Pseudomonas

Fonte: YOKOYA e CANHOS (1967)

3.2 MICROBIOLOGIA

3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*

As leveduras ocupam um papel de destaque como agentes de deterioração de vários produtos vegetais inclusive de sucos cítricos. Um dos gêneros que tem maior atuação é o *S. cerevisiae* (Siebel, 1978)

A levedura tem forma elipsoidal, com comprimento e diâmetro de 8 µm e 4 µm, respectivamente (Mizuno & Hori, 1988). O intervalo de temperatura de crescimento deste microrganismo é de 25 a 30°C, tendo pH ótimo no intervalo de 4 a 4,5 e não tem

desenvolvimento em meio alcalino. Seu crescimento ótimo ocorre em condições aeróbicas.

Os açúcares são os melhores substratos energéticos das leveduras.

3.2.2 *Lactobacillus plantarum*

Dentre as espécies de bactérias lácticas encontradas nos sucos cítricos, ocorrem espécies com ação prejudicial e que produzem acetil-metil-carbinol que, por sua vez, é convertido em diacetil responsável por modificações de sabor. Uma das espécies de maior ocorrência é o *Lactobacillus plantarum* (Siebel, 1978).

A bactéria apresenta-se sobre a forma esférica ou ovóide, tamanho 0,5 – 1,2 X 0,5 – 1,5 µm. Microrganismo gram positivo, seu ambiente de melhor crescimento é em meio anaeróbio e desenvolve-se no intervalo de temperatura de 30 a 35°C (Wood & Holzaptel, 1995).

3.3 PROCESSOS UTILIZADOS NA ESTERILIZAÇÃO DE ALIMENTOS

Recentemente os processos não-térmicos têm sido pesquisados visando seu uso como uma tecnologia potencial para substituir ou complementar o tradicional método de pasteurização de alimentos (Mercado *et al*, 1997).

O aumento da demanda dos consumidores por alimentos frescos sem a perda de sabores, nutrientes e vitaminas, resultou no desenvolvimento de diversos processos tecnológicos não-térmicos de preservação de alimentos, como pulso de campo elétrico (PEF), eletrohidráulico, irradiação, alta-pressão hidrostática, pulsos a luz, antimicrobióticos naturais e bactericidas (Wouters *et al*, 1997).

O tratamento eletrohidráulico foi introduzido em 1950 para inativar os microorganismos suspensos nos alimentos líquidos (Mercado *et al*, 1997). Os pesquisadores Gilliland e Speck (1967) usaram esse método e aplicaram a descarga elétrica de alta-voltagem de 8 a 15 kV através de uma abertura de eletrodos abaixo da superfície de suspensão aquosa de microorganismos. Os resultados obtidos sobre a inativação de microorganismos indicaram que o tratamento com descargas elétricas de 10 kV através de par de eletrodos oxida a ácido láctico dehidrogenase, tripsina e proteinases do *Bacillus subtilis* resultando na sua inativação (Martín *et al*, 1994).

O tratamento PEF inativa os microorganismos sem afetar o sabor e nutrientes, como ocorre quando é usada a tradicional pasteurização térmica (Jayaram *et al*, 1992). A tecnologia de produção de pulsos elétricos de alta-voltagem foi elaborada nas décadas de 60-70. Frungel (1976) fabricou, com relativa facilidade, uma fonte de pulsos com controle de frequência e de tensão de pico. A tensão de pico é, segundo Sato *et al* (1990), um dos pontos mais importantes a ser investigado para uso industrial da destruição de células através de pulsos de voltagem.

Pesquisas desenvolvidas em esterilização com pulsos elétricos mostram que a eficácia do método depende de fatores, tais como: as formas de eletrodo, natureza das células, adição de substâncias e temperatura. É comum encontrar-se na literatura o uso de três tipos de eletrodo para a descarga de pulsos. Sato *et al*. (1997) utilizaram em suas pesquisas os eletrodos tipos *placa-placa* e *placa-agulha*. As células de descarga foram construídas com tubo de “plexiglas” de 8 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento. Os eletrodos eram compostos de duas placas paralelas, no caso placa-placa, instalados dentro do tubo. No caso placa-agulha, no centro de uma das placas foi instalada uma agulha de 0,1 mm de diâmetro e 0,5 mm de comprimento. Mizuno e Hori (1988) relataram que o eletrodo fio-cilíndrico e eletrodos de barras paralelas foram mais eficientes na inativação dos microorganismos que configurações placa-placa.

Qin *et al* (1998) utilizaram o sistema de cilindros-coaxiais. A célula de descarga consistia de um tubo cilíndrico de 30 mm de comprimento e diâmetro interno de 19 mm.

Um dos eletrodos foi fixado na parede interna do tubo e o outro, um fio de 0.5 mm de diâmetro, instalado na posição axial do tubo.

3.4 PULSO DE CAMPO ELÉTRICO (PEF)

O campo elétrico é aplicado sobre alimentos líquidos na forma de pulsos curtos variando entre poucos microsegundos e milisegundos. O alimento pode ser processado a temperatura do ambiente ou refrigerado (Barbosa-Cánovas *et al*, 1997).

Um dos componentes mais importantes e complicados do sistema de PEF é a câmara de tratamento. Vários tipos são aplicados experimentalmente como cita, Barbosa-Cánovas *et al*, (1997):

A. Tipos de câmara estático:

1. Câmara Sale e Hamilton: constituído com um espaçador feito de polietileno em forma de U entre os eletrodos de carbono. A área do eletrodo e a quantidade do alimento tratado variam de acordo com os tipos de uso de espaçamento. O campo elétrico máximo que a câmara podia suportar era de 30 kV devido à quebra de rigidez dielétrica do ar na superfície do alimento.

2. Câmara Dunn e Pearlman: consiste de dois eletrodos de aço inoxidável e um espaçador cilíndrico de nylon. A câmara foi projetada para tratamentos de alimentos líquidos.

3. Câmara da Universidade Estadual de Washigton: consiste de um eletrodo de duas formas de disco de prato paralelo de aço inoxidável. Separado por um espaçador feito de polisulfona. É importante tomar as precauções deste processo para evitar a destruição elétrica dos alimentos.

4. Câmara Mizuno e Hori: quatro diferentes tipos de eletrodos foram desenvolvidos para determinar se a forma de eletrodo afeta na inativação microbial. Tais como placa-placa, placa-agulha, fio cilíndrico, haste-haste.

5. Câmara Zheng-Ying e Yan: sistema de eletrodo desenvolvido era do tipo haste-haste e 3 hastes.

B. Câmara de processo contínuo:

1. Câmara Dunn e Pearlman: composto de reserva de depósito para alimentos tratados, desaeração, câmara de tratamento, monitores de temperatura e voltagem, pulsador de alta-voltagem, e o trocador de calor para pré-aquecimento de alimentos e refrigeração após o tratamento do campo elétrico.

2. Câmara contínua da Universidade Estadual de Washington: o mesmo projeto da câmara estática, mas modificada incluída o canal de escoamento de mistura operando como sistema contínuo. Condições de operação da câmara projetado: volume 20 ou 80 mL; espaçamento entre eletrodo, 0,95 ou 0,51 cm; taxa de escoamento do alimento, 1200 ou 6 mL/min.

C. Câmara coaxial contínua:

1. Câmara contínua da Universidade Estadual de Washington: projetado pela base de câmara modificado em cilindro coaxial. Embora seu campo elétrico não seja uniforme, a câmara coaxial tem a sua vantagem de ter o escoamento uniforme e estrutura simples.

2. Câmara coaxial contínuo de Bushnell: consiste um eletrodo cilindro interno envolvido por um eletrodo cilindro anular externo com o alimento escoando entre os eletrodos.

3.5 GERADOR DE VOLTAGEM DE DIFERENTES FORMAS DE ONDAS

Segundo Barbosa-Cánovas *et al* (1997), os geradores de pulsos podem ser desenhados para produzir pulsos nas seguintes formas:

A. Pulsos exponenciais.

No pulso exponencial, a voltagem aumenta até um valor de pico selecionado e diminui exponencialmente. O alimento exposto aos pulsos exponenciais é, portanto, submetido à voltagem do pico de período curto. O circuito elétrico para gerar o pulso exponencial consiste de uma fonte de potência DC central e de um banco de capacitores e resistores R_c , R_1 e R_2 e interruptor, (Figura 1). A resistência R_1 limita a corrente em caso de descarga de arco no alimento, e R_2 controla o tempo de decaimento de pulso no caso da resistividade do alimento for maior que esperado. A densidade de energia, Q , para pulsos de exponencial pode ser aproximadamente dada por:

$$Q = \frac{V_0^2 C_0 n}{2v} = \frac{V_0^2 t}{2Rv} \quad (3.5.1)$$

Onde: V_0 é a voltagem de carga inicial; C_0 é a capacitância de capacitor; n é o número de pulsos; t é o tempo de tratamento, R é resistência efetiva, v é o volume da câmara de tratamento.

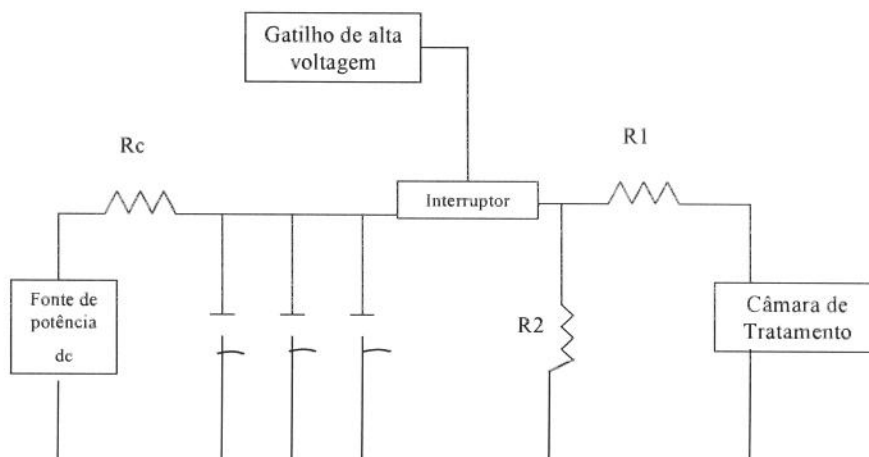


Figura 1 - Circuito geral de pulso exponencial (Barbosa-Cánovas *et al*, 1998).

B. Pulsos de Onda Quadrada.

A linha de transmissão de alta voltagem conectada a uma carga que corresponde com um campo de pulso de onda quadrada. Porém, há dois problemas quando usado a linha de transmissão de alta voltagem para pulsos de onda quadrada. Um é a dificuldade em casar a impedância do alimento com a impedância característica a linha de transmissão. A impedância da linha de transmissão deveria ser casada com a do alimento para transferir o máximo de energia para o alimento. O outro problema é que a linha de transmissão de alta voltagem não é satisfatória para pulsos longos por causa das despesas altas dos cabos elétricos longos. Estes problemas podem ser resolvidos pelo uso de rede de forma de pulsação (PFN). O circuito PFN é essencialmente uma linha de transmissão distribuída estimulada por número de seção de indutor-capacitor. (Figura 2) A densidade de energia, Q , para pulsos de ondas quadradas é dada pela equação:

$$Q = \frac{V^2 I \tau}{R v} = \frac{V^2 \tau n}{R v} = \frac{V^2 t}{R v} \quad (3.5.2)$$

Onde, V , I , τ são respectivamente voltagem, corrente e comprimento de pulso das ondas quadráticas.

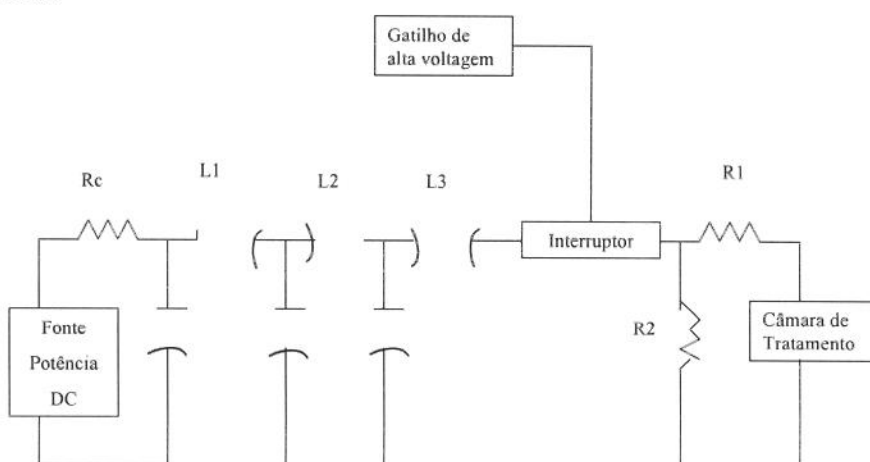


Figura 2: Circuito geral de pulso de ondas quadradas (Barbosa-Cánovas *et al*, 1998).

C. Pulsos Bipolares

O circuito elétrico para gerar pulsações bipolares é mostrado na Figura 3. A potência DC fornecida é usada para carregar o capacitor C_1 . O sinal aplicado ao interruptor em séries SW 1 permite uma descarga de energia através do capacitor C_2 e o alimento na câmara de tratamento. Quando a saída da potência DC fornecida é positiva em relação ao solo, o alimento é sujeitado para o pulso positivo. Quando a voltagem do alimento aproxima a zero, o interruptor de desvio SW2 é ligado pelo controlador e a energia armazenada em C_2 é descarregada através do alimento na forma de pulso negativo. Uma série de pulsos bipolares é produzida nesta seqüência repetidamente. Cada vez que o capacitor C_1 é descarregado, o par de pulsos bipolar é distribuído ao alimento.

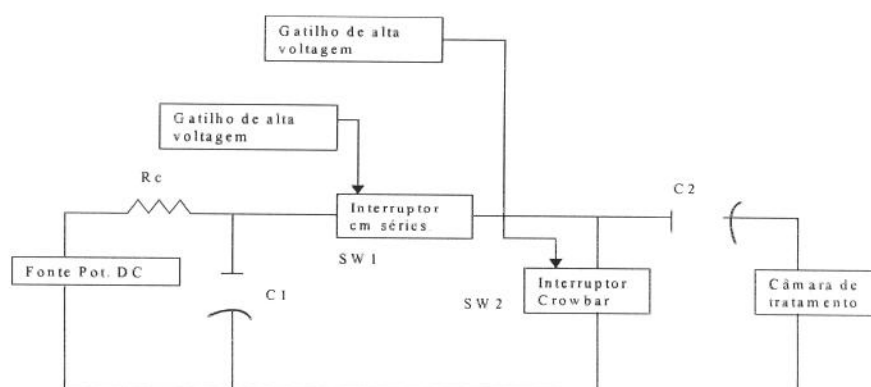


Figura 3: Circuito geral de pulso bipolar (Barbosa-Cánovas *et al*, 1998).

D. Pulsos oscilatórios

O pulso elétrico oscilante é gerado por meio de um circuito como mostra a Figura 4. Um indutor é conectada em paralelo à câmara de tratamento. O banco de capacitor é descarregado com a potência DC fornecido. Quando o interruptor é fechado, a voltagem oscilatória é gerada através de indutor e o alimento na câmara de tratamento. A condição oscilatória e a freqüência de ressonância são determinadas pela capacitância,

indutância, e resistência de circuito. A voltagem oscilatória persiste por vários ciclos e o circuito é operado na condição ligeiramente umedecida.

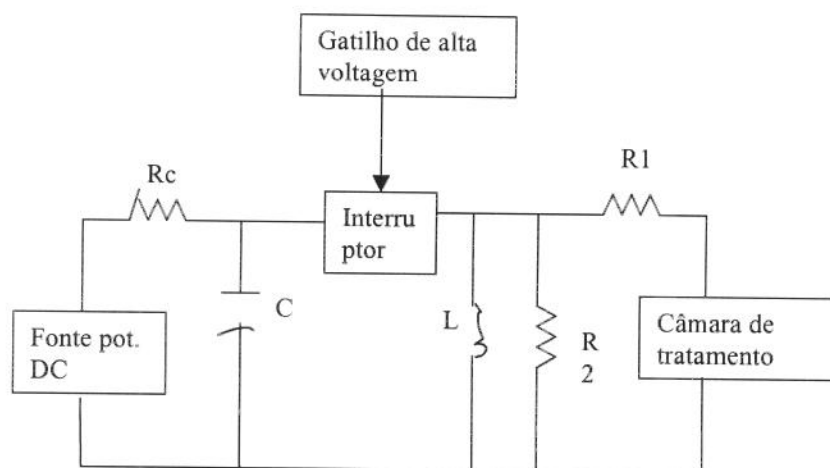


Figura 4 – Circuito geral de pulso oscilatório (Barbosa-Cánovas *et al*, 1998).

3.6 EFEITO DO CAMPO ELÉTRICO DE ALTA VOLTAGEM SOBRE OS MICROORGANISMOS.

Durante o processo de PEF, a inativação de microorganismos é causada pela mudança estrutural irreversível na membrana, conduzindo à formação e depois a destruição da barreira semipermeável. Há evidência convincente que o aumento de temperatura efetuado pelo PEF não é o fator único na inativação microbiana. (Wouters *et al*, 1997).

Zhang *et al* (1994b) verificaram que a concentração inicial de *Saccharomyces cerevisiae* a 1×10^7 cfu/ml inoculada na amostra líquida ocorreu o agrupamento entre as células formando a camada protetora. A probabilidade de taxa de sobrevivência dessas células após o tratamento de PEF (12,15 e 25 kV/cm, 3 e 5 pulsos) foi maior que as células não protegidas. Com o mesmo teste, a concentração inicial de 1×10^5 cfu/ml do mesmo organismo inoculado na amostra líquida, exibiu a taxa maior de inativação. No entanto, isso só ocorreu naquele microorganismo, porque variando a quantidade de concentração inicial de *Escherichia coli* (10^3 a 10^8 cfu/ml)

aplicado a 2,5 kV/ μ m e “pulse width” de 25 μ s de tratamento, deduziram que o inóculo independe da inativação de organismo pelo PEF, isto é, diminuindo a concentração inicial do microorganismo não aumenta a taxa de inativação. (Zhang *et al*, 1995).

Sale e Hamilton (1967), Sakurauchi e Kondo (1980), e Mizuno e Hori (1988), tentaram inativar os microorganismos suspensos em água usando um campo elétrico pulsante. Ambos os grupos de pesquisadores descobriram que a esterilização por um eletrodo nu varia com o tipo de bactérias, com a energia dos pulsos e com a intensidade do campo elétrico atuante sobre os microorganismos. Sakurauchi e Kondo (1980), observaram efeitos semelhantes usando eletrodos, cujas superfícies eram cobertas com filme de polímero condutor elétrico. Gilliland e Speck (1967) concluíram que uma onda de choque produzida através de descarga com faísca em água era eficaz para esterilização.

No estudo de Liu *et al* (1997) foi demonstrado que o campo elétrico pulsado poderia ser um método efetivo para inativar microorganismos dos alimentos, especialmente quando combinada com agentes antimicrobianos tais como ácidos orgânicos.

Segundo Wouters *et al* (1997), o efeito bactericida do PEF é relacionado à energia do campo elétrico, o tempo de tratamento e números de pulsos. Além disso, a inativação por PEF é a função do tipo e estágio de crescimento de microorganismos, o tamanho inicial do inóculo, condição de pré-cultura, concentração iônica e condutividade do fluido.

A forte polarização das células viáveis produzidas por um campo elétrico externo leva a um incremento da condutividade e da permeabilidade da membrana. O grau de permeabilidade depende da intensidade e duração do campo aplicado. (Martín *et al*, 1994).

Mizuno e Hori (1988) observaram que usando pulsos elétricos de picos curtos, provocaram formação de campos elétricos de alta intensidade no interior do líquido e que podia ser reduzida a ocorrência de eletrólise. Observaram também que a parede da célula se romperia quando uma pequena voltagem (0.4 ~2 V) era aplicada na parede.

Jayaram *et al* (1992) relataram que a inativação de *Lactobacillus brevis* pelo PEF é função de temperatura do meio no qual as células estão suspensas. Zhang *et al*. (1995) também encontraram que o aumentando a temperatura de 7 a 20°C, aumenta significativamente a inativação de *Escherichia coli* em "simulated milk ultra-filtrate" (SMUF), mas aumentando a temperatura de 20° a 33°C, não resultou aumento de inativação quando tratado pelo PEF. Segundo os resultados obtidos, a influência de temperatura sobre a membrana "breakdown" da célula microbiana durante o tratamento, pode depender do tipo de organismo testado e o meio de suspensão.

Dutreux *et al* (2000), quando aplicaram o PEF sobre o organismo (60 pulsos a 41 kV/cm) suspensos em diferentes meios (tampão fosfato e leite- os valores de condutividades e pH dos meios foram ajustados igualmente), relataram que a composição do meio não influencia o PEF na inativação de organismos, como deduziram também os pesquisadores Reina *et al* (1998), que não encontraram nenhuma diferença entre a inativação de *L. monocytogenes* em leite integral, leite com 2% de gordura e leite desnatado. (tempos de tratamento foram de 100, 300 e 600 μ s, campo elétrico variando de 35 kV/cm, 25 kV/cm e 30 kV/cm).

Pothakamury *et al* (1995) e Zhang *et al* (1995) estudaram o efeito de fase de crescimento sobre a inativação da bactéria (*E. coli*) inoculada em "simulated milk ultra-filtrate" (SMUF) submetidas a pulso elétrico de alta voltagem. As células nas fases de crescimento de microorganismos lag, log e estacionárias eram aplicadas de 2 a 4 pulsos com a energia de campo elétrico de 3,6 V/ μ m a 7°C. (Pothakamury *et al*, 1995). As células na fase logarítmica de crescimento foram mais sensíveis que as células na

fase de crescimento estacionário, quando tratadas por campo elétrico intenso. (Jacob *et al*, (1981). Hülshager *et al* (1983) também observaram que a partir da fase log de crescimento, as células microbianas eram notadamente mais destruídas que as células da fase estacionárias.

Sale e Hamilton (1967) observaram que os campos elétricos de alta-voltagem inativavam certos microorganismos, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium welchii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*. Eles aplicaram os campos elétricos a 25 kV/cm criados com pulsos de 2 a 20 μ s sobre os microorganismos suspensos e descreveram a destruição das células bacterianas como uma ruptura de protoplastos seguida de saída de líquido intracelular. (Martín *et al*, 1994).

Qiu *et al* (1998) estudaram o processo de PEF em planta piloto para pasteurização não-térmica e em sistema contínuo de suco de laranja fresco e obtiveram a efetiva eliminação de 99,9% de microflora, independentemente do pulso de ondas aplicado. Foram estudadas as seguintes condições: vazão de 75 a 125 L/h, campo elétrico a 35 kV/cm e frequência de 800 Hz. A partir dessas condições, os resultados fornecidos foram detectadas perdas de aroma pelo PEF, 5 a 9%, opondo os 25% na pasteurização convencional. A perda de vitamina C, no PEF resultou 4 a 5% contra 7 a 15% na pasteurização. Assim concluíram que processo de PEF aplicado manteve mais sabor e vitamina C, quando comparado com o tratamento de pasteurização térmica.

Evrendilek *et al*, (2000) estudaram as amostras de suco de maçã ("apple cider"), que foram processadas por PEF (22, 28, 31, 34 kV/cm) e tratamento térmico (60°C e 30 s). Obtiveram vida de prateleira mais longa do que aquelas processadas somente pelo PEF estocados em três diferentes temperaturas (4°C, 22°C e 37°C). Quanto a relação ao número de microorganismo, o suco de maçã fresco processado pelo PEF e tratamento térmico estocados a 4°C, resultou menos de 4 log ufc/ml, e o de

“apple cider” permaneceu estável durante mais de 68 dias. A contagem microbiana da amostra de “apple cider” tratada pelo PEF e tratamento térmico estocado a 22°C alcançou a contagem inicial da amostra de controle (4 log ufc/ml) depois de 68 dias. Esta alta contagem microbiana da “apple cider” do controle resultou em vida de prateleira mais curta na cida de maçã fresca processada por PEF do que no suco de maçã reconstituído processado por PEF em todas as três temperaturas de armazenamento.

Jin & Zhang (1999) comparando a inativação de microrganismo por tratamento de PEF (20 e 40 kV/cm por 50 e 150 μ s) e tratamento térmico (90°C por 90 segundos) em suco de “cranberry” contendo bactérias e fungos, observaram que os microrganismos foram reduzidos significativamente. Segundo os autores, não houve diferença analisada na redução de contagem de células entre o tratamento térmico e o tratamento de PEF por campo elétrico de 40 kV/cm por 150 μ s (Tabela 2).

Tabela 2: Inativação de microrganismos por tratamento de PEF e de térmico.

Tratamentos	Contagem Total de Placa (log ufc/ml)	Bolores e leveduras (log ufc/ml)
Controle	4.80 (0.10) ^a	4.87 (0.11) ^a
20 kV/cm-50 μ s	3.18 (0.07) ^b	3.33 (0.05) ^b
20 kV/cm-150 μ s	3.06 (0.08) ^c	2.87 (0.09) ^c
40 kV/cm-50 μ s	2.69 (0.10) ^d	2.65 (0.06) ^d
40 kV/cm-50 μ s	< 1 ³	< 1
Térmico ⁴	<1	< 1

*Os números entre parêntesis são valores de desvio padrão analisado pelo SAS.

³ 1 log ufc/ml é o número mínimo detectado.

⁴ Pasteurização pelo tratamento térmico.

FONTE: Jin & Zhang (1999)

Jia *et al* (1998) aplicaram o PEF a 30 kV/cm de 240 e 480 μ s em suco de laranja espremida e depois analisaram os compostos aromáticos do suco por SPME-GC (“solid phase microextraction”- cromatografia gasosa). Eles confirmaram a presença de compostos aromáticos (etanol, etil butirato, α -pineno, micereno, limoneno, linalool, decanol e valenceno) no suco através de tempo de retenção dos respectivos compostos padrões.

Ho *et al* (1996) estudaram o efeito de pulso elétrico de alta voltagem sobre algumas atividades enzimáticas (preparados de enzimas puras, tais como lipase, glicose oxidase e “heat-stable α -amylase”) e observaram que ocorreu de 70 a 85% de inativação. O grau de desnaturação variou de enzima para enzima.

A aplicação de pulso de campo elétrico pode afetar a estrutura tridimensional da proteína globular causando a quebra de nucleotídeos, como AMP (monofosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina), NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) (Jong & Heesch, 1998).

Em estudo realizado por Martin *et al* (1994), observaram que as bactérias Gram positivas e as leveduras eram menos sensíveis aos pulsos elétricos que as Gram negativas. Segundo Hülshager *et al.* (1983), as diferenças dos valores de campo elétrico resultantes são devidas às variâncias morfológicas e propriedades bioquímicas dos respectivos tipos de células, principalmente as membranas das células.

Em um estudo de efeitos químicos, Sale e Hamilton (1967) realizaram uma experiência usando agar para fixar a suspensão de células. Eles concluíram que os efeitos letais não só acontecem na região perto da superfície de eletrodo, onde as reações eletrolíticas ocorrem, mas também nas regiões longe da superfície de eletrodo. Gilliland e Speck (1967) obtiveram esterilização bastante eficaz usando uma descarga de faísca (onda de choque) em água. Observaram que a eficácia de esterilização era modificada pelo tipo de metal usado para o eletrodo: um eletrodo de cobre era melhor que o de ferro ou de alumínio. Isto foi explicado como sendo o efeito de íon de metal após a eluição do mesmo na solução. Hayamizu *et al* (1989) descobriram que a luz ultravioleta emitida por descarga de faísca em água era a causa da morte dos microorganismos. Para explicar este fato, estes autores investigaram a formação de espécies químicas ativas por uma descarga pulsada em água pura, sem os microorganismos. Os resultados deste estudo foram, então, usados para explicar os efeitos letais das espécies químicas produzidas por descarga.

O desenvolvimento da tecnologia para a aplicação de pulsos elétricos na conservação de alimentos é considerado um desafio para os engenheiros elétricos e de alimentos. Seus parâmetros críticos são a intensidade de campo elétrico, o tempo de tratamento e o grau de inativação examinado aos principais microorganismos. (Martin *et al*, 1994).

3.7 MECANISMOS DE RUPTURA DA MEMBRANA CELULAR.

A aplicação de campos elétricos de alta voltagem produz a lise da membrana celular. Os mecanismos que dão lugar a ruptura também tem sido amplamente estudados (Martin *et al*, 1994):

Ruptura dielétrica – A forte polarização de células viáveis produzida por um campo elétrico externo aumenta da condutividade e da permeabilidade da membrana, cujo grau de permeabilidade depende da intensidade e duração do campo aplicado. A ruptura dielétrica produz instabilidade local na membrana devida a compressão eletromecânica e a tensão de campo elétrico induzida, dando lugar à formação de poros (Figura 5).

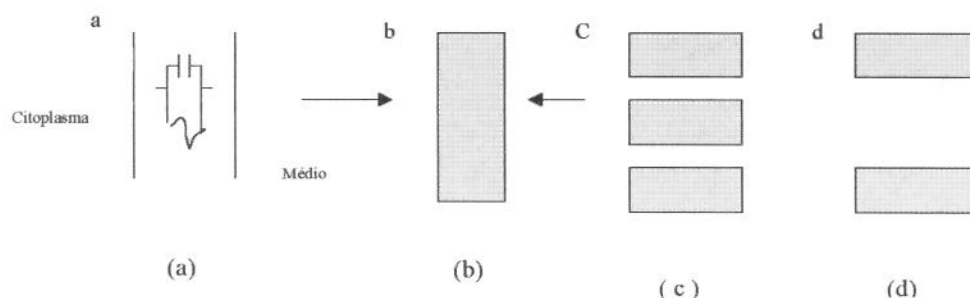


Figura 5: Diagrama da ruptura elétrica reversível e irreversível. (MARTÍN *et al*, 1994): a . Membrana celular com potencial V_m de aproximadamente 10 mV onde não se produz dano na parede (interior da célula: circuito eletrônico equivalente); b. compressão de membrana produzida por um aumento de potência $V \gg V_m$ e carga; c. formação de poros (ruptura reversível) pelo aumento potencial da membrana até V_c (potencia crítica da membrana); d. formação de poros grandes (ruptura irreversível) pela aplicação de um campo elétrico muito alto.

A bicamada da membrana celular é um material dielétrico com uma constante dielétrica pequena ($E_r=2$) comparada com a da água ($E_r=80$). A aplicação de campos elétricos produz um incremento potencial através da membrana. Como resultado, acumulam cargas opostas em ambos os lados da membrana que se atraem entre si. Esta atração dá o lugar a uma compressão que reduz a espessura da membrana. As forças elásticas ou viscoelásticas restauradoras se opõem a eletrocompressão. Após a ação das forças compressivas que atuam rapidamente, com diminuição da espessura da membrana, as forças elásticas regeneradoras produzem uma ruptura local da membrana. (Martin *et al*, 1994)

Eletroporação – A eletroporação é o fenômeno segundo o qual, uma célula exposta a um campo elétrico de alta voltagem sofre uma desestabilização temporal da bicamada lipo-proteínas de sua membrana. A consequência é a formação de poros na membrana, ficando esta parcial ou totalmente danificada (Figura 6).

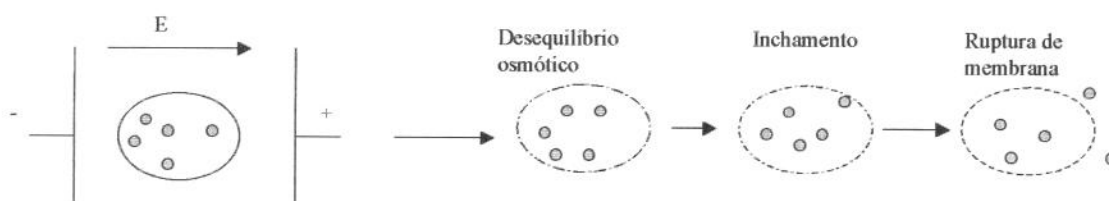


Figura 6: Eletroporação da membrana celular. (Martin *et al*, 1994)

Na membrana celular há canais protéicos, poros e borbulhas. A abertura e o fechamento de muitos canais protéicos depende da potência elétrica através da membrana. As bicamadas de lipídeos são sensíveis a aplicação de pulsos elétricos devido as cargas elétricas das moléculas lipídicas e a permeabilidade da bicamada iônica. As cargas elétricas podem induzir a reorientação das moléculas lipídicas sob um campo elétrico intenso, formando poros hidrofílicos e danificando a bicamada que serve de barreira aos íons. Os íons conduzem a corrente gerando assim um calor local por efeito Joule e induzindo um gradiente térmico na bicamada lipídica (Martin *et al*, 1994).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima

Utilizou-se suco de laranja pasteurizado, marca GIRAFFAS, doado pela empresa FRUTHIL S/A, São Carlos, SP. O suco foi armazenado a temperatura de -5°C antes do seu uso.

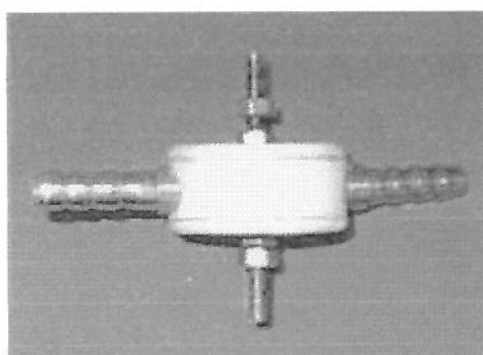
Os dois microrganismos utilizados foram o, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (169 vinho) e o *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917), fornecidos pela Fundação “André Tosello” e ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos).

4.1.2 Equipamento

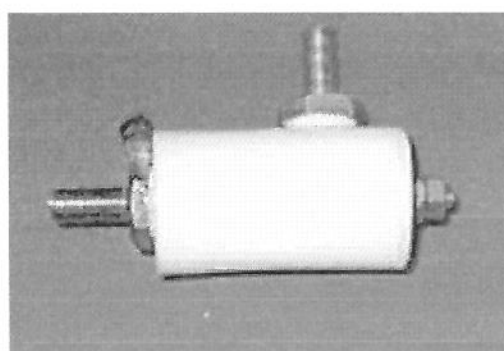
O sistema de aparelho PEF usado consiste em: transformador de voltagem, câmara de tratamento e bomba peristáltica. Foram utilizadas câmaras de tratamento com duas configurações de eletrodos:

- **Placa-placa:** consiste em duas placas de aço inox revestido pelo isolador teflon (Figura 7A). As medidas geométricas deste eletrodo estão descritas na Figura 8.

- **Coaxial:** Tubo cilíndrico de teflon com aço (Figura 7B). Este cilindro apresenta uma haste de aço inox fixo no meio do tubo, que tem a função de promover descargas elétricas, como mostra a Figura 9.



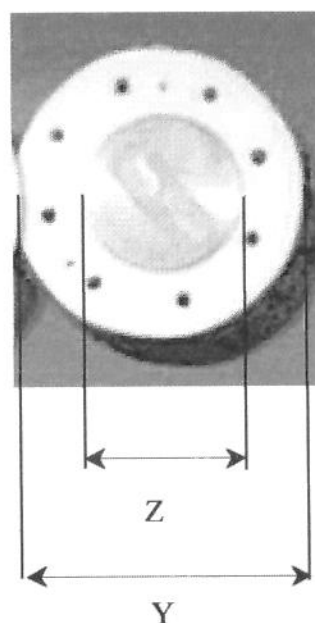
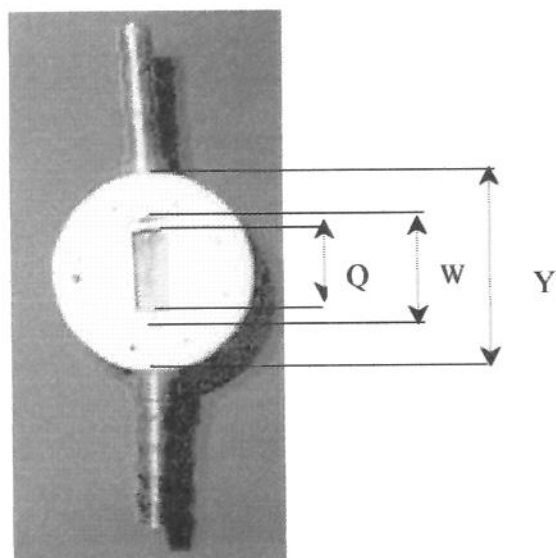
(A)



(B)

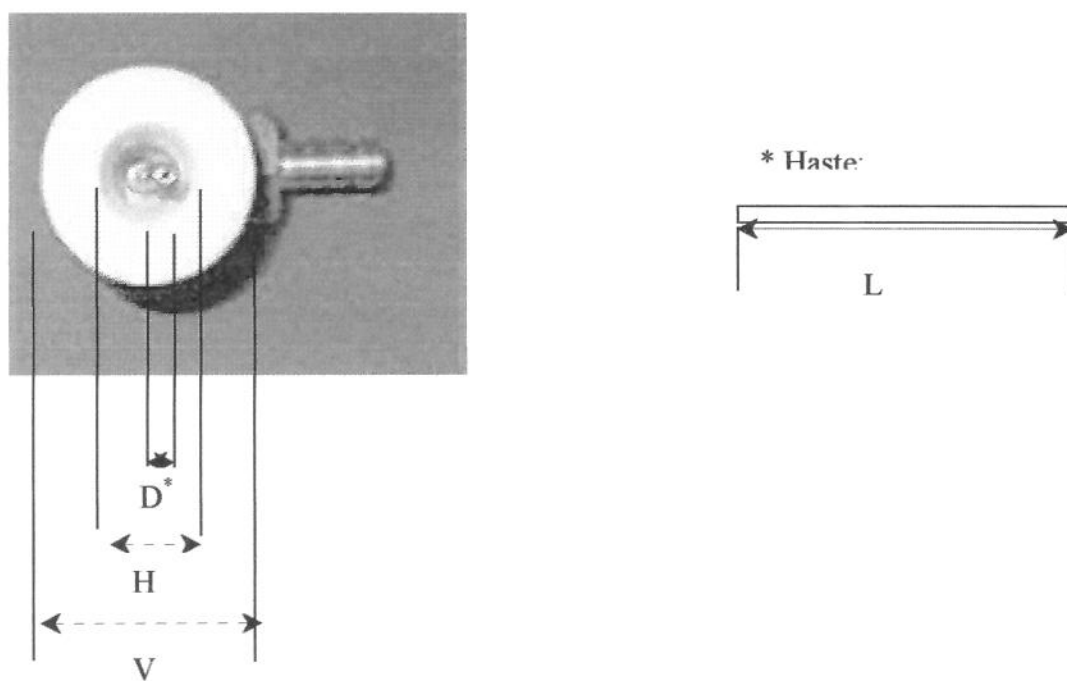
(A) Eletrodo Placa-Placa; (B) Eletrodo Cilíndrico Coaxial.

Figura 7: Diagrama esquemático dos tipos de câmaras de tratamento



(A) Placa-placa: $Q = 16,7 \text{ mm}$; $W = 22 \text{ mm}$; $Y = 39 \text{ mm}$; $Z = 21,2 \text{ mm}$.

Figura 8: Descrição física de câmara de tratamento placa-placa.



(B) Coaxial: $D^* = 3,2$ mm; $H = 12$ mm; $V = 27,6$ cm; haste interna: $L = 36,6$ mm.

Figura 9: Descrição física de câmara de tratamento coaxial.

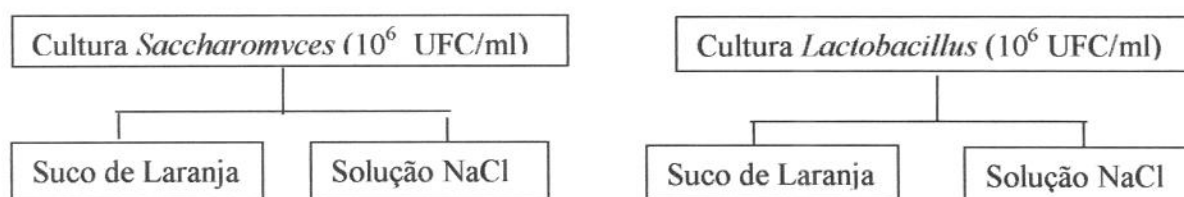
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultura teste

- *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*: utilizou-se caldo extrato de malte, formulado em laboratório, conforme é mostrado na da Tabela 18 (ANEXO), esterilizado a 121°C por 15 minutos. A incubação foi realizada a 26°C \pm 1°, por 24 horas com agitação.
- *Lactobacillus plantarum*: utilizou-se caldo MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, OXOID Ltd), esterilizado a 121°C por 15 minutos. A incubação do microrganismo foi realizada a 35°C durante 24 horas sem agitação.

4.2.2 Inoculação

Amostras de 100 ml de suco de laranja e solução salina 0,2% (p/v) foram inoculadas com 1 ml de inóculos contendo aproximadamente 10⁶ UFC/mL preparadaos no dia anterior, como mostra o Fluxograma 1 a seguir:



Fluxograma 1 – Esquema do método de inoculação dos microrganismos utilizados.

4.2.3 Propriedades físicas das amostras

4.2.3.1 Condutividade elétrica

Foi medida em condutímetro Hanna Instruments HI 8733 (Portugal).

4.2.3.2 Viscosidade

A viscosidade foi medida em viscosímetro Brookfield Roto Digital (Brookfield Engineering Labs. Inc., Stoughton, USA, modelo LVDV-II+, Série RT52021) com o “spindle” nº S4-18.

4.2.3.3 pH

O pH foi determinado em pHmetro WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Model pH 320, Série nº 52190137, Germany).

4.2.4 Teste I - Esterilização em sistema contínuo

4.2.4.1 Controle do aparelho de PEF I

Para ter a certeza de que os processamentos foram feitos sem que houvesse outro tipo de contaminação antes e depois de aplicar o pulso elétrico de alta voltagem, foi testado o efeito de controle negativo de tratamento de PEF em três etapas: (1) as amostras foram aplicadas sem microorganismos e sem aplicar o pulso elétrico; (2) foram testadas as amostras sem microorganismos e com aplicação de pulso, e (3) foram inoculados os microorganismos com aplicação de pulso.

4.2.4.2 Processo de PEF I.

Após o teste de controle citado no item 4.2.4.1 e observado a total isenção de contaminação, foi feito o seguinte experimento: logo após a inoculação dos microorganismos teste nas amostras de suco de laranja e solução salina, um erlenmeyer contendo uma das soluções foi conectado, através de um tubo de silicone, a uma bomba peristáltica (marca Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Mod. nº 7520-25, USA) e esta à câmara de tratamento, como mostra a Figura 10.

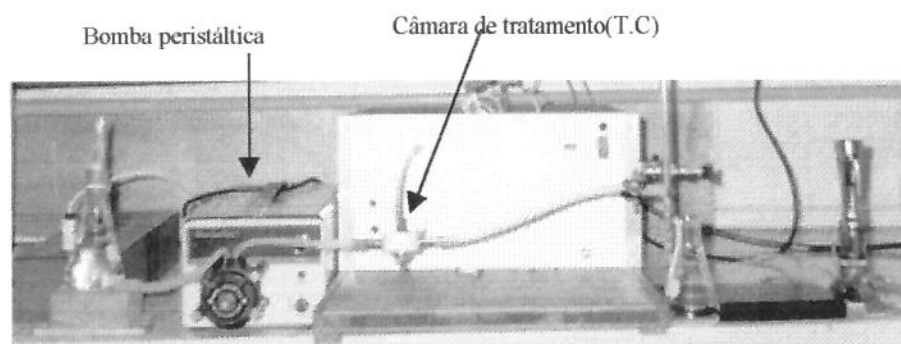


Figura 10: Esquema do procedimento experimental de esterilização em alta-voltagem em sistema contínuo.

Após a passagem pelo sistema de tratamento de PEF, uma amostra do produto foi coletada e feita a contagem de microorganismos sobreviventes pelo método de contagem em placa com semeadura em superfície, utilizando agar batata dextrose para *S. cerevisiae var ellipsoideus* e semeadura em profundidade em MRS para *L. plantarum* (Vanderzant E Splittstoesser, 1992)

4.2.4.3 Construção de sistema de geração de pulso elétrico de alta voltagem

Os ensaios foram realizados as seguintes condições:

Voltagem de pico dos pulsos: 7,5 kV;
Temperatura inicial dos líquidos: $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Vazão dos líquidos: 1 ml/s e 2 ml/s;
Capacitância: 2 k μ F;
Frequência: 1,1; 4,4 Hz;
Campo elétrico: 11,9 kV/cm.

A Figura 11 representa o esquema do gerador de pulso de alta-voltagem utilizado.

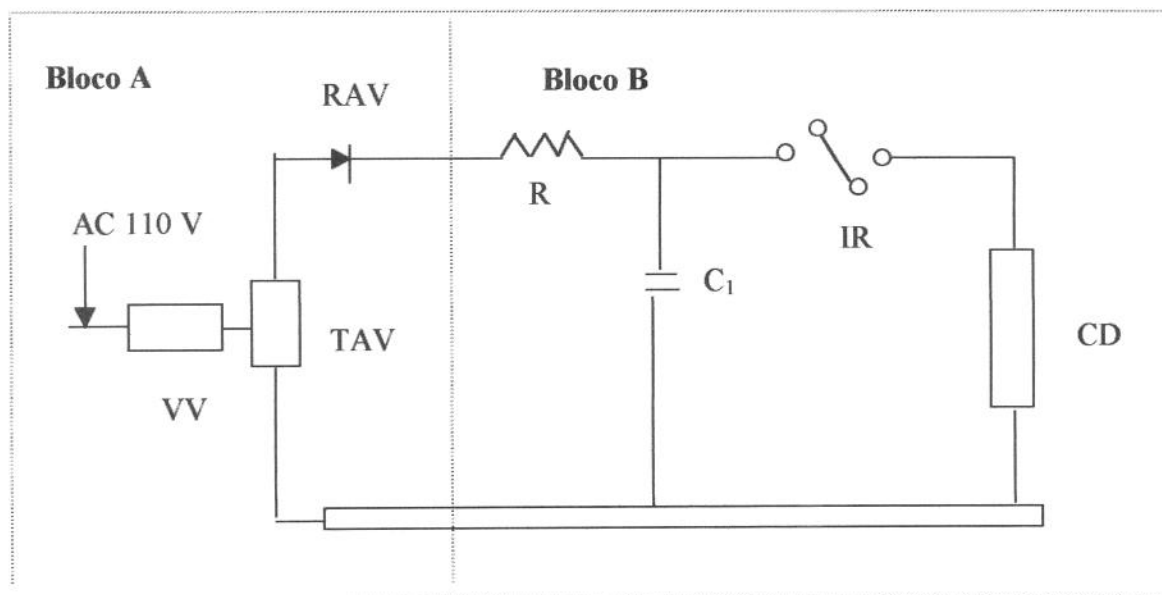


Figura 11: Diagrama de bloco do circuito elétrico (sist. contínuo). **Bloco A** fonte de alta voltagem: **VV** variador de voltagem, **TAV** transformador de alta voltagem, **RAV** retificador de alta voltagem; **Bloco B** gerador de pulsos e câmara de descarga: **R** e **C₁** respectivamente resistência e capacitor elétricos, **IR** interruptor rotativo e **CD** câmara de descarga.

O **Bloco A** é o esquema de fonte de alta voltagem: **VV** variador de voltagem do tipo "Variac" com 110 V de entrada e saída de 0 a 110 V, **TAV** transformador de alta voltagem (entrada 110V, saída máxima 10 kV), **RAV** retificador de alta voltagem; o **Bloco B**: de gerador de pulsos e câmara de descarga no qual **R** e **C** são, respectivamente, resistência (150 k Ω) e capacitor (2kpF) elétricos para o controle da largura e da energia dos pulsos elétricos, **IR** é um interruptor rotativo para o controle da frequência dos pulsos e **CD** a câmara de descarga elétrica sobre amostras líquidas.

Os valores da frequência dos pulsos foram obtidos pelo número de rotação (rpm) utilizando um tacômetro (Ametek, Mansfield & Green division, Model 1726, Florida, USA).

4.2.4.4 Planejamento Experimental I

Foi realizado o planejamento fatorial 2^3 , visando analisar como a eficiência do aparelho de PEF foi afetada mediante a variação da relação frequência, vazão e tipos de câmara de tratamento (T.C). Os efeitos principais e de interação foram analisados através do pacote estatístico STATISTICA 5.0. Para tal análise foi construída a seguinte planilha de planejamento (Tabela 3 e Tabela 4):

Tabela 3: Definição dos níveis dos fatores (Teste I)

	-1	1
Vazão (ml/s)	1	2
Frequência (Hz)	1,1	4,4
T.C.	P-P	CoA

Tabela 4: Matriz codificada pelo planejamento 2^3 (Teste I)

Ensaio	Replicat	Vazão ml/s	Freq. Hz	T.C.
1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1
3	1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	-1	-1	1
8	1	-1	-1	-1
9	2	1	1	1
10	2	1	1	-1
11	2	1	-1	1
12	2	1	-1	-1
13	2	-1	1	1
14	2	-1	1	-1
15	2	-1	-1	1
16	2	-1	-1	-1

A variável resposta foi a eficiência de inibição de microorganismos do alimento líquido, pelo número de reduções decimais (NRD).

Variável de resposta:

Nº de Reduções Decimais (NRD)

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f$$

Onde: N_f = Número de unidades formadoras de colônias após a passagem de PEF.

N_0 = Número de unidades formadoras de colônias antes da passagem de PEF.

4.2.5 Teste II - Esterilização em sistema circular I

Objetivo para esse teste II foi verificar a eficiência do sistema de circulação com diferentes parâmetros e os circuitos (Figuras 11 e 12) de processo.

4.2.5.1 Controle de aparelho de PEF II

Foi testado o efeito de controle negativo de tratamento de PEF em três etapas para o sistema circular: (1) as amostras foram aplicadas sem microorganismos e sem aplicar o pulso elétrico; (2) foram testadas as amostras sem microorganismos e com aplicação de pulso, e (3) foram inoculados os microorganismos com aplicação de pulso.

4.2.5.2 Processo de PEF II

Logo após a inoculação, um erlenmeyer, contendo uma das soluções foi conectado, através de um tubo de silicone, a uma bomba peristáltica (marca Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Mod. nº 7520-25, USA), e esta a câmara de tratamento que retornava ao início do processo, como mostra a Figura 12.

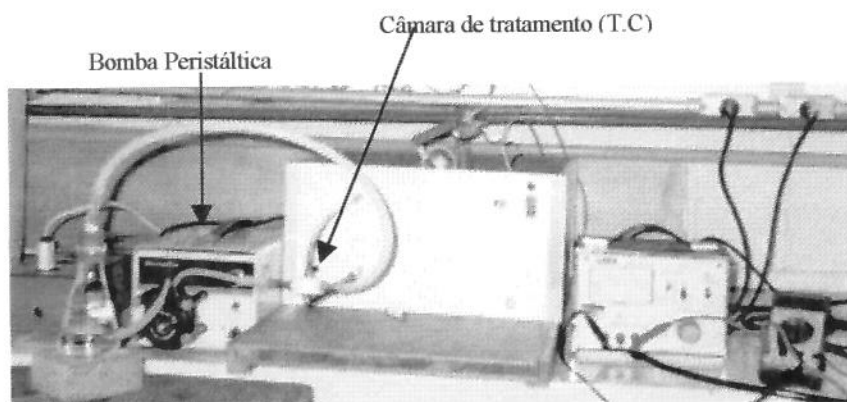


Figura 12: Esquema do processo experimental de esterilização em alta-voltagem em sistema circular.

Após a passagem pelo sistema de tratamento de PEF, uma amostra do produto foi coletada e feita a contagem de microorganismos sobreviventes pelo método de contagem em placa com semeadura em superfície, utilizando agar batata dextrose para *S. cerevisiae var ellipsoideus* e semeadura em profundidade em MRS para *L. plantarum* (Vanderzant e Splittstoesser, 1992).

Os ensaios foram realizados com os seguintes parâmetros:

- Voltagem de pico dos pulsos: 7.5 kV;
- Resistência: 100 Ω , potência: 25 W.
- Capacitância: 2 kF e 2,2nF.
- Frequência do pulso: 3,6 ; 5,8 Hz.
- Forma dos eletrodos: uma das 2 formas da Figura 7, por vez
- Vazão do líquido: 1 mL/ s; 2 mL/s;
- Temperatura inicial das amostras: 26 °C \pm 1°C;
- Campo elétrico: 11,9 kV/cm.

O tipo de gerador de pulso de alta-voltagem foi utilizado como mostrado na Figura 13 abaixo.

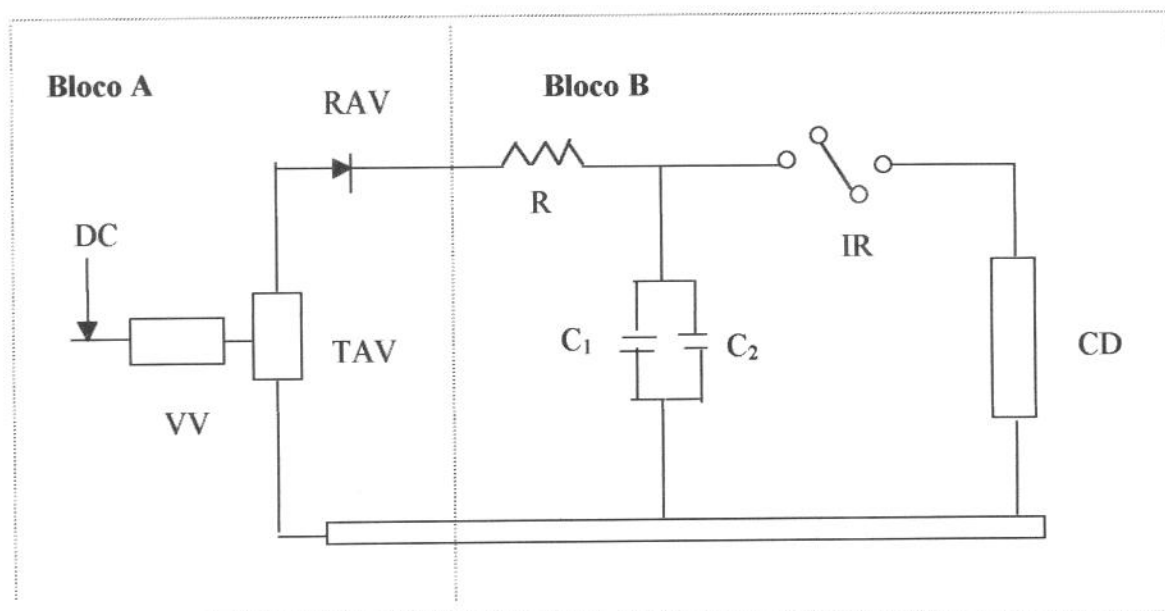


Figura 13: Diagrama de bloco do circuito elétrico (sist. circular). **Bloco A** fonte de alta voltagem, **TAV** transformador de alta voltagem, **RAV** retificador de alta voltagem; **Bloco B** gerador de pulsos e câmara de descarga: **R**, **C₁** e **C₂** respectivamente resistência ($100\ \Omega$) e capacitores elétricos (2 kpF e 2,2 nF), **IR** interruptor rotativo e **CD** câmara de descarga.

4.2.5.3 Planejamento experimental II

Foi realizado o planejamento fatorial 2^4 , duas replicatas, visando analisar como a eficiência do aparelho de PEF foi afetada mediante a variação da relação frequência, vazão, números de ciclos e tipos de câmara de tratamento (T.C). (Tabela 5) Os efeitos principais e de interação foram analisados.

Tabela 5: Definição dos níveis dos fatores (Teste II):

	-1	1
Vazão (ml/s)	1	2
Frequência (Hz)	1,1	4,4
T.C.	P-P	CoA
Tempo de circulação (min)*	7	13

* O número de ciclos é relacionado ao tempo de circulação (min.) e a vazão (ml/s). A Tabela 6 mostra os números de ciclos equivalentes de tempo de circulação com respectivas vazões das amostras:

Tabela 6: Valores de nº de ciclos calculados.

Tempo de circulação	7 minutos		13 minutos	
Vazão	1 ml/s	2 ml/s	1 ml/s	2ml/s
Nº de ciclos	4,2	8,4	7,8	15,6

A Tabela 7 apresenta as combinações de vazão, frequência, tipos de câmara de tratamento e tempo de circulação para a realização do planejamento fatorial completo com os valores codificados.

Tabela 7: Matriz codificada pelo planejamento 2^3 (Teste II)

Ensaio	Vazão	Freq.	Tempo de		
Replicat	ml/s	Hz	T.C.	Circulação (min)	
1	1	1	1	1	
2	1	1	1	-1	
3	1	1	-1	1	
4	1	1	-1	-1	
5	1	-1	1	1	
6	1	-1	1	-1	
7	1	-1	-1	1	
8	1	-1	-1	-1	
9	-1	1	1	1	
10	-1	1	1	-1	
11	-1	1	-1	1	
12	-1	1	-1	-1	
13	-1	-1	1	1	
14	-1	-1	1	-1	
15	-1	-1	-1	1	
16	-1	-1	-1	-1	

4.2.6 Teste III - Esterilização em sistema circular II

4.2.6.1 Controle de aparelho de PEF III

Foi realizada da mesma forma descrita no item 4.2.5.1.

4.2.6.2 Planejamento experimental III

Foi realizado o planejamento fatorial 2^2 mais três pontos centrais, visando analisar como a eficiência do aparelho de PEF foi afetada mediante a variação da relação frequência e números de ciclos (Tabela 8). Os efeitos principais e de interação foram analisados.

A Tabela 9 apresenta as combinações de frequência e números de ciclos para a realização do planejamento fatorial completo com os valores codificados.

Tabela 8: Definição dos níveis dos fatores (Teste III):

	-1	0	1
Frequência (Hz)	3,6	4,69	5,8
Nº de ciclos	4,2	7,8	11,4

Tabela 9: Matriz codificada pelo planejamento 2^2 (Teste III)

	Replicatas	Freq. (Hz)	Nº de ciclos
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	1	0	0
6	1	0	0
7	1	0	0
8	2	1	1
9	2	1	-1
10	2	-1	1
11	2	-1	-1
12	2	0	0
13	2	0	0
14	2	0	0

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Foram realizadas contagens em placas de *S. cerevisiae* var *ellipsoideus* e *Lactobacillus plantarum* após o processo de PEF, das amostras de suco de laranja e solução salina esterilizadas pelos dois sistemas (circular e contínuo).

Para contagem da levedura foi utilizada diluição seriada até 10^{-3} a partir de 1 ml da amostra líquida semeada em Agar Batata Dextrose (PDA, Merk KgpA, Germany) incubada a 23°C por 3 a 5 dias, e para a cultura láctica, MRS Agar (Merk KgpA, Germany) incubada a 35°C de 1 a 4 dias.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

- **Determinação de açúcar redutor – DNS (ANEXO);**

O teor de açúcar redutor foi quantificado pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

- **Determinação de cor (ANEXO).**

A cor das amostras foi medida pelo colorímetro Hunterlab, baseando-se na medição de três parâmetros de cor, L, a e b.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA E SOLUÇÃO SALINA

Na Tabela 10 estão os resultados da caracterização físico-química das amostras

Tabela 10 - Caracterização físico-química do suco de laranja e da solução salina

	Suco de laranja	NaCl (0,2/100cm ³)
Condutividade Elétrica (mS/cm)	3,76	3,76
pH	3,74	6,08
°Brix	12	-
Viscosidade (mPa. s)	2,17	-

5.2 CONTROLE DO APARELHO DE PEF I, II E III

Foi observado que os processos (1) e (2) obtiveram resultados positivos com nenhuma contaminação. Enquanto o processo (3) houve considerável redução de microorganismos após a aplicação de PEF nas amostras líquidas, mas não houve contaminação de outros organismos.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA EM SISTEMA CONTÍNUO

5.3.1 Teste I

5.3.1.1 *Lactobacillus plantarum**

A Tabela 11 apresenta a magnitude dos efeitos das variáveis independentes, bem como o efeito de interação entre elas, sobre o número de redução decimal de microorganismos.

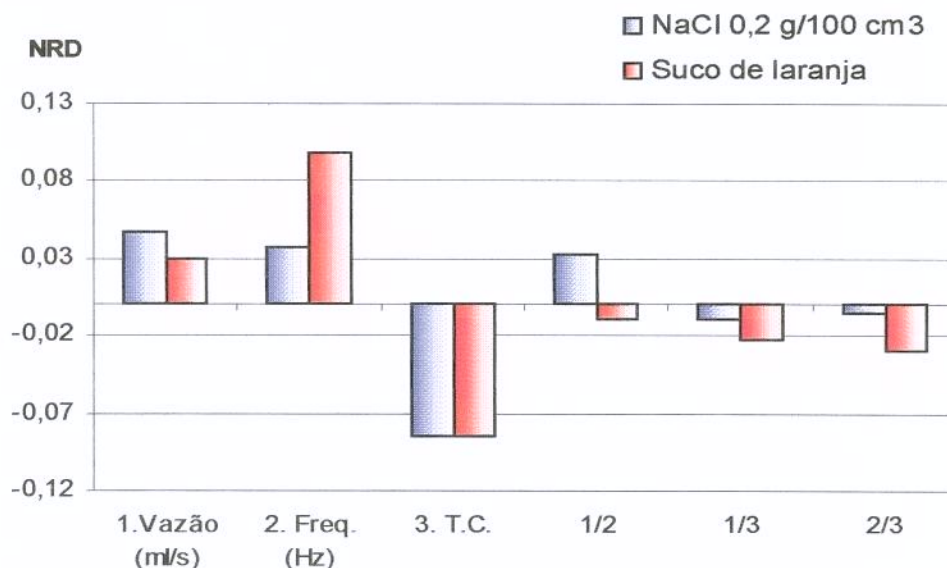
A interpretação dos resultados da Tabela 11 e/ou Figura 14 deve ser feita com base na magnitude e sinais dos efeitos. Quanto maior o valor do efeito, maior será a influência deste sobre a resposta em estudo. O sinal indica a proporcionalidade com que varia o efeito com relação à resposta.

Tabela 11: Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de *Lactobacillus plantarum* em sistema contínuo.

	Suco de laranja		NaCl 0,2 g/100 cm ³	
	Valor de efeito ± Erro puro	p	Valor de efeito ± Erro puro	p
Média global	0,151250±0,029235	0,000849	0,128750±0,015462	0,000033
Efeitos principais				
1. Vazão (ml/s)	0,03000±0,058470	0,621758	0,047500±0,030923	0,163075
2. Freq. (Hz)	0,097500±0,058470	0,133968	0,037500±0,030923	0,259845
3. T.C.	-0,08500±0,058470	0,184096	-0,08500±0,030923	0,025108
Efeito de interação				
1 / 2	-0,0100±0,058470	0,868449	0,03250±0,030923	0,323972
1 / 3	-0,02250±0,058470	0,710405	-0,0100±0,030923	0,754698
2 / 3	-0,03000±0,058470	0,621758	-0,0050±0,030923	0,875559

*A tabela completa com a concentração inicial e final dos microorganismos está no anexo.

A Figura 14 ilustra os resultados dos efeitos obtidos em números de redução decimal de microrganismo para serem mais claramente visualizados.



*NRD: número de redução decimal.

Figura 14: Efeito padronizado de aplicação de PEF na redução de *L. plantarum* em NaCl 0,2g/ 100 cm³ e Suco de laranja em sistema contínuo. Intervalo de confiança: 95%.

Pelos resultados da Tabela 11 e/ou da Figura 14, verifica-se que a variação da vazão acarretou o efeito em 0,030 de número de redução decimal de microrganismo no suco de laranja ($p=0,621758$) e 0,04750 de redução na solução salina ($p=0,163075$), porém, o efeito não foi significativo a nível de 95% de confiança, mas considera-se significativo em solução salina a nível de 84% de confiança. ($p=0,163075$).

Com relação à frequência, observou-se um efeito de NRD igual a 0,09750 para suco de laranja ($p=0,621758$) e 0,03750 de redução para solução salina ($p=0,259845$), sem apresentar diferença significativa entre eles, embora a frequência tenha apresentado efeito significativo com nível de 87% para o suco ($p=0,133968$). Por essa razão, a frequência será importante para o desenvolvimento dos testes seguintes.

A câmara de tratamento demonstrou maior eficiência na redução de microrganismo apresentando o valor de -0,0850 em suco de laranja ($p=0,184096$) e -0,0850 em NaCl 0,2g/100cm³ ($p=0,025108$), sendo este efeito foi significativo a nível de 95% de confiança, mas o efeito foi significativo em suco de laranja a nível de 81,6% ($p=0,184096$).

Com relação aos níveis observados pela Figura 14, o sentido negativo indica que o eletrodo placa-placa foi mais eficiente na redução de número de microrganismo que o eletrodo coaxial indicado no sentido positivo. Os menores percentuais de redução de bactéria foram determinados quando se diminuiu a vazão e a frequência e utilizado a câmara de tratamento com eletrodo coaxial.

As amostras de solução salina e de suco de laranja, as interações entre vazão/frequência, vazão/T.C., frequência/ T.C. não apresentaram diferença significativa a níveis de 95% de confiança.

Pelas Tabelas 19 e 20 (ANEXO) observa-se que incrementando a frequência bem como diminuindo a vazão de duas amostras, independente do tipo de câmara de

tratamento usado, houve pouca redução de microrganismo em relação ao número de microrganismo inoculado nas amostras antes de ser processado.

5.3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus**

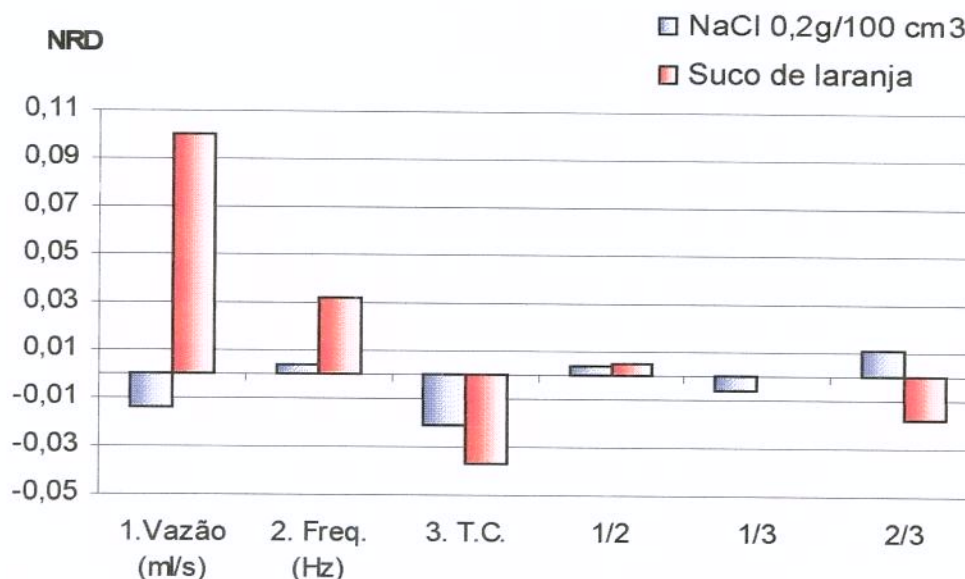
A Tabela 12 apresenta a magnitude dos efeitos das variáveis independentes, bem como o efeito de interação entre elas, sobre o número de redução de microrganismos.

Tabela 12: Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* em sistema contínuo.

	Suco de laranja		NaCl 0,2g/100 cm ³	
	Valor do efeito ± Erro puro	p	Valor do efeito ± Erro puro	p
Média Global	0,1438±0,0098	0,00000	0,1106±0,0112	0,000009
Efeitos principais				
1. Vazão (ml/s)	0,1000±0,0193	0,622383	-0,0138±0,0223	0,555086
2. Freq. (Hz)	0,0325±0,0196	0,134584	0,0038±0,0223	0,870777
3. T.C.	-0,0675±0,0196	0,008606	-0,0213±0,0223	0,369057
Efeito de Interação				
1 / 2	0,0050±0,0196	0,804356	0,0038±0,0223	0,870777
1 / 3	0,0000±0,0196	1,0000	-0,0063±0,0223	0,786621
2 / 3	-0,0175±0,0196	0,396282	0,0113±0,0223	0,627910

*A tabela completa com a concentração inicial e final dos microorganismos está no anexo

A Figura 15 ilustra os resultados dos efeitos obtidos em números de redução decimal de microrganismo para ser mais claramente visualizados.



*NRD: número de redução decimal.

Figura 15: Efeito padronizado de aplicação de PEF na redução de *S. c. var ellipsoideus* em NaCl 0,2g/ 100cm³ e Suco de laranja em sistema contínuo. Intervalo de confiança: 95%.

Analisando-se a Figura 15 e/ou Tabela 12 observamos que a vazão causou efeito de 0,0100 de redução de microrganismo no suco de laranja ($p= 0,622383$) e $-0,0138$ na solução salina ($p= 0,555086$), mas os efeitos em duas amostras líquidas não foram significativos á nível de 95% de confiança.

Quanto à frequência, o efeito causado foi de 0,0325 para suco de laranja ($p= 0,134584$) e 0,0038 para solução salina ($p= 0,870777$) e não apresentou diferença significativa entre eles. Mas a nível de 86,7% de confiança, o efeito se torna significativo em suco de laranja ($p= 0,134584$), e obteve o valor do efeito 10 vezes maior em relação a amostra de NaCl 0,2g/ 100cm³.

A câmara de tratamento placa-placa apresentou diferença ao nível de 95% de confiança em relação a coaxial, demonstrando maior eficiência na redução de microrganismo de $-0,0675$ para o suco de laranja ($p= 0,008606$) e $-0,0213$ para solução salina ($p= 0,369057$).

As interações entre vazão/frequência, vazão/T.C, frequência/T.C não apresentaram diferença significativa a níveis de 95% de confiança nas amostras de solução salina e de suco de laranja.

Pelos resultados apresentados pelas Tabelas 21 e 22 (ANEXO) verificaram-se que aplicando o PEF no sistema contínuo não houve redução de um ciclo decimal de microrganismo.

As causas dessa não redução para cultura láctica e levedura foram certamente devidas a alguns fatores tais como:

1- Potência baixa: para gerar pulsos de alta voltagem em alimentos líquidos deve-se fazer passar um fluxo maior de corrente elétrica através da câmara de tratamento em um intervalo de tempo muito curto (Martin *et al*, 1994). Esse tempo é o tempo de descarga do capacitor C dado pela equação $\tau = R.C$. O valor do tempo ($\tau = 0,3 \text{ ms}$) aplicado no teste preliminar foi muito longo e não ocorrendo à carga e descarga do capacitor durante a aplicação de PEF e a maioria dos artigos descrevem em tempos muito curtos como $2,0 \mu\text{s}$ e $3,3 \mu\text{s}$ (Sharma *et al*, 1998), $1,5 \mu\text{s}$ (Reina *et al.*, 1998), $2\mu\text{s}$ (Vega-Mercado *et al*, 1997), $1\sim 100\mu\text{s}$ (Alvarez *et al*, 2000). Para obter esse efeito, diminuiu-se o valor da resistência de $150 \text{ k}\Omega$ para 100Ω e colocou-se mais um capacitor de $2,2 \text{ nF}$ em paralelo. Com isso o tempo foi reduzido para $\tau = 4,2 \mu\text{s}$.

2- Outra causa seria o uso de uma câmara de tratamento com um único par de eletrodos para aumentar o tempo de residência no campo elétrico. Os artigos encontrados para sistema contínuo usaram câmara de tratamento tubular “co-field” de múltiplo estágio, de dois ou mais pares de eletrodos dentro da câmara conectados em paralelo (Qiu *et al*, 1998, Jin & Zhang, 1999, Jia *et al.*, 1999), outros utilizaram dois pares de eletrodos na câmara de tratamento conectados em séries (Reina *et al*, 1998).

5.2.1.3 Sugestão e Modificação.

Para realizar o experimento, foram selecionados os fatores a serem estudados e os níveis em que esses fatores foram investigados. Um fatorial experimental 2^n completo envolve um plano com n fatores, cada um com dois níveis. Esse experimento fatorial completo é muito útil na fase inicial de investigação de um problema. É a forma mais econômica de conduzir um experimento para identificação de fatores importantes.

Em vista dos resultados apresentados no Teste I, foram feitas as seguintes modificações no equipamento e parâmetros para avaliar a performance em termos de redução de microrganismos:

- 1- Inclusão de mais um capacitor ($C = 2,2 \text{ nF}$);
- 2- Sistema contínuo para sistema circular;
- 3- A alteração de AC para DC para controlar a rotação (IR) contínua e uniforme; porque em AC o IR oscilava muito. Trabalhar apenas com polaridade positiva;
- 4- Aumento de variação de frequência de 1,1 e 4,4 Hz para 3,6 e 5,8 Hz.

5.4 Teste II

5.4.1 ANÁLISE EXPERIMENTAL EM SISTEMA CIRCULAR I

5.4.1.1 *Lactobacillus plantarum**

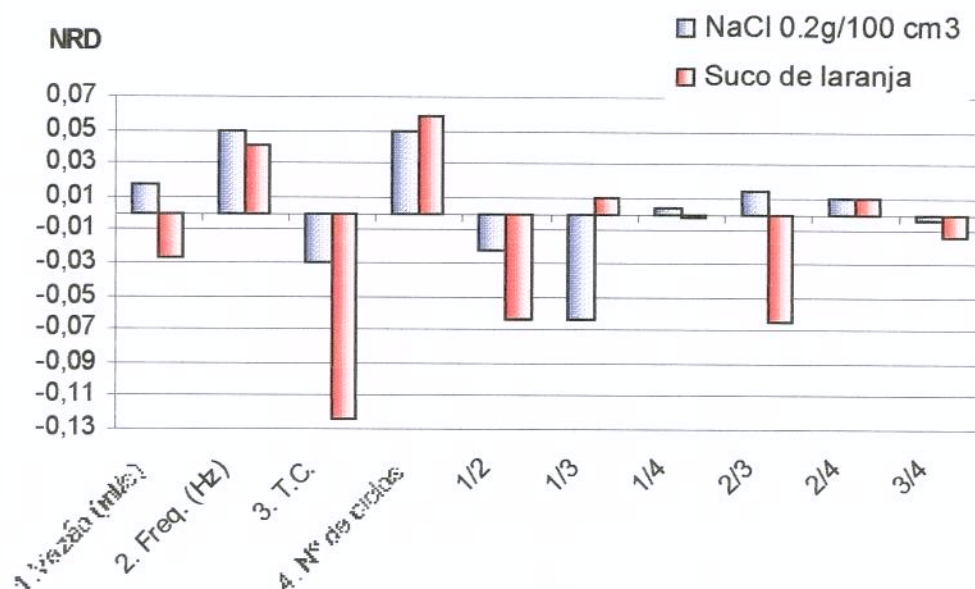
A Tabela 13 apresenta a magnitude dos efeitos das variáveis independentes, bem como o efeito de interação entre elas, sobre o número de redução de microrganismos.

Tabela 13: Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de *L. plantarum* em sistema circular I

	Suco de laranja		NaCl 0,2% (p/v)	
	Valor do efeito \pm Erro puro	p	Valor do efeito \pm Erro puro	p
Média global	0,1644 \pm 0,0141	0,000000	0,1022 \pm 0,0142	0,000002
Efeitos principais				
1. Vazão (ml/s)	-0,0275 \pm 0,0282	0,3433	0,0169 \pm 0,0283	0,559582
2. Freq. (Hz)	0,0400 \pm 0,0282	0,174665	0,0494 \pm 0,0283	0,100418
3. T.C.	-0,1238 \pm 0,0282	0,000452	-0,0306 \pm 0,0283	0,295533
4. N° de ciclos.	0,0588 \pm 0,0282	0,053315	0,0494 \pm 0,0283	0,100418
Efeito de interação				
1 / 2	-0,0638 \pm 0,0282	0,037833	-0,0231 \pm 0,0283	0,426151
1 / 3	0,0100 \pm 0,0282	0,727140	-0,0631 \pm 0,0283	0,040492
1 / 4	-0,0025 \pm 0,0282	0,930359	0,0044 \pm 0,0283	0,879154
2 / 3	-0,0650 \pm 0,0282	0,034677	0,0144 \pm 0,0283	0,618650
2 / 4	0,0100 \pm 0,0282	0,727140	0,0094 \pm 0,0283	0,744901
3 / 4	-0,0138 \pm 0,0282	0,631971	-0,0031 \pm 0,0283	0,913503

*A tabela completa com a concentração inicial e final dos microrganismos está no anexo.

A Figura 16 ilustra os resultados dos efeitos obtidos em números de redução decimal de microrganismo para ser mais claramente visualizados.



*NRD: número de redução decimal.

Figura 16: Efeito padronizado: *L. plantarum*, sistema circular, NaCl 0,2g/ 100cm³, Suco de laranja. Intervalo de confiança: 95%.

Interpretando a Figura 16 e/ou Tabela 13, o efeito da vazão de solução de NaCl 0,2g/ 100 cm³ ($p = 0,559582$), observa-se efeito de 0,0169 de redução de microrganismo e -0,0275 para suco de laranja ($p = 0,343316$), mas não foi significativo ao nível de 95% de confiança.

A frequência demonstrou um efeito de 0,0400 para suco ($p = 0,174665$) e 0,0494 para solução salina ($p = 0,100418$). As diferenças significativas aparecem a um nível de 80% de confiança em suco ($p = 0,174665$) e em NaCl 0,2g/ 100cm³ ($p = 0,1000418$).

Com relação à câmara de tratamento, observa-se que o eletrodo placa-placa apresentou diferença ao nível de 95% de confiança para o suco de laranja ($p = 0,000452$) em relação ao coaxial, demonstrando maior eficiência na redução de

microrganismo em suco de laranja (-0,1238) que para solução salina (-0,0306, $p=0,295533$).

Quanto ao número de ciclos, observamos efeito de 0,0588 no número de redução de microrganismo para suco ($p=0,053315$) e 0,0494, para NaCl 0,2g/100 cm³ ($p=0,100418$).

Para solução de NaCl 0,2g/100 cm³, houve a interação entre a vazão e câmara de tratamento e o efeito foi significativo ($p=0,040492$), e para suco de laranja a interação entre a vazão e frequência produziu efeito de $p=0,037833$, para frequência e câmara de tratamento o efeito foi $p=0,034677$, que foram significativos ao nível de 95% de confiança.

5.4.1.2 *S. c. var ellipsoideus* *

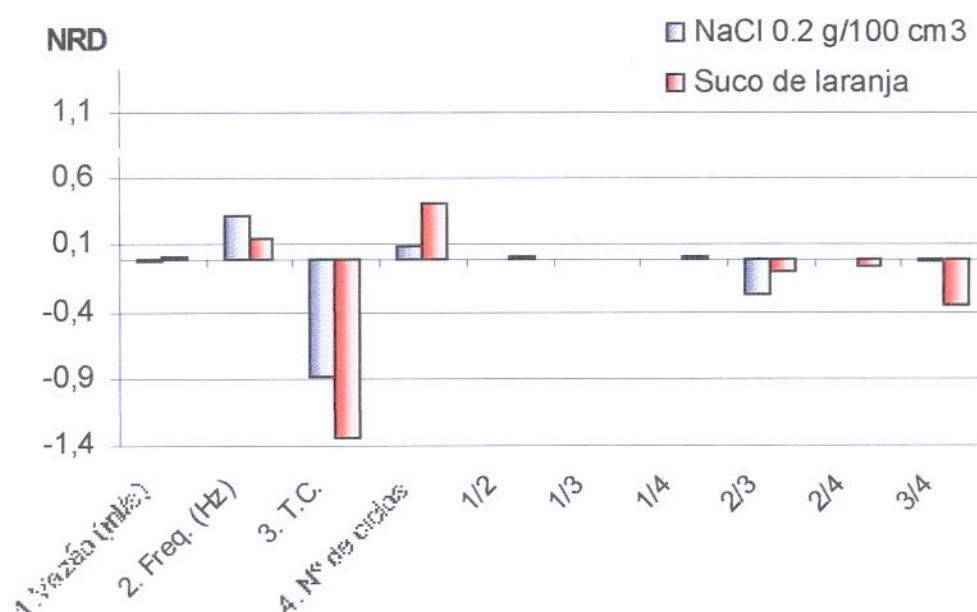
A Tabela 14 apresenta a magnitude dos efeitos das variáveis independentes, bem como o efeito de interação entre elas, sobre o número de redução de *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*.

Tabela 14: Efeitos da aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para a redução de *S.c. var cerevisiae* em sistema circular I.

	Suco de laranja		NaCl 0,2% (p/v)	
	Valor do efeito \pm Erro puro	p	Valor do efeito \pm Erro puro	p
Média global	0,8319 \pm 0,0361	0,000000	0,6197 \pm 0,0313	0,000000
Efeitos principais				
1. Vazão (mL/s)	0,0150 \pm 0,0721	0,837916	-0,0269 \pm 0,0626	0,673222
2. Freq. (Hz)	0,1425 \pm 0,0721	0,065754	0,3219 \pm 0,0626	0,000098
3. T.C.	-1,3413 \pm 0,0721	0,000000	-0,8931 \pm 0,0626	0,000000
4. N° de ciclos.	0,4150 \pm 0,0721	0,000030	0,0906 \pm 0,0626	0,166757
Efeitos de interação				
1 / 2	0,0163 \pm 0,0721	0,824640	0,0006 \pm 0,0626	0,992152
1 / 3	-0,0050 \pm 0,0721	0,945605	-0,0019 \pm 0,0626	0,976460
1 / 4	0,0063 \pm 0,0721	0,932038	-0,0031 \pm 0,0626	0,960778
2 / 3	-0,0950 \pm 0,0721	0,206449	-0,2706 \pm 0,0626	0,000522
2 / 4	-0,0588 \pm 0,0721	0,427400	-0,0094 \pm 0,0626	0,882750
3 / 4	-0,3450 \pm 0,0721	0,000204	-0,0194 \pm 0,0626	0,760782

*A tabela completa com a concentração inicial e final dos microorganismos está no anexo.

A Figura 17 ilustra os resultados dos efeitos obtidos em números de redução decimal de microrganismo para serem mais claramente visualizados.



*NRD: número de redução decimal.

Figura 17: Efeito padronizado: *S. c. var ellipsoideus*, sistema circular I, NaCl 0,2g/100 cm³, Suco de laranja. Intervalo de confiança: 95%.

Observando a Figura 17 e/ou Tabela 14, o efeito da vazão não foi significativo para suco ($p = 0,837916$) e para solução salina ($p = 0,673222$). Já a frequência apresentou efeito foi significativo para solução salina ($p = 0,000098$) e para o suco não foi significativo ($p = 0,065754$) ao nível de 95% de confiança.

A câmara de tratamento placa-placa apresentou eficiência na redução de microrganismo maior que a coaxial, tanto para o suco (-1,3413, $p = 0,000000$) quanto para solução salina (-0,8931, $p = 0,000000$), embora o efeito em suco tenha sido mais pronunciado que em solução salina.

Com relação ao número de ciclos, observou-se efeito de 0,4150 de redução de microrganismo para suco ($p = 0,000030$) e 0,0906, para salina ($p = 0,166757$), mas somente para suco o tempo foi significativo a nível de 95% de confiança.

Houve interação entre a câmara de tratamento e tempo de circulação para suco ($p= 0,000204$) e frequência e câmara de tratamento para solução salina ($p= 0,000522$), com o efeito foi significativo.

Os experimentos realizados no sistema circular I indicaram que este foi mais eficiente que o contínuo, e demonstraram que a câmara de tratamento com eletrodo placa-placa foi mais eficiente que o coaxial para a levedura do que para bactéria láctica. Incrementando o valor da frequência e o tempo de circulação (ou número de ciclos) ocorreu redução de microrganismo somente para a levedura, isto é, obteve-se redução de até dois ciclos logarítmicos (Tabela 25 e 26 - ANEXO). Enquanto que para a bactéria láctica não se obteve bons resultados de inativação, pois houve redução menor de um ciclo logarítmico (Tabela 23 e 24 - ANEXO).

Baseados nos resultados do experimento do Teste II, no Teste III foi analisado o comportamento da câmara de tratamento com eletrodo placa-placa, usando o mesmo sistema circular em duas amostras líquidas (suco de laranja e solução salina NaCl 0,2g/100 cm³ inoculadas com um tipo de microrganismo, *Saccharomyces c. var ellipsoideus*, para verificar e confirmar se o efeito de redução de microrganismo ocorreria quando aplicados os valores maiores de frequência e os números de ciclos.

5.5 Teste III

5.5.1 ANÁLISE EXPERIMENTAL EM SISTEMA CIRCULAR II

5.5.1.1 *S. c. var ellipsoideus**

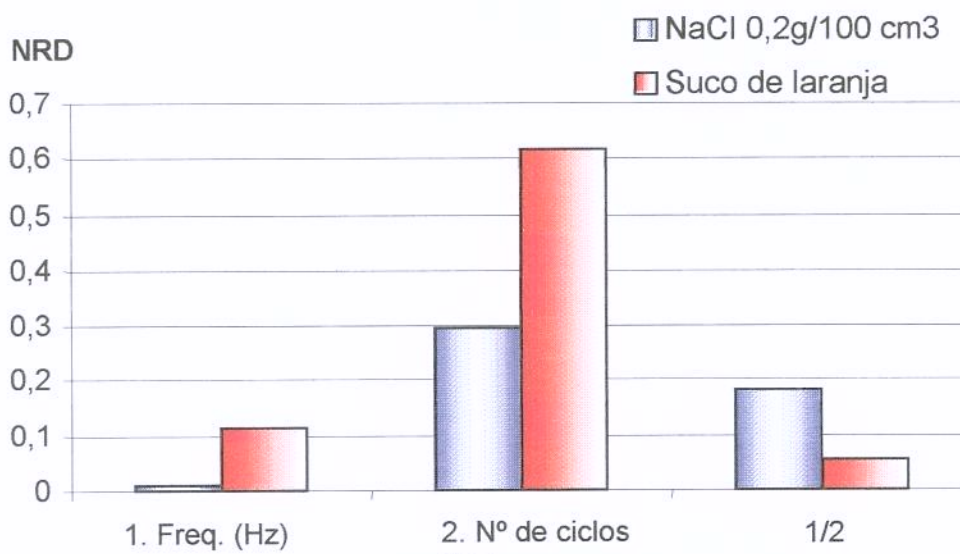
A Tabela 15 apresenta a magnitude dos efeitos das variáveis independentes, bem como o efeito de interação entre elas, sobre o número de redução de microrganismos.

Tabela 15: Efeitos de aplicação de PEF em suco de laranja e solução de NaCl para redução de *Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus* em sistema circular II utilizando a câmara de tratamento placa-placa e vazão 1 ml/s.

	Suco de laranja		NaCl 0,2% (p/v)	
	Valor do efeito \pm Erro puro	p	Valor do efeito \pm Erro puro	p
Média global	$1,4550 \pm 0,0137$	0,000000	$1,2457 \pm 0,0897$	0,000000
Efeitos principais				
1. Freq. (Hz)	$0,1125 \pm 0,0363$	0,012692	$0,0100 \pm 0,2374$	0,967320
2. N° de ciclos	$0,6175 \pm 0,0363$	0,000000	$0,295 \pm 0,2374$	0,252897
Efeito de interação				
1 / 2	$0,0525 \pm 0,0363$	0,181717	$0,1850 \pm 0,2374$	0,455814

*A tabela completa com a concentração inicial e final dos microorganismos está no anexo.

A Figura 18 ilustra os efeitos obtidos em números de redução decimal de microrganismo para ser mais claramente visualizados.



*NRD: número de redução decimal.

Figura 18: Efeito padronizado do gráfico: *S. cerevisiae*, sistema circular II, suco de laranja, NaCl 0,2g/100 cm³. Intervalo de confiança: 95%.

Pela Figura 18 e/ou Tabela 15, observa-se que a frequência acarretou o efeito de 0,1125 de redução de microrganismo no suco ($p = 0,012692$) e 0,0100 de redução na solução salina ($p = 0,967320$), porém o efeito significativo foi somente para suco ao nível de 95% de confiança.

Em relação ao número de ciclos, verificou-se que houve 0,6175 de redução de levedura no suco ($p = 0,000000$) e 0,2900 na solução salina ($p = 0,252897$), porém este não apresentou diferença significativa.

Os experimentos realizados demonstraram que houve diferença de inativação de *Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus* em solução salina de cloreto de sódio 0,2g/100cm³ e em suco de laranja. As Figuras 19 e 20 ilustram essas diferenças para as três condições de número de ciclos, tanto de suco quanto de NaCl 0,2g/100cm³, provavelmente por causa da presença de ácido cítrico em suco que causa efeito

sinérgico, ou devido aos pH diferenciados de cada meio, já que a condutividade elétrica dos líquidos foi ajustada no mesmo valor. Álvarez *et al* (2000) deduziram que a inativação de *Salmonella senftenberg* tratado a 19 kV/cm (2 Hz, “pulse width” de 2 μ s) foi mais resistente em pH 3,8 que pH 7,0, usando as amostras em tampão “McIlvaine citrate-phosphate”, com o mesmo valor de condutividade elétrica (2 mS/cm). A influência do pH sobre a inativação de microrganismo sobre o tratamento de PEF é incerta. Outros autores como Sale & Hamilton (1967) e Hülshager *et al* (1981) relataram que não existe influência do pH na inativação de microrganismo, o que contradiz com a pesquisa feita pelos Vega-Mercado *et al* (1996), pois eles encontraram que a inativação de *E.coli* foi mais significativa em pH entre 5,6 a 6,8.

Para os pesquisadores Zhang *et al* (1994b), a inativação maior de levedura (*S. cerevisiae*) ocorreu durante os primeiros 3 a 5 pulsos (tempo de tratamento dentro da câmara sobre “pulse width”). O aumento do número de pulsos não aumentou a inativação. Semelhante resultado ocorreu neste experimento, pois quanto maior tempo de circulação e frequência aplicava sobre as amostras líquidas, não reduziu o número de mortes de microorganismos suspensos em suco de laranja e na solução de NaCl como é observado nas Tabelas 27 e 28.



(a)



(b)



(c)

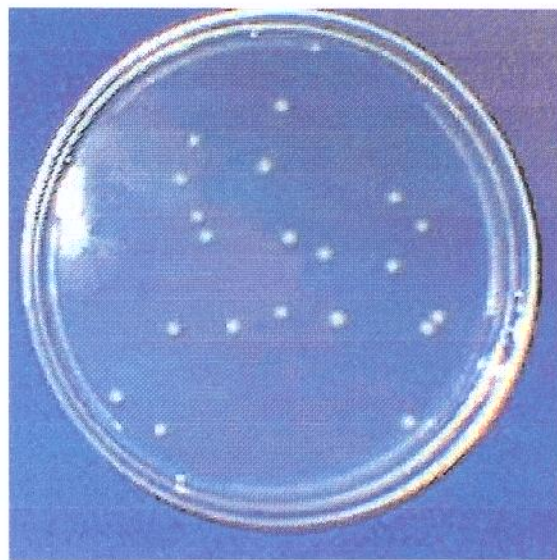


(d)

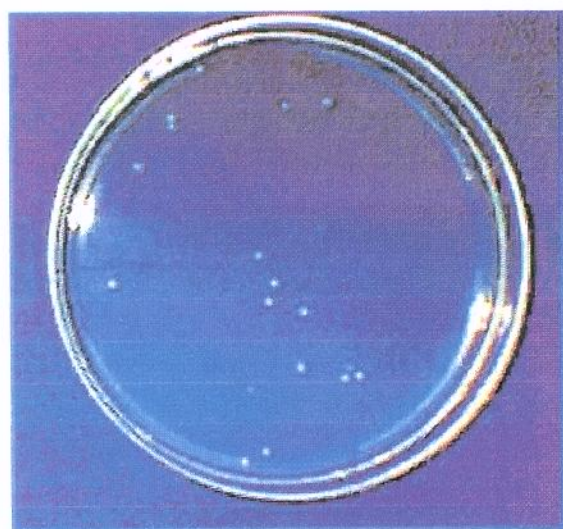
Figura 19: Aplicação de PEF sobre *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* em solução de NaCl 0,2%, 3,6 Hz e 7,5kV em sistema circular (Teste III):
(a) Início, sem tratamento PEF; (b) 4,2 ciclos ; (c) 7,8 ciclos (d) 11,4 ciclos



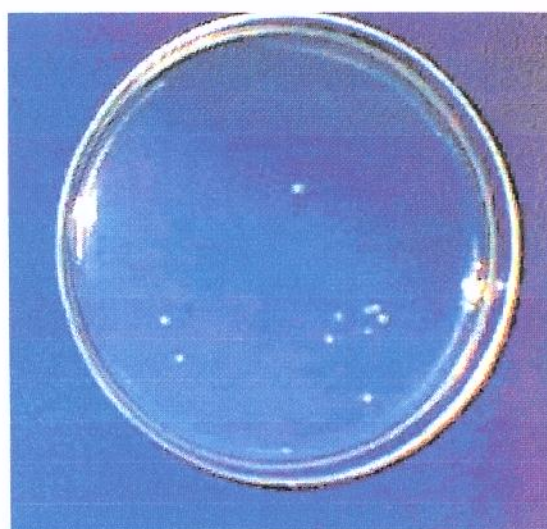
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 20: Aplicação de PEF sobre *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus* em suco de laranja, 7,5 kV e 3,6 Hz em sistema circular (Teste III): (a) Início, sem tratamento PEF; (b) 4,2 ciclos; (c) 7,8 ciclos; (d) 11,4 ciclos.

Comparando com o *Lactobacillus plantarum*, cuja contagem não reduziu o efeito de nenhum dos parâmetros aplicados em nenhum dos meios inoculados, conclui-se que as leveduras foram mais fáceis de inativar que as bactérias, principalmente devido ao tamanho maior das leveduras. Essa conclusão é similar à outros pesquisadores (Mizuno & Hori, 1988; Hamilton & Sale 1967; Jong & Heesh, 1998). Martin *et al* (1994) observaram que a energia necessária para inativar as células de *Saccharomyces cerevisiae* foi menor (14 kV/cm) que a aplicada em *Lactobacillus brevis* (20kV/cm) e isso se atribui ao diâmetro maior das células de leveduras e o baixo valor de pH de amostra processada (suco de laranja).

Jong & Heesh (1998) sugeriram processar a pulsos curtos e de alto campo elétrico (10 kV/cm) para ter efeito letal em *S. cerevisiae*. A frequência repetitiva também foi encontrada como a variação importante e o melhor valor estava entre 1 a 2 kHz. No presente experimento foi aplicado valor baixo (máximo, 5.8 Hz) de frequência, porque quando se aumentava a rotação não ocorria a carga e descarga uniforme e constante.

O outro argumento para explicar os resultados obtidos é que células microbianas se agrupam e formam uma camada protetora, na qual o valor de condutividade é baixo. Essas células vivas envolvidas pela camada protetora terão resistência ao PEF e sobreviverá mais que as células não protegidas, resultando a taxa de inativação baixa (Mizuno & Hori, 1988). Segundo Jayaram *et al* (1992), a probabilidade de não redução em algumas células microbianas sobre o campo elétrico testado mesmo se for aplicado com mais pulso, é devido à concentração alta de bactérias suspendidas na amostra líquida atribuindo a alta habilidade entre as células se agruparem (Zhang *et al*, 1994b). Alvarez *et al* (2000) concluíram que a inativação de microrganismo não é função da concentração inicial inoculada.

Outro ponto a ser comentado é quando ocorre adesão na parede do isolador e no eletrodo da câmara de tratamento, algumas destas células que fluem dentro dela não são levadas e podem permanecer aderidas na parede. Células vivas também formam adesão sobre a parede, podendo haver cobertura com outras células que

protegem as células vivas, tornando insuficiente a destruição. E ao longo da parede, especialmente a parte superior do canto da câmara, a potência do campo elétrico é baixa e por tanto as células que estão sobre a parede podem não ser inativadas efetivamente (Mizuno & Hori, 1988).

Jia *et al* (1999) observaram que o processo PEF realizado em sistema de recirculação em suco de laranja foi eficiente na redução de contagem total de placas, mas não foi tão eficiente quanto o processo térmico (90°C/ 1 min.). Mas obteve bom resultado de inativação em leveduras e bolores quando comparado ao processo térmico e PEF.

Durante o processo de tratamento de PEF em duas amostras líquidas, ocorreu o pequeno aumento de 1 a 2° Celsius de temperatura, quando se utilizou sistema circular. Sales & Hamilton (1967) observaram que aplicando a 10 pulsos de 20 μ s em campo elétrico de 4,9 a 18,5 kV/cm de intensidade em suspensão de *E. coli*, ocorreu aumento máximo de temperatura de 10 graus Celsius. Jacob *et al* (1981) observaram aumento de temperatura de 8 graus Celsius quando aplicaram 30 kV/cm e 1 a 8 pulsos de 20 μ s em suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.6 COR

A aplicação de métodos e de técnicas para conservação de alimentos resultantes de processos industrialmente controlados como pasteurização, esterilização entre outros, poderá, infelizmente, provocar modificações indesejáveis nos alimentos, como por exemplo, alterações na cor, no sabor, na textura e nas propriedades nutricionais. A cor poderá sofrer alterações não só pela modificação da estrutura de algumas substâncias, por reações de caramelização e reação de Maillard (Silva, 2000). O tratamento com PEF poderá produzir alimentos processados com qualidades

superiores às dos tratamentos térmicos, devido ao fato deste tratamento causar pequeno aumento na temperatura nas soluções.

Segundo Sharma *et al* (1998), as amostras (sucos de frutas) tratadas por PEF (28 kV/cm, 1000 Hz, “pulse width” = 2 μ s) mantiveram coloração próxima ao natural, se comparado com as mesmas amostras tratadas termicamente (80°C, 2 minutos), que apresentaram turbidez e aspecto meio esbranquiçadas. Por tanto, as amostras tratadas por PEF não apresentaram efeitos negativos na cor e isso indica que esse tratamento não prejudica sucos naturais. Jin & Zhang (1999) observaram que as amostras de suco de “cranberry” processadas por PEF a 20 kV/cm e 40 kV/cm a 50 e 150 μ s não apresentaram diferença significativa na cor em relação ao controle.

Tabela 16: Médias amostrais do efeito de cor de suco de laranja antes e após o tratamento de PEF.

	PEF Sem PEF	3,6 Hz Nº de ciclos			5,8 Hz Nº de ciclos			
		4	8	12	4	8	12	
L	48,6	48,53	48,56	48,57	48,52	48,51	48,45	
a	-0,43	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	-0,36	
b	19,21	19,10	19,09	19,09	19,10	19,09	19,08	
DE								0,17
DC								0,14

Efeito de cor de suco de laranja antes e depois de PEF.

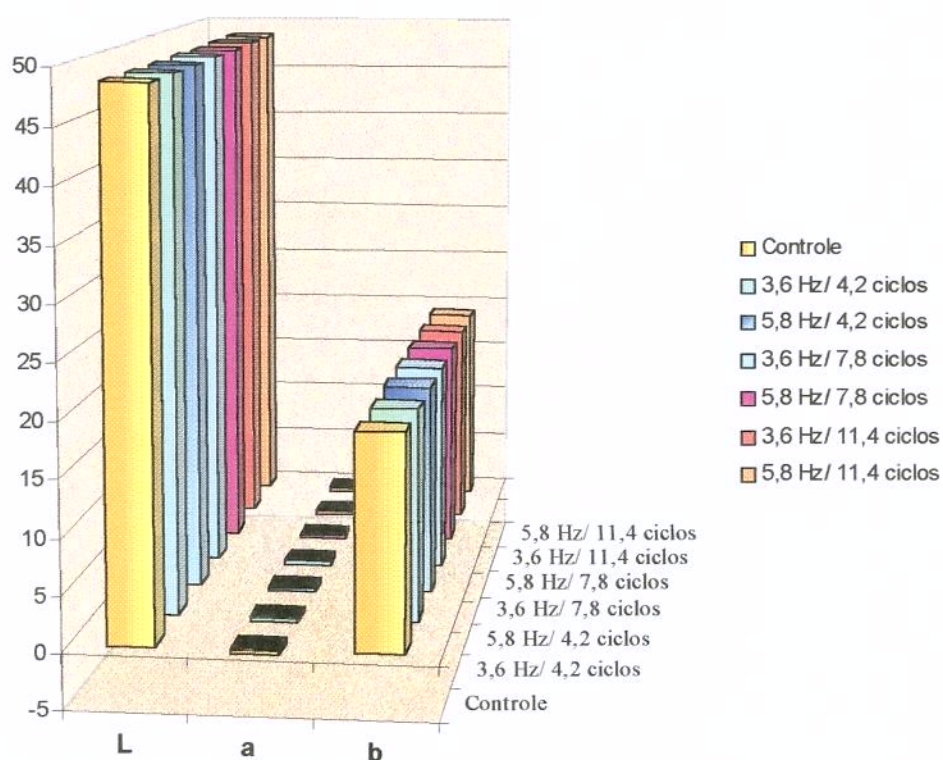


Figura 21: Efeitos de cor das amostras de suco de laranja tratadas pelo processo PEF.

A Tabela 16 apresenta os valores obtidos pelo colorímetro, ou seja, o aspecto da cor do suco de laranja (controle) e os valores de amostras do suco tratado pelo PEF. Os resultados podem ser mais claramente visualizados pelo gráfico (Figura 21). Observa-se que os dados da Tabela 16 e/ou Figura 21, os resultados das amostras e o padrão não apresentaram diferença na coloração.

5.7 AÇÚCAR REDUTOR

A doçura do suco de laranja é devida à presença dos açúcares sacarose, frutose e glicose encontrados na proporção de 2:2:1 (McCreedy, 1977).

Para verificar se a amostra do suco após o processo de PEF apresentou alguma alteração quanto ao teor de açúcares, foi feita análise de açúcares redutores por DNS.

Os dados obtidos no teste foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), com auxílio do pacote estatístico do programa STATISTICA 5.0 seguida de teste de Duncan, pelos quais verificou-se que houve diferença significativa entre as médias em nível de confiança de 95%.

Tabela 17: Variações dos teores de açúcares redutores (AR) tratados por PEF - DNS

Freqüência (Hz)	3,6			4,7			5,8		
Nº de ciclos	4	8	12	4	8	12	4	8	12
Resultados (Abs)	0,324	0,365	0,374	0,372	0,366	0,392	0,378	0,398	0,382
Açúcar redutor (g/l). (Sem diluição)	0,135	0,155	0,159	0,158	0,155	0,168	0,161	0,171	0,163
Teste de Duncan (p<0,05)	0,0036	7,24E-5	5,85E-5	3,3E-5	1,5E-4	2,3E-5	2,9E-5	2,2E-5	2,7E-5

Curva padrão: AR= 0,4806 Abs – 0,0204. (g/l); Branco (padrão): A= 0,336 = 0,141 g/l.

Analisando-se a Tabela 17, em relação as amostras de suco de laranja antes e após o processamento por PEF sob vários parâmetros estudados, nota-se um efeito significativo na determinação do açúcar redutor.

Observa-se uma tendência ao aumento nos valores de açúcar redutor quando se aumenta a freqüência de pulsos elétricos no sistema. Este comportamento não foi tão nítido quanto à variação do número de ciclos. Tal fato pode ter ocorrido devido a uma possível hidrólise enzimática causada pela variação de freqüência.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- O sistema circular foi mais eficiente que o contínuo.

- A influência do tamanho de microorganismo: a levedura (*S. cerevisiae* var *ellipsoideus*) foi mais sensível à aplicação do PEF que a bactéria (*L. plantarum*), quando foi usado o eletrodo placa-placa. No eletrodo coaxial não houve reação em nenhum dos microrganismos.
- Os meios com os mesmos valores de condutividade apresentaram diferentes eficiências de inativação de microorganismo;
- O aumento da frequência aplicada não aumentou a inativação de microrganismos em ambas amostras líquidas, para ambos os tipos estudados; o número de ciclos (4,2 e 7,8) só influenciou a inativação de leveduras em meio ácido, reduzindo a população até 2 ciclos logarítmicos, mas em solução salina 0,2% houve o decréscimo de apenas 1 ciclo logarítmico;
- O incremento do número de ciclos e frequência aplicada sobre as amostras líquidas com microorganismo, não foi observado o aumento de mortes deste;
- Os microrganismos possuem tendência de aderir à superfície (aço, tubo de silicone) por adesão, o que dificultou a inativação dos mesmos.
- A aplicação de PEF nas amostras de suco de laranja não alterou visualmente a cor das mesmas, em comparação a amostra não tratada, porém ocorreu alteração nos teores de açúcares presentes no suco.

Muitos estudos devem ser feitos para melhorar e otimizar o tratamento de suco por PEF como o processo de não-térmico de preservação de alimento.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aperfeiçoar mais o equipamento como o circuito elétrico, como aumentar a frequência para 1 a 2 kHz;
- Melhorar o modelo de câmara de tratamento em relação ao campo elétrico;

- Aprofundar o estudo sobre o comportamento físico de microrganismo quando processado pelo PEF e comparar com o processo térmico.

ANEXO

1 Tabela 18: Desenvolvimento de crescimento de levedura. (Acertar o pH a 4.7 ± 0.2) (Difco Laboratories)

Extrato de malte (Difco)	1,5 g
D (+)-Maltose (Riedel-De Haenag Seelze-Hannover)	0.45 g
Extrato de levedura (Difco)	0.3 g
Glucose 5% (Ecibra)	12,5 g
Água	250 ml

2 Determinação de açúcares redutores - DNS

Sensibilidade do Método: 0,1 a 1,0 g/l.

Utilizou-se um mililitro de amostra e adicionou-se um mililitro de DNS. A amostra foi deixada em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Após a amostra resfriada adicionou-se 16 ml de solução de tartarato duplo de sódio e potássio.

A leitura foi feita em espectrofotômetro (Micronal espectrofotômetro digital, modelo B-34211, Brasil) a 540 nm.

3 Determinação de cor.

Foi medido pelo espectrofotômetro Hunterlab (modelo ColorQuest II).

Parâmetros para calibração:

- Refrctância especular incluída (RSIN).
- Modo de calibração: D-65 illuminate.
- Ângulo de observador: nº 10 graus.
- Valores do branco: nº 6299g-03/96- padrão branco

$$X= 77,46 \quad y= 82,08 \quad z=88,38$$

- Padrão cinza: nº c6299- 03/96

$$X=47,71 \quad y=50,83 \quad z=54,94$$

- Sistema de cor utilizado: Hunterlab.

1.0.1 L = medido a luminosidade variando de 0 a 100 (L= 0, cor preto;
L=100, cor branco);

1.0.2 a = cromaticidade, varia de -a a + a (-a= verde; a=vermelho);

1.0.3 b = cromaticidade, varia de -b a +b (-b= azul; +b= amarelo).

- Foram avaliadas a cor (·E) e cromaticidade (ΔC):

Fórmula:

$$DE=\Delta E_H= \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

$$DC=\Delta C= \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Foi utilizada cubeta de vidro oticamente limpo com caminho ótico 10 mm com campo de leitura de um polegada.

Tabela 19: Valores experimentais realizados com o teste I: *Lactobacillus plantarum*, sistema contínuo, suco de laranja.

Replicatas (codificadas)	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Real Vazão (mL/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Início log (ufc/mL)	Final Log (ufc/mL)	NRD*
1	1	1	1	2	4,4	P-P	6,76	6,59	0,17
1	1	1	-1	2	4,4	CoA	6,79	6,35	0,44
1	1	-1	1	2	1,1	P-P	6,8	6,7	0,1
1	1	-1	-1	2	1,1	CoA	6,73	6,6	0,13
1	-1	1	1	1	4,4	P-P	6,67	6,59	0,08
1	-1	1	-1	1	4,4	CoA	6,56	6,47	0,09
1	-1	-1	1	1	1,1	P-P	6,62	6,57	0,05
1	-1	-1	-1	1	1,1	CoA	6,53	6,47	0,06
2	1	1	1	2	4,4	P-P	6,61	6,5	0,11
2	1	1	-1	2	4,4	CoA	6,64	6,52	0,12
2	1	-1	1	2	1,1	P-P	6,35	6,28	0,07
2	1	-1	-1	2	1,1	CoA	6,49	6,3	0,19
2	-1	1	1	1	4,4	P-P	6,71	6,5	0,21
2	-1	1	-1	1	4,4	CoA	6,8	6,42	0,38
2	-1	-1	1	1	1,1	P-P	6,45	6,37	0,08
2	-1	-1	-1	1	1,1	CoA	6,4	6,26	0,14

*NRD: Número de redução decimal.

$$NRD = \log N_0 - \log N_f$$

Onde:	Vazão	Freq.	T.C
-1	1	1,1	p-p
1	2	4,4	Coa

Tabela 20: Valores experimentais realizados com o teste I: *Lactobacillus plantarum*, sistema contínuo, NaCl 0,2% (p/v).

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	6,46	6,3	0,16
1	1	1	-1	6,87	6,7	0,17
1	1	-1	1	6,21	6,11	0,1
1	1	-1	-1	6,44	6,33	0,11
1	-1	1	1	6,15	6,08	0,07
1	-1	1	-1	6,21	6,12	0,09
1	-1	-1	1	6,35	6,29	0,06
1	-1	-1	-1	6,83	6,75	0,08
2	1	1	1	6,64	6,52	0,12
2	1	1	-1	6,4	6,1	0,3
2	1	-1	1	6,62	6,58	0,04
2	1	-1	-1	6,54	6,32	0,22
2	-1	1	1	6,74	6,68	0,06
2	-1	1	-1	6,51	6,3	0,21
2	-1	-1	1	6,14	6,06	0,08
2	-1	-1	-1	6,84	6,65	0,19

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f$$

Onde:	Vazão	Freq.	T.C
-1	1	1,1	p-p
1	2	4,4	Coa

Tabela 21: Valores experimentais realizados com o teste I: *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*, sistema contínuo, suco de laranja.

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Início: log(ufc/ml)	Final: log(ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	6,37	6,29	0,08
1	1	1	-1	6,54	6,3	0,24
1	1	-1	1	6,41	6,34	0,07
1	1	-1	-1	6,35	6,22	0,13
1	-1	1	1	6,7	6,61	0,09
1	-1	1	-1	6,51	6,31	0,2
1	-1	-1	1	6,71	6,64	0,07
1	-1	-1	-1	6,45	6,3	0,15
2	1	1	1	6,49	6,32	0,17
2	1	1	-1	6,63	6,45	0,18
2	1	-1	1	6,56	6,42	0,14
2	1	-1	-1	6,35	6,17	0,18
2	-1	1	1	6,8	6,67	0,13
2	-1	1	-1	6,42	6,23	0,19
2	-1	-1	1	6,3	6,17	0,13
2	-1	-1	-1	6,5	6,35	0,15

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_r$$

Onde:	Vazão	Freq.	T.C
-1	1	1,1	p-p
1	2	4,4	Coa

Tabela 22: Valores experimentais realizados com o teste I: *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*, sistema contínuo, NaCl 0,2%.

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	6,7	6,62	0,08
1	1	1	-1	6,7	6,59	0,11
1	1	-1	1	6,55	6,48	0,07
1	1	-1	-1	6,55	6,41	0,14
1	-1	1	1	6,47	6,32	0,15
1	-1	1	-1	6,47	6,28	0,19
1	-1	-1	1	6,5	6,37	0,15
1	-1	-1	-1	6,5	6,35	0,13
2	1	1	1	6,48	6,38	0,14
2	1	1	-1	6,48	6,34	0,1
2	1	-1	1	6,74	6,67	0,07
2	1	-1	-1	6,74	6,62	0,12
2	-1	1	1	6,25	6,19	0,06
2	-1	1	-1	6,25	6,18	0,07
2	-1	-1	1	6,66	6,58	0,08
2	-1	-1	-1	6,66	6,55	0,11

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f$$

Onde:	Vazão	Freq.	T.C
-1	1	1,1	p-p
1	2	4,4	Coa

Tabela 23: Valores experimentais realizados com o teste II: *Lactobacillus plantarum*, sistema circular I, em suco de laranja.

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Tempo de Circulação (min.)	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	1	6,15	6,11	0,06
1	1	1	1	-1	6,15	6,09	0,04
1	1	1	-1	1	6,67	6,41	0,26
1	1	1	-1	-1	6,67	6,58	0,09
1	1	-1	1	1	6,23	6,18	0,05
1	1	-1	1	-1	6,23	6,2	0,03
1	1	-1	-1	1	6,22	6,01	0,21
1	1	-1	-1	-1	6,22	6,08	0,14
1	-1	1	1	1	6,79	6,6	0,19
1	-1	1	1	-1	6,79	6,67	0,12
1	-1	1	-1	1	6,35	6,07	0,28
1	-1	1	-1	-1	6,35	6,13	0,22
1	-1	-1	1	1	6,66	6,52	0,14
1	-1	-1	1	-1	6,66	6,59	0,07
1	-1	-1	-1	1	6,61	6,37	0,24
1	-1	-1	-1	-1	6,61	6,43	0,18
2	1	1	1	1	6,52	6,41	0,11
2	1	1	1	-1	6,52	6,47	0,05
2	1	1	-1	1	6,34	6,07	0,27
2	1	1	-1	-1	6,34	6,11	0,23
2	1	-1	1	1	6,69	6,47	0,22
2	1	-1	1	-1	6,69	6,5	0,19
2	1	-1	-1	1	6,83	6,58	0,25
2	1	-1	-1	-1	6,83	6,62	0,21
2	-1	1	1	1	6,64	6,54	0,1
2	-1	1	1	-1	6,64	6,59	0,05
2	-1	1	-1	1	6,74	6,26	0,48
2	-1	1	-1	-1	6,74	6,34	0,4
2	-1	-1	1	1	6,9	6,77	0,13
2	-1	-1	1	-1	6,9	6,81	0,09
2	-1	-1	-1	1	6,32	6,21	0,11
2	-1	-1	-1	-1	6,32	6,27	0,05
Onde:	Vazão	Freq.	T.C	Tempo de circulação (min.)			
-1	1	1,1	p-p	7			
1	2	4,4	Coa	13			

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f$$

Tabela 24: Valores experimentais realizados com o teste II: *Lactobacillus plantarum*, sistema circular I, em NaCl 0,2% (p/v).

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Tempo de Circulação (min.)	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	1	6,13	6,07	0,06
1	1	1	1	-1	6,13	6,09	0,04
1	1	1	-1	1	6,88	6,59	0,29
1	1	1	-1	-1	6,88	6,66	0,22
1	1	-1	1	1	6,19	6,11	0,08
1	1	-1	1	-1	6,19	6,13	0,06
1	1	-1	-1	1	6,29	6,04	0,25
1	1	-1	-1	-1	6,29	6,13	0,16
1	-1	1	1	1	6,32	6,21	0,11
1	-1	1	1	-1	6,32	6,29	0,03
1	-1	1	-1	1	6,54	6,38	0,16
1	-1	1	-1	-1	6,54	6,41	0,13
1	-1	-1	1	1	6,07	6,01	0,06
1	-1	-1	1	-1	6,07	6,03	0,04
1	-1	-1	-1	1	6,24	6,19	0,05
1	-1	-1	-1	-1	6,24	6,2	0,04
2	1	1	1	1	6,13	6,02	0,11
2	1	1	1	-1	6,13	6,08	0,05
2	1	1	-1	1	6,18	6,02	0,16
2	1	1	-1	-1	6,18	6,12	0,06
2	1	-1	1	1	6,08	6,01	0,07
2	1	-1	1	-1	6,08	6,04	0,04
2	1	-1	-1	1	6,11	6,03	0,08
2	1	-1	-1	-1	6,11	6,07	0,04
2	-1	1	1	1	6,73	6,41	0,32
2	-1	1	1	-1	6,73	6,5	0,23
2	-1	1	-1	1	6,05	6,01	0,04
2	-1	1	-1	-1	6,05	6,03	0,02
2	-1	-1	1	1	6,2	6,13	0,07
2	-1	-1	1	-1	6,2	6,18	0,02
2	-1	-1	-1	1	6,65	6,53	0,12
2	-1	-1	-1	-1	6,65	6,59	0,06

Onde:	Vazão	Freq.	T.C	Tempo de Circulação (min.)
-1	1	1,1	p-p	7
1	2	4,4	Coa	13

*NRD: Número de redução decimal.

$$NRD = \log N_0 - \log N_f$$

Tabela 25: Valores experimentais realizados com o teste II: *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*, sistema circular I, suco de laranja.

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Tempo de Circulação (min.)	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	1	6,29	6,04	0,25
1	1	1	1	-1	6,29	6,11	0,18
1	1	1	-1	1	6,84	4,47	2,37
1	1	1	-1	-1	6,84	5,35	1,49
1	1	-1	1	1	6,16	6,02	0,14
1	1	-1	1	-1	6,16	6,07	0,09
1	1	-1	-1	1	6,76	4,85	1,91
1	1	-1	-1	-1	6,76	5,71	1,05
1	-1	1	1	1	6,49	6,13	0,36
1	-1	1	1	-1	6,49	6,27	0,22
1	-1	1	-1	1	6,77	4,7	2,07
1	-1	1	-1	-1	6,77	5,55	1,22
1	-1	-1	1	1	6,44	6,23	0,21
1	-1	-1	1	-1	6,44	6,34	0,1
1	-1	-1	-1	1	6,32	4,3	2,02
1	-1	-1	-1	-1	6,34	5,22	1,12
2	1	1	1	1	6,83	6,71	0,12
2	1	1	1	-1	6,83	6,67	0,16
2	1	1	-1	1	6,14	4,39	1,75
2	1	1	-1	-1	6,14	5,11	1,03
2	1	-1	1	1	6,59	6,32	0,27
2	1	-1	1	-1	6,59	6,47	0,12
2	1	-1	-1	1	6,11	4,52	1,59
2	1	-1	-1	-1	6,11	5,2	0,91
2	-1	1	1	1	6,2	6,08	0,12
2	-1	1	1	-1	6,2	6,13	0,07
2	-1	1	-1	1	6,43	4,82	1,61
2	-1	1	-1	-1	6,43	5	1,43
2	-1	-1	1	1	6,12	6,02	0,1
2	-1	-1	1	-1	6,12	6,05	0,07
2	-1	-1	-1	1	6,16	4,42	1,74
2	-1	-1	-1	-1	6,16	5,43	0,73

*NRD: Número de redução decimal.

$$NRD = \log N_0 - \log N_f$$

Onde:	Vazão	Freq.	T.C	Tempo de circulação (min.)
-1	1	1,1	p-p	7
1	2	4,4	Coa	13

Tabela 26: Valores experimentais realizados com o teste II: *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*, sistema circular I, NaCl 0,2% (p/v).

Replicatas	Vazão (ml/s)	Frequência (Hz)	T.C.	Tempo de Circulação (min.)	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	1	1	6,9	6,56	0,34
1	1	1	1	-1	6,9	6,63	0,27
1	1	1	-1	1	6,88	5,61	1,27
1	1	1	-1	-1	6,88	5,69	1,19
1	1	-1	1	1	6,11	6,01	0,1
1	1	-1	1	-1	6,11	6,04	0,07
1	1	-1	-1	1	6,3	5,66	0,64
1	1	-1	-1	-1	6,3	5,71	0,59
1	-1	1	1	1	6,46	6,23	0,23
1	-1	1	1	-1	6,46	6,31	0,15
1	-1	1	-1	1	6,91	5,4	1,51
1	-1	1	-1	-1	6,91	5,51	1,4
1	-1	-1	1	1	6,57	6,34	0,23
1	-1	-1	1	-1	6,57	6,41	0,16
1	-1	-1	-1	1	6,21	5,15	1,06
1	-1	-1	-1	-1	6,21	5,21	1
2	1	1	1	1	6,17	6,04	0,13
2	1	1	1	-1	6,17	6,11	0,06
2	1	1	-1	1	6,73	5,27	1,46
2	1	1	-1	-1	6,73	5,31	1,42
2	1	-1	1	1	6,35	6,12	0,23
2	1	-1	1	-1	6,35	6,28	0,07
2	1	-1	-1	1	6,32	5,29	1,03
2	1	-1	-1	-1	6,32	5,49	0,83
2	-1	1	1	1	6,3	6,07	0,23
2	-1	1	1	-1	6,3	6,12	0,18
2	-1	1	-1	1	6,64	5,24	1,4
2	-1	1	-1	-1	6,64	5,39	1,25
2	-1	-1	1	1	6,75	6,57	0,18
2	-1	-1	1	-1	6,75	6,61	0,14
2	-1	-1	-1	1	6,05	5,45	0,6
2	-1	-1	-1	-1	6,05	5,64	0,41

Onde:	Vazão	Freq.	T.C	Tempo de Circulação (min.)
-1	1	1,1	p-p	7
1	2	4,4	Coa	13

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_r$$

Tabela 27: Valores experimentais realizados em sistema circular II: suco de laranja, *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*, câmara de tratamento placa-placa, vazão 1 ml/s.

Replicatas	Freq. (Hz)	Nº de ciclos	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	6,14	4,43	1,71
1	1	-1	6,14	5,15	0,99
1	-1	1	6,06	4,52	1,54
1	-1	-1	6,06	5,11	0,95
1	0	0	6,11	4,53	1,58
1	0	0	6,11	4,47	1,64
1	0	0	6,11	4,51	1,6
2	1	1	6,15	4,39	1,76
2	1	-1	6,15	5,01	1,14
2	-1	1	6,17	4,57	1,6
2	-1	-1	6,17	5,11	1,06
2	0	0	6,15	4,52	1,63
2	0	0	6,15	4,57	1,58
2	0	0	6,15	4,56	1,59
Onde:	Freq. (Hz)	Nº de ciclos			
-1	3,6	4,2			
0	4,69	7,8			
1	5,8	11,4			

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f$$

Tabela 28: Valores experimentais realizados em sistema circular II: solução salina (NaCl 0,2% (p/v)), *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*, câmara de tratamento placa-placa, vazão 1 ml/s.

Replicatas	Freq. (Hz)	Nº de ciclos	Início: log(ufc/ml)	Final: log (ufc/ml)	NRD*
1	1	1	6,99	5,03	1,96
1	1	-1	6,99	5,51	1,48
1	-1	1	6,73	5,75	1,19
1	-1	-1	6,73	5,67	1,06
1	0	0	6,49	5,36	1,13
1	0	0	6,49	5,32	1,17
1	0	0	6,49	5,29	1,20
2	1	1	6,02	5,02	1,00
2	1	-1	6,02	5,49	0,53
2	-1	1	6,94	5,56	1,38
2	-1	-1	6,94	5,4	1,30
2	0	0	6,82	5,49	1,33
2	0	0	6,82	5,51	1,31
2	0	0	6,82	5,42	1,4
Onde:	Freq. (Hz)	Nº de ciclos			
-1	3,6	4,2			
0	4,69	7,8			
1	5,8	11,4			

*NRD: Número de redução decimal.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f$$

8. Referências Bibliográficas

- ÁLVAREZ, I., RASO, J., PALOP, A., SALA, F.J. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 55, p. 143 – 146, 2000.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G., **Nonthermal presentation of foods**. , 1ª edição, Editora Board, 1998, USA, p. 276.
- BRUHN, R.E.; PEDROW, P.D.; OLSEN, R.G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Electrical enviromental surroundings microbes exposed to pulsed eletric fields. **IEEE Transactions on Dieletrics and Electrical Insulation**, vol. 4, n. 6, p. 806 – 812, Dec. 1997.
- EVRENDILEK, G. A.; JIN, Z. T.; RUHLMAN, K.T.; QIU, X.; ZHANG, Q.H.; RICHTER, E.R. Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, vol. 1, p. 77 – 86, 2000.
- FRUNGEL, F.B. **A. High Speed Pulse Techonology**, New York: Academic Press, vol. 3, 1976.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L., Inactivation of microorganisms by electrohydraulic shock. **Applied Microbiology**. vol.15, p. 1031 - 1037, 1967.
- HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; YOSHIYAMA, K.; FUJIO, Y. Oscillatory comparede with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* Spores. **Journal of Food Science**, vol. 59, n. 1, p. 164 – 167, 1994a.

HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; YOSHIYAMA, K.; FUJIO, Y. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. **Journal of Food Science**, vol. 59, n. 1, p. 159 – 163, 1994b.

HAYAMIZU, M.; TENMA, T. and MIZUNO, A. Destruction of yeast cells by pulsed high voltage application. **Proc. Inst. Eletrosctat Jpn.** Vol.13, p. 322, 1989.

HO, S.Y.; MITTAL, G.S.; CROSS, J.D. Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. **Journal of Food Engineering**, vol. 31, n.1, p. 69 – 84, 1997.

JACOB, H.E.; FORSTER, W.; BERG, H. Microbiological implications of electric field effects II. Inactivation of yeast cells and repair of their cell envelope. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, vol. 21, p. 225 – 233, 1981.

JAYARAM, S.; CASTLE, G.S.P.; MARGARITIS, A. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. **Biotechnology and Bioengineering**, vol.40, n.11, p. 1412-1420, 1992.

JIA, M.Y.; ZHANG, Q.H.; MIN, B. Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. **Food Chemistry**. Vol. 65, n.4, p.445 – 451, Jun, 1999.

JIN, Z.T.; ZHANG, Q.H. Pulsed electric field inactivation of microorganisms and preservation of quality of cranberry juice. **Journal of Food Processing Preservation**, vol. 23, nº6, p. 481-497, 1999.

JONG, P. DE; HEESCH, E.J.M. VAN Review: Effect of pulsed electric fields on the quality of food products. **Milchwissenschaft**, vol. 53, n.1, p. 4-8, 1998.

- LIU, X.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G.W. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric field. **Journal of Food Safety (USA)**, vol. 16, n. 4, p. 287 – 299, 1997.
- McCREADY, In: NAGY, S.; SHAW, P.E.; VELDHUIS, M. K. **Citrus Science and Technology**, vol. 1, Wesport: AVI Publishing Company, 1977.
- MARTIN, O. ; ZHANG, Q.; CASTRO, A. J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Pulse electric fields of high voltage to preserve foods. Microbial and engineering aspects of the process. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, vol. 34, n. 1, p. 1 – 34, 1994.
- MIZUNO, A.; HORI, Y. Destruction of living cells by pulsed high-voltage application. **IEE – Transactions on Industry Applications**, vol. 24, n.3, p. 387 – 394, 1988.
- OHSHIMA, T.; SATO, K.; TERAUCHI, H.; SATO, M. Physical and chemical modifications of high-voltage pulse sterilization. **Journal of Electrostatics**, vol.42, n.1-2, p.159-166, 1997.
- PALANIAPRAN, S.; SASTRY, S.K. Effects of electricity on microorganisms: a review. **Journal of Food Processing and Preservation**. vol. 14, p. 393 – 414, 1990.
- POTHAKAMURY, U.R.; MONSALVE-GONZÁLEZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. **Revista Española de Ciência y Tecnología de Alimentos**, vol. 35, n.1, p. 101 – 107, 1995a

- POTHAKAMURY, U.R.; MONSALVE-GONZÁLEZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulses electric field technology. **Food Research International**, vol.28, n.2, p. 167 – 171, 1995b.
- QIN, B.L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G.; PEDROW, P.D.; OLSEN, R.G. Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. **IEE- Transactions on Industry Applications**, vol.34, n.1, p.43-50,1998.
- QIU, X., SHARMA, S., TUHELA, ., JIA,M., ZHANG, Q.H. An integrate PEF pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice. **American Society of Agricultural Engineers**. vol. 41, n.4, p. 1069 – 1074, 1998.
- REINA, L.D.; JIN, Z.T.; ZHANG, R.H.; YOUSEF, A . E. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. **Journal of Food Protection**, vol. 61, n. 9, p. 1203 – 1206, 1998.
- SAKURAUCHI, Y.; KONDO, E. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 54, p. 837, 1980
- SALE, A.J.H.; HAMILTON, W.A. Effects of high electric fields on microorganisms killing of bacteria and yeasts. **Biochimica Biophysica Acta** 148, p.781, 1967
- SATO, M.; TOKITA, K.; SADAKATA, M.; SAKAI, T.; NAKANISHI, K. Sterilization of microorganisms by a high-voltage, pulsed discharge under water. Japan: **International Chemical Engineering**, vol. 30, n.4, p. 695 – 698, 1990.
- SATO, M.; OHGIYAMA, T.; CLEMENTS, J.S. Formation of chemical species and their effects on microorganisms using a pulsed high-voltage discharge in water.

IEE- Transactions on Industry Applications, vol.32, n.1, p. 106-112, Jan.-Feb. 1996.

SHARMA, S.K., ZHANG, Q.H., CHISM, G.W. Development of a protein fortified fruit beverage and its quality when processed with pulsed electric field treatment. **Journal of Food Quality**, vol. 21, p. 459 – 473, 1998.

SIEBEL, J.F.F. **Microbiologia do processamento e caracterização das bactérias lácticas do suco de laranja**. Campinas, 1978. 102p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, J.A. **Tópicos da Tecnologia dos Alimentos**, 1º ed., Editora Varela, p. 230, 2000.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3ª ed., APHA, p. 1219, 1992.

VEGA-MERCADO, H., MARTÍN-BELLOSO, O., CHANG, F.J., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., SWANSON, B.G. Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields. **Journal Food Processing Preserving**. vol. 20, n.6, p. 501 – 510, 1997.

VEGA- MERCADO, H., BELLOSO-M. O., QIN, B.L., CHANG,F. J., NIETO-G., M.M., BARBOSA-CÁNOVAS., G.V., SWANSON, B.G. Nonthermal food preservation: Pulsed electric fields. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 8, p. 151 – 157, 1997

- WOOD., B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. The Lactic acid Bacteria. **The genera of lactic acid bacteria**. vol. 2, 1 ed., Blackie Academic & Professional, 1995.
- WOUTERS, P.C.; SMELT, J.P.P.M. Inactivation of microorganism with pulsed electric fields: potential for food preservation. **Food Biotechnology**, vol. 11, n. 3, p. 193 – 229, 1997
- YOKOYA , F., CANHOS, V.P., **Microbiologia de processos e produtos alimentícios**. vol 2, 476p, 1976.
- ZHANG, Q.; CHANG, F.J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Inactivation of microorganisms in a semisolid model food using high voltage pulsed electric fields. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, vol. 27, n. 6, p. 538 – 543, 1994a.
- ZHANG, Q.; MONSALVE-GONZÁLEZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. **Transactions. ASAE**, vol. 37, n. 2, p. 581 – 587, 1994b.
- ZHANG, Q.; QIN, B.L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. **Journal of Food Processing and Preservation (USA)**, vol. 19, n. 2, p. 103 – 118, 1995.



ERRATA

- Na **página 30**, os parâmetros de frequência utilizados no Teste II foram os mesmo do Teste I que foram 1,1 e 4,4 Hz.
- Na **página 42**, no quarto item, não foi variado a frequência de valores 3,6 e 5,8 Hz, e sim de valores 1,1 e 4,4 Hz.