



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

**EFEITOS DA ESTERILIZAÇÃO E DE TRATAMENTOS NÃO  
TÉRMICOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-  
QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO PURÊ DE ABÓBORA  
(*Cucurbita moschata*)**

Florianópolis/SC

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira dos Santos Júnior, Luís Carlos  
Efeitos da esterilização e de tratamentos não térmicos  
sobre as características físico-químicas e microbiológicas do  
purê de abóbora (*Cucurbita moschata*) / Luís Carlos Oliveira  
dos Santos Júnior ; orientadora, Edna Regina Amante -  
Florianópolis, SC, 2016.  
230 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. tratamento não térmico.  
3. campo elétrico pulsado. 4. alta pressão com dióxido de  
carbono supercrítico. 5. plasma frio. I. Amante, Edna  
Regina. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III.  
Título.





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

Luís Carlos Oliveira dos Santos Júnior

**EFEITOS DA ESTERILIZAÇÃO E DE TRATAMENTOS NÃO  
TÉRMICOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-  
QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO PURÊ DE ABÓBORA  
(*Cucurbita moschata*)**

Tese de doutorado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do título de Doutor em  
Engenharia de Alimentos

Área de concentração: Desenvolvimento  
de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Edna Regina  
Amante

Florianópolis/SC  
2016



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar em momentos difíceis.

A minha orientadora, professora Edna, pela confiança e pelos conselhos ao longo de todo o trabalho, por ser a principal responsável pela realização deste projeto.

Aos professores/alunos da equipe do Dr. Dietrich Knorr, da Technische Universität Berlin, por terem me recebido muito bem e auxiliado em várias situações na etapa de pesquisa com campo elétrico pulsado, em especial ao Dipl.-Ing. Matthias Schulz por ter acompanhado todos os passos desta etapa.

A valiosa colaboração e confiança do professor Dr. José Vladimir Oliveira na etapa de uso de alta pressão supercrítica.

A colaboração e confiança da professora Dra. Elisa Moecke por disponibilizar o plasma e o espaço destinado pela Unisul para que pudéssemos realizar nossos experimentos.

A professora Dra. Deise Baggio por colaborar com as análises microbiológicas, bem como, ceder o laboratório de microbiologia para que pudéssemos realizar os experimentos.

Ao professor João de Deus Medeiros pela colaboração nas microscopias óticas.

A minha família, em especial aos meus pais, Luís e Judith, minhas irmãs Carla e Magda, meu irmão, Cláudio, minha sobrinha, Mariana, pelo apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos que me deram força e estiveram ao meu lado nesta caminhada, em especial, Rosiane, Luis Fernando e Raquel, sempre disponíveis quando precisei.

Aos amigos de Carazinho, que sempre me apoiaram e me incentivaram a não desistir e mesmo que eu estivesse pouco presente, a amizade continuou a mesma.

Aos colegas de pós-graduação, desde o primeiro dia de aula, sempre parceiros para bons e maus momentos (principalmente em bons momentos). Levo muitas amizades para sempre e agradeço por ter encontrado pessoas assim.

Aos colegas de LFH que foram sempre gentis e amigáveis e contribuíram para este trabalho, IC's e estagiários, em especial à colega Ana Carolina Aquino que auxiliou na execução de várias análises do trabalho e a Juliane, que foi grande conselheira.

Aos colegas de Latesq que colaboraram para a realização do experimento em alta pressão, em especial Miriam, Douglas e Josamaique, sempre prestativos.

Aos alunos do Laboratório de Plasma da Unisul que foram prestativos na realização desta etapa.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade, vivência e conhecimento repassado.

Ao professor Dr. Marco di Luccio sempre prestativo frente à coordenação da Pós-Graduação e auxiliando na parte burocrática.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.



Resumo da Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

**Efeitos da esterilização e de tratamentos não térmicos sobre as características físico-químicas e microbiológicas do purê de abóbora (*Cucurbita moschata*)**

Luís Carlos Oliveira dos Santos Júnior

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Regina Amante

Este trabalho estudou o processamento do purê de abóbora por três tecnologias não térmicas, como alternativas ao tratamento térmico no qual o purê de abóbora foi submetido à esterilização em autoclave a 121 °C, em três intervalos de tempo para verificar suas características físico-químicas, bem como identificar os compostos voláteis do *headspace*, em embalagens *pouch stand up*. No processamento em campo elétrico pulsado (CEP), os experimentos foram realizados usando um sistema em batelada com diferentes campos de força de até 35 kV, largura de pulso entre 0,8 e 1,0  $\mu$ s, frequência de 3 Hz, a 20 °C e 40 °C, para avaliar a inativação de *E. coli* em suco e néctar de abóbora e suas alterações físico-químicas. No processamento em alta pressão com dióxido de carbono supercrítico (APDC), os experimentos foram realizados em escala laboratorial inicialmente de acordo com um planejamento 2<sup>2</sup> para avaliar a condição de pressão e a proporção entre volume de amostra e de CO<sub>2</sub> isotermicamente (a 32 °C) ideais para inativar *E. coli* em níveis máximos. A condição a qual houve maior influência na redução da contagem microbiana foi selecionada para a realização de uma cinética de até 8 h, observando em intervalos de 1 h o número de bactérias sobreviventes após o processo. Nas amostras nas quais houve maior inativação de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ), análises físico-químicas e de microscopia ótica foram realizadas para avaliar o impacto da tecnologia APDC no purê de abóbora em comparação à abóbora *in natura* e ao purê não esterilizado. O terceiro tratamento não térmico ocorreu em plasma frio por descarga corona com argônio (Ar) como gás do processo no qual foi avaliado o efeito desta tecnologia sobre a inativação microbiana (*E. coli*), as características físico-químicas e

parâmetros de cor em decorrência do tempo de tratamento. O tratamento térmico em autoclave a 121 °C nos tempos de 10, 20 e 30 minutos foi eficiente na eliminação da carga microbiana das amostras ( $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g) e também induziu a redução de pH e a elevação de acidez titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST) e carotenoides totais. Os compostos identificados no *headspace* após esterilização em autoclave foram álcoois, aldeídos, alcenos, cetonas, ésteres, terpenos e éteres, muitos deles, compostos aromáticos que caracterizam a abóbora e produtos da degradação de carotenoides e ácidos que justificam mudanças físico-químicas após o processamento. Os resultados do tratamento por CEP mostram que a carga microbiana foi reduzida moderadamente em todos os experimentos, com um máximo de aproximadamente 3 ciclos log. A contagem microbiana no tratamento APDC apresentou redução moderada em todos os experimentos com um máximo de redução de aproximadamente 3,17 ciclos log em 8 h de processo a 275 bar (2750 MPa). A microscopia ótica mostrou que o processo APDC preservou a estrutura celular e a integridade da parede celular do purê de abóbora, sendo apenas o amido danificado em função da etapa anterior de cozimento. A tecnologia de plasma frio com descarga corona para inativação de *E. coli* se mostrou promissora, apresentando a maior média de redução em comparação com CEP e APDC, sendo de cerca de 3,62 ciclos log para 20 min de tratamento. A cinética de inativação apresentou uma tendência de maior redução com o tempo. As características físico-químicas, indicam que o plasma induz à redução do pH do meio, porém há indicativas de que os gases do processo desempenham um papel importante ao reagirem com o meio e produzem espécies reativas. O plasma frio reduziu o teor de carotenoides totais dos purês de abóbora e quanto à cor, o parâmetro  $a^*$  foi o que apresentou maior redução. As tecnologias não térmicas estudadas para o processamento do purê de abóbora se apresentaram promissoras para garantir segurança microbiológica e qualitativa. Porém, em função da diversidade de parâmetros envolvidos nestas tecnologias emergentes, muitos estudos avaliando o impacto das variáveis dos processos ou a combinação delas se fazem necessários para poder ampliar estes processos de uma escala laboratorial para uma planta piloto industrial.

**Palavras-chave:** purê de abóbora, esterilização, tratamento não térmico, campo elétrico pulsado, alta pressão com CO<sub>2</sub> supercrítico, plasma frio.

Summary of Doctor's thesis submitted to the Graduate Program in Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), as part of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering.

**Effects of the sterilization and non-thermal treatments on microbiological and physicochemical characteristics of the pumpkin (*Cucurbita moschata*) puree.**

Luís Carlos Oliveira dos Santos Júnior

**Advisor:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Regina Amante

This work aimed to study the pumpkin puree processing by three non-thermal technologies as alternatives to heat treatment wherein the pumpkin puree was subjected to sterilization by autoclaving at 122 °C in three intervals to check their physicochemical characteristics and identify the volatile compounds of headspace in stand up pouch packaging. In pulsed electric field process (PEF), experiments were performed using a batch system with different strength fields up to 35 kV, pulse width between 0.8 and 1.0 μs, frequency of 3 Hz, 20 °C and 40 °C, to evaluate the *E. coli* inactivation in pumpkin juice and nectar and their physicochemical changes. In the high-pressure processing with supercritical carbon dioxide (APDC) the experiments were performed on lab scale initially according to 2<sup>2</sup> planning to evaluate the pressure condition and the ratio between volume sample and CO<sub>2</sub> isothermally (32 °C) ideals to inactivate *E. coli* up to maximum levels. The condition in which there was a higher effect in reducing microbial counts were selected for performing a kinetics up to 8 h, with observation on 1 h intervals the number of surviving bacteria after process. Samples in which there was a higher inactivation of *E. coli* (log N/N<sub>0</sub>), physicochemical analysis and optical microscopy were performed to evaluate the impact of APDC technology in pumpkin puree compared to the pumpkin in nature and non-sterile pumpkin puree. The third non-thermal treatment occurred in cold plasma corona discharge with argon (Ar) as the process gas wherein the pumpkin puree was evaluated for this technology effect on microbial inactivation (*E. coli*), physicochemical characteristics and color parameters as a result of treatment time which was 5, 10, 15 and 20 minutes. The heat treatment in autoclave at 121 °C in 10, 20 and 30 minutes was effective in eliminating microbial load of the sample (< 1.0×10<sup>4</sup> CFU/g) and also

induced the decrease of pH and increase of titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS) and total carotenoids. The compounds identified in the headspace after autoclaving were alcohols, aldehydes, alkenes, ketones, esters, ethers and terpenes, many of them, aromatic compounds that characterize pumpkin and carotenoid degradation products and acids that justify physicochemical changes after processing. Results of CEP treatment show that the microbial load was decreased moderately in all experiments, with a maximum of about 3 log cycles. The microbial count in APDC treatment showed moderate reduction in all experiments with maximum reduction of about 3.17 log cycles in 8 h of process at 275 bar (2750 MPa). Optical microscopy showed that APDC process preserved cellular structure and the integrity of the pumpkin puree cell wall with only starch damaged due to baking previous step. Cold plasma corona discharge technology to inactivate *E. coli* proved to be promising, showing the highest average reduction compared to CEP and APDC process, being about 3.62 log cycles for 20 min of treatment. The inactivation kinetics showed a tendency of higher decrease with time. Physicochemical characteristics indicate that plasma induces decrease of pH, however there is indicative that process gases have an important role to react with the environment and produce reactive species. Cold plasma reduced the total carotenoid content of pumpkin purees and in color, the parameter  $a^*$  showed the greatest reduction. Non-thermal technologies studied for pumpkin puree processing have proved promising to ensure microbiological and qualitative safety. However, due to the diversity of the parameters involved in these emerging technologies, many studies evaluating the impact of the variables of the processes or combination of them, are necessary in order to expand these processes from a lab scale to an industrial pilot plant system.

**Keywords:** pumpkin puree, sterilization, non-thermal treatment, pulsed electric field, high pressure supercritical CO<sub>2</sub>, cold plasma.

*“O impossível é apenas uma grande palavra usada por gente fraca, que prefere viver no mundo como ele está, em vez de usar o poder que tem para mudá-lo, melhorá-lo. Impossível não é um fato. É uma opinião. Impossível não é uma declaração. É um desafio. Impossível é hipotético. Impossível é temporário. O impossível não existe.”*

**Muhammad Ali**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Organograma do documento da tese. ....	28
<b>Figura 2</b> - Abóbora de pescoço ou “menina brasileira” ( <i>Cucurbita moschata</i> ) e seus cortes transversais. ....	35
<b>Figura 3</b> - Purê de abóbora. ....	37
<b>Figura 4</b> - Fluxograma do processamento do purê de abóbora baseado na proposta de Provesi (2010). ....	39
<b>Figura 5</b> - Frasco hermético para SPME contendo amostra sólida (S) e o <i>headspace</i> (G) contendo os compostos voláteis da matriz alimentícia. ....	45
<b>Figura 6</b> - Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm); (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 $\mu\text{m}$ de espessura. ....	46
<b>Figura 7</b> - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG. ....	47
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática do mecanismo de permeabilização da membrana por forças eletro-compressivas induzidas por um campo elétrico externo. O aumento da intensidade do tratamento levará a formação de largos e irreversíveis poros na membrana. E = força do campo elétrico (V/cm). ....	57
<b>Figura 9</b> - Diagrama esquemático de sistema de processamento contínuo por meio de aplicação de CEP. ....	67
<b>Figura 10</b> - Configurações de câmaras de tratamento para CEP contínuo: a) placas paralelas; b) coaxial e c) colinear. ....	70
<b>Figura 11</b> - Exposição de células biológicas a um campo elétrico e aplicações em processamentos de alimentos, biotecnologia e resíduos com a força de campo elétrico típica e energias requeridas de aplicação. ....	71
<b>Figura 12</b> - Diagrama pressão vs. temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição da região supercrítica para CO <sub>2</sub> : P <sub>c</sub> (pressão crítica) e T <sub>c</sub> (temperatura crítica). ....	75
<b>Figura 13</b> - (a) Variação de densidade do CO <sub>2</sub> puro a 35 °C; (b) Representação da variação a partir do equilíbrio entre gás e líquido	

( $T < T_c$ ) para fluido supercrítico ( $T \geq T_c$ ), em que a substância é aquecida até sua temperatura crítica ( $T_c$ ) na pressão acima de $p_c$ . .....	76
<b>Figura 14</b> - Esquema de unidade de alta pressão com sistema em batelada. ....	78
<b>Figura 15</b> - Esquema de uma unidade de sistema semi-contínuo. ....	79
<b>Figura 16</b> - Exemplo de unidade de alta pressão em sistema contínuo por Sims e Estigarribia. ....	80
<b>Figura 17</b> - Esquema de unidade de alta pressão em sistema contínuo desenvolvido pela <i>Praxair Co.</i> .....	80
<b>Figura 18</b> - Configurações esquemáticas de diferentes fontes de plasma à pressão atmosférica: (a) jatos de plasma em pressão atmosférica; (b) descargas em barreira dielétrica (DBD, configuração plana); (c) flâmula de descarga corona (configuração ponta-plano); (d) autônoma através da câmara com descarga de micro-ondas em movimento.....	88
<b>Figura 19</b> - Fluxograma de locais onde foram realizadas as etapas da pesquisa em purê de abóbora. ....	100
<b>Figura 20</b> - Modulador de pulsos da câmara de tratamento de CEP. .	110
<b>Figura 21</b> - Câmara de tratamento com sensor de ajuste de temperatura interna. ....	111
<b>Figura 22</b> - Diagrama esquemático do aparato experimental de APDC utilizado no processamento do purê de abóbora.....	113
<b>Figura 23</b> - Base do reator de plasma (parte inferior) com sustentação de teflon e tubo cilíndrico de quartzo. ....	120
<b>Figura 24</b> - Reator de plasma com parte inferior e superior encaixada com amostra sob agitação e conexão de gás de arraste em um dos septos. ....	120
<b>Figura 25</b> - Reator de plasma em ação sobre purê de abóbora.....	121
<b>Figura 26</b> - Comparação da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de <i>headspace</i> /SPME, para as diferentes amostras (PNE, PE-10, PE-20 e P-30) de abóbora. ....	131
<b>Figura 27</b> - Efeito do CEP sobre a contagem de <i>E. coli</i> ( $\log N/N_0$ ) em 100% suco de abóbora (Experimento 1) em função da energia específica $W_{\text{específico calculado}}$ ( $J/g$ ) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 ( $\square$ ), 18000 ( $\circ$ ), 22000 ( $\Delta$ ), 26000 ( $\diamond$ ) e 30,000	



(×) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C. .... 134

**Figura 28** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* (log N/N<sub>0</sub>) em néctar de abóbora (70:30 suco:água destilada) (Experimento 2) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 13000 (□), 18000 (○), 23500 (Δ), 27000 (◇) e 30,000 (×) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C. .... 137

**Figura 29** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* (log N/N<sub>0</sub>) em néctar de abóbora (70:30 suco:água destilada filtrada) (Experimento 3) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 (□), 18500 (○), 22500 (Δ), 26000 (◇), 30000 (■) e 34000 (●) (V/cm). Neste teste, τ foi 1 μs. Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C. .... 138

**Figura 30** - Efeito do CEP sobre contagem de *E. coli* (log N/N<sub>0</sub>) em néctar de abóbora (70:30 suco:água destilada filtrada) (Experimento 4) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 (□), 18500 (○), 22500 (Δ), 26000 (◇), 30000 (■) e 34000 (●) (V/cm). Neste teste, τ foi 1 μs. Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C. .... 139

**Figura 31** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* (log N/N<sub>0</sub>) em 100 % suco de abóbora (Experimento 5) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 (□), 18500 (○), 22500 (Δ), 26000 (◇), 30000 (×) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C. .... 140

**Figura 32** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* (log N/N<sub>0</sub>) em 100% de suco de abóbora (Experimento 6) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 (□), 18500 (○), 22500 (Δ), 26000 (◇), 30000 (×) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 40 °C. .... 141

**Figura 33** - Efeito do tratamento por APDC sobre a inativação de *E. coli* em purê de abóbora sob pressão de 275 bar, 32 °C e razão (v CO<sub>2</sub> / v purê de abóbora) 1:1 em função do tempo. .... 151  
..... 151

<b>Figura 34</b> - Células do parênquima com amiloplastos intactos na matéria prima íntegra (abóbora <i>in natura</i> ) aumentada 400 ×. Seta: elementos de vasos (xilema). .....	155
<b>Figura 35</b> - (A), (B), (C), (D), (E) e (F): Células do parênquima com amiloplastos intactos na matéria prima íntegra (abóbora <i>in natura</i> ) aumentada 400 ×.....	156
<b>Figura 36</b> - Purê de abóbora após processo de APDC aumentado 400 ×: pequenas deformações nas paredes (A) e ruptura dos grânulos de amido (B).....	157
<b>Figura 37</b> - (A), (B), (C), (D) e (E): purê de abóbora imediatamente após cozimento, aumentado 400 ×. Seta em (C): elemento de tubo crivado (floema).....	157
<b>Figura 38</b> - (A) e (B): purê de abóbora esterilizado aumentado 400 ×. ....	158
<b>Figura 39</b> - Efeito do plasma frio sobre a contagem de <i>E. coli</i> com descarga corona em função do tempo de tratamento em purê de abóbora. Resultados são médias baseadas nos dados de três experimentos em temperatura ambiente (25 °C) e pressão atmosférica e os desvios são representados pelas barras de erros. ....	165

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição química da abóbora ( <i>Cucurbita moschata</i> ). ...	36
<b>Tabela 2</b> - Guia de seleção de fibras de SPME comercialmente disponíveis.....	44
<b>Tabela 3</b> - Condições operacionais para a aplicação de CEP no suco e néctar de abóbora, obtidos a partir do purê de abóbora. ....	112
<b>Tabela 4</b> - Matriz do delineamento experimental com os níveis das variáveis independentes para avaliação da inativação de <i>E. coli</i> por APDC em 2 horas de tratamento, em purê de abóbora. ....	118
<b>Tabela 5</b> - Características físico-químicas da abóbora <i>in natura</i> (AIN), purê de abóbora sem esterilização (PNE) e purês de abóbora esterilizados a 121 °C nos tempos 10 min (PE-10), 20 min (PE-20) e 30 min (PE-30). ....	123
<b>Tabela 6</b> - Caracterização da matéria prima e dos purês de abóbora quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT), açúcares redutores totais (ART), carotenoides totais e umidade. ....	125
<b>Tabela 7</b> - Principais compostos voláteis identificados por análise de <i>headspace</i> /SPME para as amostras de purê de abóbora não esterilizado (PNE). ....	128
<b>Tabela 8</b> - Principais compostos voláteis identificados por análise de <i>headspace</i> /SPME para as amostras de purê de abóbora esterilizado (PE-10).....	129
<b>Tabela 9</b> - Principais compostos voláteis identificados por análise de <i>headspace</i> /SPME para as amostras de purê de abóbora esterilizado (PE-20).....	129
<b>Tabela 10</b> - Principais compostos voláteis identificados por análise de <i>headspace</i> /SPME para as amostras de purê de abóbora esterilizado (PE-30).....	130
<b>Tabela 11</b> - Valores para pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis totais nas amostras de suco de abóbora (100%) e do néctar de abóbora (70% do suco de abóbora + 30% de água destilada). ....	132
<b>Tabela 12</b> - Tempo de redução decimal D (s) para a força de campo de 30000 V/cm. ....	142

<b>Tabela 13</b> - Caracterização da matéria prima e dos purês de abóbora quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT), açúcares redutores totais (ART), carotenoides totais e umidade.....	145
<b>Tabela 14</b> - Efeito do tratamento via APDC sobre <i>E. coli</i> em purê de abóbora a 275 bar de pressão e razão ( $m_{CO_2} / m_{\text{purê de abóbora}}$ ) 1:1 em função do tempo de tratamento (t). Resultados são médias baseadas em dados de três experimentos a 32 °C e desvios padrão são apresentados com o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	151
<b>Tabela 15</b> - Efeito do tratamento em plasma frio sobre o pH, acidez titulável (AT), teor de sólidos solúveis (TSS) e carotenoides totais das amostras de abóbora <i>in natura</i> , purê de abóbora esterilizado e do purê de abóbora esterilizado após processo de plasma frio por 5 (Plasma 5), 10 (Plasma 10), 15 (Plasma 15) e 20 minutos (Plasma 20). .....	159
<b>Tabela 16</b> - Parâmetros de cor CIELab das amostras de abóbora <i>in natura</i> , purê de abóbora esterilizado e purê de abóbora esterilizado após processo de plasma frio por 5 (Plasma 5), 10 (Plasma 10), 15 (Plasma 15) e 20 minutos (Plasma 20). O valor foi calculado com base na média de 5 leituras de cada parâmetro. ....	159
<b>Tabela 17</b> - Efeito do plasma frio sobre a inativação de <i>E. coli</i> em purê de abóbora, com descarga corona em pressão atmosférica em função do tempo de tratamento (t). Resultados são médias baseadas em dados de três experimentos à temperatura ambiente (25 °C) e desvios são apresentados com o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....	164

## NOMENCLATURA

APDC	Alta pressão com dióxido de carbono
CEP	Campo elétrico pulsado
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
SCF	fluido supercrítico
T <sub>c</sub>	temperatura crítica em °C
P <sub>c</sub>	pressão crítica em bar
ANOVA	Análise de variância
T	Temperatura em °C
t	Tempo em horas
E <sub>a</sub>	energia de ativação em cal.mol <sup>-1</sup>
μL	microlitros
mL	mililitros
mm	milímetros
μm	micrômetros
nm	nanômetros
g	grama
kcal	quilocalorias
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mg	miligramas
μg	microgramas
Pa	pascal
AT	acidez titulável
TSS	teor de sólidos solúveis
CG	cromatografia gasosa
SPME	microextração em fase sólida
EM	Espectrometria de massa
kPa	quilopascal
min	minutos
k	constante de reação
D	taxa de redução decimal (s ou min)
z	sensitividade da temperatura (°C)
K	Kelvin
s	segundos
HTST	<i>high temperature short time</i>

UHT	<i>ultra high temperature</i>
UV	ultravioleta
APH	alta pressão hidrostática
kV	quilovolts
cm	centímetros
ms	milissegundos
V	voltagem (V)
J	joule
C	capacitância (F)
$\tau$	largura do pulso (s)
$\sigma$	condutividade elétrica (S/m)
A	área da superfície (m <sup>2</sup> )
d	distância (m)
Q	energia estocada
W <sub>pulso</sub>	energia específica aplicada
W <sub>específico</sub>	energia específica aplicada para decaimento exponencial
U	carga de voltagem
I	amperagem
E	força de campo
f	taxa de repetição
ṁ	vazão mássica
DBD	descargas em barreira dielétrica
DC	corrente contínua
Ar	argônio
RNS	espécie reativa do nitrogênio
ROS	espécie reativa do oxigênio
rcf	força centrífuga relativa
AIN	abóbora <i>in natura</i>
PNE	purê não esterilizado
PE	purê esterilizado
TRS	teor de açúcares redutores
eV	eletrovolt
APHA	<i>American Public Health Association</i>
UFC	unidade formadoras de colônia (mL ou g)
AP	água peptonada
N	número de micro-organismos sobreviventes no tempo t
N <sub>0</sub>	população inicial de micro-organismos
W <sub>específico calculado</sub>	energia específica aplicada calculada
n	número de pulsos

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO .....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>33</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS DA ABÓBORA.....	33
<b>3.1.1 Purê de abóbora.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2 Carotenoides.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.3 Compostos voláteis do purê de abóbora no <i>headspace</i> da embalagem.....</b>	<b>42</b>
3.2 TRATAMENTO TÉRMICO EM ALIMENTOS .....	47
3.3 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO EM ALIMENTOS.....	53
<b>3.3.1 Tratamento em campo elétrico pulsado (CEP) .....</b>	<b>56</b>
3.3.1.1 Parâmetros do processo .....	61
3.3.1.2 Fatores do meio de tratamento .....	64
3.3.1.3 Equipamento utilizado para CEP.....	67
3.3.1.4 Aplicações e objetivos do CEP.....	71
<b>3.3.2 Tratamento em alta pressão com dióxido de carbono supercrítico (APDC) .....</b>	<b>73</b>
3.3.2.1 Fluidos supercríticos.....	74
3.3.2.2 Sistemas de alta pressão para inativação microbiana ...	77
3.3.2.3 Utilização de alta pressão com CO <sub>2</sub> para inativação de micro-organismos .....	80
<b>3.3.3 Tratamento em plasma frio .....</b>	<b>86</b>
3.3.3.1 Impacto do plasma na superfície de alimentos .....	91

3.3.3.2 Impacto do plasma nas propriedades e componentes de alimentos .....	93
3.3.3.3 Impacto do plasma em interações com líquidos.....	94

**CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS..... 99**

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA .....	100
4.2 PREPARO E PROCESSAMENTO DO PURÊ DE ABÓBORA.....	101
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PURÊ DE ABÓBORA .....	102
<b>4.3.1 Condições de processamento do purê de abóbora para análises.....</b>	<b>103</b>
<b>4.3.2 Análises físico-químicas .....</b>	<b>103</b>
4.3.2.1 Determinação de pH.....	104
4.3.2.2 Teor de sólidos solúveis totais (TSS).....	104
4.3.2.3 Acidez titulável (AT) .....	104
4.3.2.4 Carotenoides totais.....	105
4.3.2.5 Análise instrumental de cor.....	105
4.3.2.6 Análise da condutividade elétrica .....	105
4.3.2.7 Análise de açúcares redutores totais (ART).....	105
4.3.2.8 Determinação de umidade.....	106
<b>4.3.3 Análise de compostos voláteis no headspace por SPME.....</b>	<b>106</b>
<b>4.3.4 Análises microbiológicas.....</b>	<b>107</b>
<b>4.3.5 Microscopia ótica.....</b>	<b>109</b>
4.4 TRATAMENTO EM CAMPO ELÉTRICO PULSADO (CEP).....	109
4.5 TRATAMENTO EM ALTA PRESSÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO (APDC).....	112
4.6 TRATAMENTO EM PLASMA FRIO.....	118
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	122

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 123**

5.1 ESTERILIZAÇÃO DO PURÊ DE ABÓBORA EM AUTOCLAVE.....	123
--	-----



<b>5.1.1 Compostos voláteis do purê de abóbora no headspace da embalagem pouch .....</b>	<b>127</b>
5.2 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO DO PURÊ DE ABÓBORA UTILIZANDO CEP .....	132
<b>5.2.1 pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis totais .....</b>	<b>132</b>
<b>5.2.2 Inativação de micro-organismos por CEP.....</b>	<b>133</b>
5.3 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO DO PURÊ DE ABÓBORA UTILIZANDO APDC .....	144
<b>5.3.1 Efeito da APDC sobre as características físico-químicas do purê de abóbora.....</b>	<b>144</b>
<b>5.3.2 Efeito da APDC na inativação de <i>E. coli</i> em purê de abóbora .....</b>	<b>150</b>
<b>5.3.3 Microscopia ótica.....</b>	<b>155</b>
5.4 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO DO PURÊ DE ABÓBORA UTILIZANDO PLASMA FRIO .....	158
<b>5.4.1 Efeito do plasma frio nas características físico-químicas do purê de abóbora.....</b>	<b>158</b>
<b>5.4.2 Efeito do plasma frio na inativação de <i>E. coli</i> em purê de abóbora .....</b>	<b>164</b>
<b>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>171</b>
6.1 CONCLUSÕES .....	171
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	172
<b>CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>173</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>223</b>



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Efeitos da esterilização e de tratamentos não térmicos sobre as características físico-químicas e microbiológicas do purê de abóbora (*Cucurbita moschata*).

### Por quê?

1. A abóbora é uma matéria prima de pouca valorização agroindustrial e grande produção no Brasil.
2. A abóbora é rica em compostos benéficos à saúde, como os carotenoides
3. O purê de abóbora é uma alternativa para o aproveitamento da matéria prima com simples processamento e praticidade de uso
4. O processamento térmico visa eliminar a carga microbiana mas pode alterar a composição físico-química da matriz e diminuir o seu valor nutricional
5. As tecnologias não térmicas de processamento são emergentes e necessitam de maiores estudos para verificar o impacto sobre a matriz alimentar

### Quem já fez?

1. São poucos os trabalhos utilizando o purê de abóbora como matéria prima para avaliar o impacto de processamento térmico e não térmico sobre as suas propriedades físico-químicas e identificação de compostos voláteis
2. Não constam na literatura trabalhos avaliando campo elétrico pulsado, alta pressão com dióxido de carbono supercrítico e plasma frio como tecnologias para inativação de micro-organismos em purê de abóbora

### Hipóteses?

1. É possível processar o purê de abóbora evitando degradação de compostos e garantindo segurança microbiológica?
2. As tecnologias emergentes com emprego de baixas temperaturas são eficazes em uma matriz alimentar como o purê de abóbora?

### Métodos experimentais

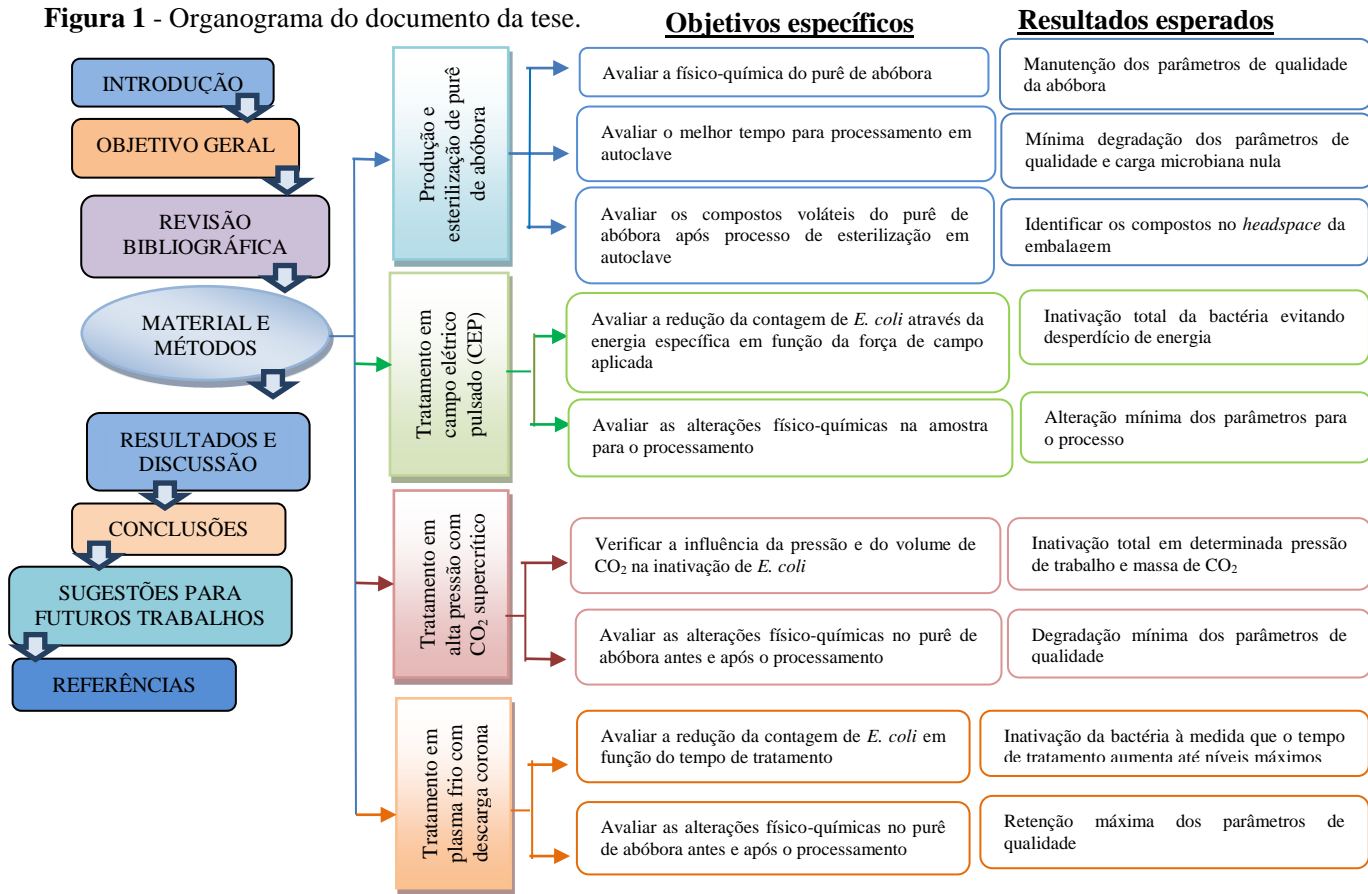
1. Determinação da condição ideal de processamento do purê em autoclave
2. Caracterização físico-química do purê de abóbora antes e após processamento
3. Identificação dos principais compostos voláteis no *headspace* por CG-MS por SPME
4. Inativação microbiana através de campo elétrico pulsado em escala laboratorial
5. Inativação microbiana por alta pressão com dióxido de carbono supercrítico em escala laboratorial
6. Inativação microbiana por plasma frio descarga corona em reator de escala laboratorial

### Respostas

1. Determinar condições experimentais que evitem degradação da matriz alimentar
2. Avaliar o comportamento da matriz alimentar em relação à exposição em diferentes processos tecnológicos
3. Verificar a eficiência de tecnologias não térmicas frente à inativação microbiana e às alterações que provocam na matriz alimentar

Este documento será apresentado conforme esquema apresentado na Figura 1.

**Figura 1** - Organograma do documento da tese.



## Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

---

Os produtos de fácil preparo têm preferência crescente no atual cenário mundial do consumo de alimentos, na indústria, em restaurantes e nas residências. A demanda está acompanhada pela exigência por produtos cujo processamento resulte em perdas mínimas das propriedades sensoriais e nutricionais. A crescente oferta e a preferência pelas polpas de frutas representam um importante exemplo deste cenário, surgido principalmente da conscientização dos consumidores quanto aos benefícios da adoção de produtos naturais e seguros em sua alimentação diária. Comparativamente às frutas *in natura*, as polpas de frutas apresentam maior valor agregado, bem como são referidas como alimentos saudáveis ou naturais, por representarem alternativa para a produção de sucos dos mais diferentes sabores, principalmente considerando a diversidade de frutas disponíveis nos países tropicais. No entanto, esta não é a realidade para matérias primas pouco valorizadas, a exemplo da abóbora.

Do ponto de vista econômico, as abóboras são importantes, pois fazem parte da alimentação básica das populações de várias regiões do país. No Brasil, a abóbora ocupa o 7º lugar em volume de produção entre as hortaliças. O agricultor recebe, em média, R\$ 0,47/kg de abóbora, apresentando-se como matéria prima de baixo custo para a produção de doces ou preparo de refeições. Existem diversas variedades de abóbora e para aumentar o aproveitamento dessa matéria prima, o processamento na forma de purê se apresenta como um grande potencial, o qual geralmente atinge maior vida útil e menor volume e custo de acondicionamento, armazenamento e transporte (IBGE, 2008; NASCIMENTO, 2006).

O teor de carotenoides pode representar uma importante justificativa para novos produtos à base de abóbora. O estudo dos carotenoides da abóbora se destaca pela importância na alimentação humana como uma das principais fontes de vitamina A, pela sua ação antioxidante e fortalecimento do sistema imunológico, o qual se relaciona à diminuição do risco de doenças degenerativas (AMARIZ et al., 2009). No entanto, as características desta matéria prima, com pH na faixa de risco para micro-organismos patogênicos (> 4,5), bem como a disponibilidade de nutrientes, principalmente carboidratos solúveis, contrastam com as perspectivas de praticidade do purê de abóbora, por exemplo, exigindo cuidados adicionais.

Estudos com processamento de abóboras são escassos e tipicamente utilizam o processamento térmico. Em um trabalho pioneiro realizado por Provesi (2010), que desenvolveu um purê de abóbora e estudou a estabilidade dos carotenoides no tratamento térmico e durante a estocagem em temperatura ambiente, o autor relata que a etapa de cozimento é um importante fator a ser considerado e pode ser responsável pela diminuição da concentração de compostos benéficos, como os carotenoides.

Em função disso, a manutenção de atributos sensoriais e nutricionais tem sido o grande desafio no processamento deste tipo de matéria em termos industriais. Diversos fatores são responsáveis pela degradação de cor e pigmentos durante o processamento térmico. As abóboras não são somente ricas em carotenoides, minerais, vitaminas e fibras, mas também contêm outras substâncias benéficas à saúde como fenólicos fitoquímicos. Como a aparência é o atributo de qualidade mais importante por consumidores quando vão às compras, excessiva descoloração causada durante o processamento pode tornar o alimento não comercializável (MARTY et al., 1988; SPEEK et al., 1988; GONZÁLEZ et al., 2001; MASKAN, 2001; DUTTA et al., 2006; GLIEMMO et al., 2009; PROVESI et al., 2011).

Alternativamente aos processos térmicos, técnicas de processamento não térmicas como campo elétrico pulsado (CEP), alta pressão com dióxido de carbono supercrítico (APDC) e plasma frio podem ser aplicadas para controlar a carga de bactérias deteriorantes ou patogênicas com o mínimo de perda do conteúdo nutricional. Estas tecnologias são consideradas emergentes na produção de alimentos, carecem de dados para aplicação em escala industrial, mas são promissoras com o intuito de garantir a segurança e manutenção da qualidade do produto processado.

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi estudar o efeito do tratamento térmico e não térmico sobre a qualidade físico-química e microbiológica do purê de abóbora.

## Capítulo 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO

Estudar o efeito do tratamento térmico e não térmico sobre a qualidade físico-química e microbiológica do purê de abóbora.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da esterilização em diferentes tempos sobre a qualidade físico-química e microbiológica do purê de abóbora;
2. Investigar os compostos voláteis formados no purê de abóbora esterilizado em embalagens flexíveis autoclaváveis;
3. Avaliar a eficiência da tecnologia de campo elétrico pulsado na inativação de cepas de *E. coli*;
4. Avaliar a eficácia da tecnologia de alta pressão com dióxido de carbono supercrítico na inativação microbiana e os efeitos sobre as características físico-químicas e microscópicas do purê de abóbora;
5. Avaliar a eficiência da tecnologia de plasma frio com descarga corona na inativação microbiana e os efeitos sobre as características físico-químicas e sobre a cor do purê de abóbora.





## Capítulo 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 3.1 ASPECTOS GERAIS DA ABÓBORA

As espécies de abóbora do gênero *Cucurbita* são nativas da América. No Brasil, as espécies *Cucurbita moschata* e a *Cucurbita maxima* já faziam parte da alimentação de povos indígenas desde antes do descobrimento e colonização e apresentam ampla distribuição no país, pois há importância social e econômica das abóboras para a agricultura brasileira, principalmente a tradicional e familiar. Além disso, as abóboras se destacam em valor nutricional (RESENDE et al., 2013).

Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de abóboras em 2010 superou 20 milhões de toneladas, sendo a China responsável por mais de 30% da produção. No Brasil, os dados referentes à produção e comercialização são escassos, sendo a última informação de acordo com o censo agropecuário do IBGE, em relação ao ano de 2006, onde a produção foi superior a 350 mil t, sendo 64% da produção na região Sudeste, destes, 54% no Estado de São Paulo. Dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil destacam as abóboras entre as dez hortaliças de maior consumo alimentar. A abóbora é bastante consumida na região Nordeste do Brasil e ocupa o quinto lugar no volume de comercialização no Estado de Pernambuco (AMBRÓSIO et al., 2006; IBGE, 2008; FAOSTAT, 2010).

As abóboras ocupam um proeminente lugar entre os vegetais devido a sua alta produtividade, além de versatilidade culinária, riqueza de nutrientes como carotenoides, ferro, cálcio, magnésio, potássio, fibras, aminoácidos, vitaminas hidrossolúveis do complexo B e vitaminas C e E, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Também contêm bioflavonoides, bloqueadores de receptores de hormônios estimulantes do câncer, e esteróis que se convertem em vitamina D no organismo e estimulam a diferenciação celular. Possuem grande vida útil, baixas calorias (dependendo da variedade, contém entre 15 – 25 kcal em 100 g), grande quantidade de fibras na polpa e sementes e poucos sólidos totais (na faixa entre 7 e 10%) (HOOVER, 1973; GONZÁLEZ et al., 2001; SEO et al., 2005; FU et al., 2006; ALIBAS, 2007; CAILI et al., 2007; HAZRA et al., 2007; BIESIADA et al., 2009; GLIEMMO et al., 2009; SHI et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; JACOBO-VALENZUELA et al., 2011; NAWIRSKA-OLSZANSKA et

al., 2014; LESPINARD et al., 2015). Nos últimos anos, a abóbora tem despertado interesse, sobretudo no Oriente, pela sua composição em polpa e semente, aspecto nutricional e possíveis benefícios para a saúde. Pesquisas demonstraram que uma dieta rica em abóbora pode reduzir a glicose sanguínea, pois os polissacarídeos da abóbora têm atividade hipoglicêmica, ou seja, agente antidiabética (ZHANG et al., 2002; FU et al., 2006; CAILI et al., 2007; LIDEBJER et al., 2007, JIN et al., 2013; JACOBO-VALENZUELA et al., 2011; MARAN et al., 2013; CONTI et al., 2015).

A polpa da abóbora, além da riqueza de carotenos, é fonte de pectina (PTITCHKINA et al., 1998; AZEVEDO-MELEIRO et al., 2007). Dentre os carotenoides, o  $\beta$ -caroteno, o  $\alpha$ -caroteno e o licopeno são de grande importância por apresentarem propriedades antioxidantes, especialmente o  $\beta$ -caroteno por ser precursor da vitamina A, sendo fundamental para a dieta de populações com alto índice de hipovitaminose A, a qual ocorre em algumas regiões do Brasil (SPEEK et al., 1988; SALGADO et al., 1992; SEO et al., 2005; GLIEMMO et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2001; SHI et al., 2010; AMORIM-CARRILHO et al., 2014; NAWIRSKA-OLSZANSKA et al., 2014; CONTI et al., 2015).

Outros compostos importantes presentes na polpa da abóbora são os polissacarídeos simples e ligados a proteínas, descritos por vários estudos como compostos bioativos desta fruta (CAILI et al., 2007; JACOBO-VALENZUELA et al., 2011; JIN et al., 2013; MARAN et al., 2013). A semente da abóbora é excelente fonte de proteínas e lipídeos, além de fibras e minerais. O óleo da semente também é utilizado, pois contém entre 70 e 80% de ácidos graxos insaturados e grande quantidade de tocoferóis. Também podem ser aproveitadas a casca (rica em pectina) e as folhas (potencial antioxidante) (EL-ADAWY et al., 2001; CAILI et al., 2007; AMORIM-CARRILHO et al., 2014; JIAO et al., 2014). No entanto, esses conteúdos de nutrientes sofrem interferência de fatores sazonais, genéticos, solo, entre outros. (AZEVEDO-MELEIRO et al., 2007; JACOBO-VALENZUELA et al., 2011).

A abóbora “menina brasileira” (*Cucurbita moschata*) ou abóbora de pescoço (Figura 2) é a mais comum no Brasil. Apresenta coloração alaranjada e textura fibrosa, podendo ser utilizada em pratos doces ou salgados, sendo uma das frutas de maior importância econômica. As condições climáticas ideais para o desenvolvimento vegetativo e frutificação são temperatura na faixa entre 15 e 35 °C e boa disponibilidade de água durante todo o ciclo (GONZÁLEZ et al., 2001;

CASAROLI, 2005; PIRES et al., 2012; PROVESI et al., 2012). O processamento mínimo é um processo que existe na comercialização de abóboras, sendo uma forma eficiente de aumentar o consumo e o valor agregado ao produto em até oito vezes (CALBO, 2001; SASAKI et al., 2006; SILVA et al., 2009).

**Figura 2** - Abóbora de pescoço ou “menina brasileira” (*Cucurbita moschata*) e seus cortes transversais.



Fonte: Horticeres (2016).

O interesse da agricultura, indústria de processamento de alimentos, química e farmacêutica em frutas como abóbora e seus subprodutos vem crescendo nos últimos anos. A abóbora possui a vantagem de não acumular metais pesados e nitratos, e isso é importante no que diz respeito a aplicações desta fruta. Esse variado uso da abóbora aumenta as exigências na qualidade que resultam em pesquisas de melhor sabor, qualidade e de facilidade em processar devido a razões técnicas (casca mole, coloração atrativa da polpa) (SOJAK et al., 2010; JACOBO-VALENZUELA et al., 2011). Apesar dos aspectos nutricionais, existe pouca industrialização de abóboras em comparação a outros vegetais como cenouras e tomates, especialmente em países ocidentais (PROVESI et al., 2012).

Murkovic et al. (2002) relatam que uma ampla faixa de variedades de abóboras contém carotenoides em comum:  $\beta$ -caroteno (0,06 – 7,4 mg/100g),  $\alpha$ -caroteno (0 – 7,5 mg/100g) e luteína (0 – 17 mg/100g), sendo então de considerável interesse industrial a extração destes em abóboras para desenvolvimento de ingredientes funcionais para alimentos.

Tang et al. (2006) e Zhang et al. (2002) relatam que os polissacarídeos da abóbora são compostos por galactose, glucose, arabinose, xilose e ácido glucurônico e são insolúveis em água, mas compostos macromoleculares são solúveis em solventes orgânicos com importantes funções biológicas, como detoxificação, antioxidante, redutor da pressão sanguínea e dos níveis de colesterol do sangue, promotor de biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas, controlador da divisão e diferenciação celular, regulador do crescimento celular especialmente para o tratamento de diabetes.

A Tabela 1 ilustra a composição química da abóbora (*C. moschata*) compilada de diversos artigos da literatura e apresentada por Jacobo-Valenzuela et al. (2011):

**Tabela 1** - Composição química da abóbora (*Cucurbita moschata*).

Composição	Conteúdo (% b. s.)
<b>Polpa</b>	
Umidade	79,00 – 93,00
Proteína	0,97 – 1,41
Lipídios	0,07 – 0,16
Fibra bruta	0,56 – 1,56
Cinzas	0,57 – 0,89
Açúcares totais	1,90
Pectina	0,70
Vitamina C (mg/100g)	22,90
Carotenoides totais	160,00 – 1399,40
$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,006 – 2340,000
Luteína ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,03 – 20,60
$\alpha$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	6 – 47
Violaxantina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,6
Fenólicos totais (mg ác gálico 100g <sup>-1</sup> )	476,6
Sólidos solúveis (°Brix)	5,40 – 11,00
pH	5,40 – 6,40
Acidez (% ácido cítrico)	0,06 – 0,10
Viscosidade (Pa s)	0,09 – 0,095
<b>Casca</b>	
Carotenoides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	171,9 – 462,9
$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	37,6 – 63,22
Luteína ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	10,7 – 12,7

Fonte: Jacobo-Valenzuela et al. (2011).

### 3.1.1 Purê de abóbora

O purê de abóbora (Figura 3) é um produto intermediário e termicamente processado, obtido através do processamento da polpa da abóbora, para a fabricação de doces, geleias, bebidas e outros produtos, bem como um agente corante natural em pasta e farinhas para mistura. Possui alto valor agregado, vida útil e grande praticidade de uso, podendo ser incorporado facilmente no preparo de massas, pães, doces e sobremesas, atendendo ao mercado institucional e ao varejo, sendo interessante também do ponto de vista nutricional, visto que, entre outros fatores, é rico em carotenoides (CORRIGAN et al., 2001; JACOBO-VALENZUELA et al., 2011; PROVESI et al., 2011; PROVESI et al., 2012). No entanto, em muitos países como no Brasil, o consumo de abóbora é quase que exclusivamente restrito a geleias ou fruto fresco, uma vez que a maioria do processamento é realizada por pequenas e médias agroindústrias. Por isso, para que a industrialização da abóbora seja viável, é importante que uma proposta de processo para produtos a partir desta fruta, como o purê, utilize tecnologias acessíveis, sempre prezando pela máxima retenção de qualidades sensoriais e nutricionais do produto (PROVESI et al., 2012).

**Figura 3** - Purê de abóbora.



Fonte: autor

A conservação de cor, sabor e viscosidade durante o processamento térmico é um dos parâmetros que afetam a qualidade de um purê. A manutenção desses pigmentos coloridos naturalmente com textura e propriedades viscoelásticas desejáveis tem sido um grande desafio na indústria de processamento de alimentos. Diversos fatores são responsáveis pela degradação de pigmento e cor durante o processamento térmico de alimentos. As abóboras possuem  $\beta$ -caroteno,

que apresenta mudança de cor durante o tratamento térmico, mudança de isômeros *cis-trans*, oxidação e hidroxilação (MARTY et al., 1988; DUTTA et al., 2006). Como a aparência é a qualidade mais importante considerada pelos consumidores no momento da compra de um produto, a descoloração excessiva causada durante o tratamento térmico torna alguns alimentos não comercializáveis (MASKAN, 2001; GLIEMMO et al., 2009).

Provesi (2010) pesquisou a produção do purê de abóbora (*C. moschata*) em embalagem de vidro avaliando a estabilidade dos carotenoides no período de armazenamento de 180 dias, e verificou que a etapa de cozimento foi a principal responsável pela redução da concentração de carotenoides. Além disso, ele caracterizou a matéria prima que apresentava elevados teores de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, umidade e reduzido teor de proteínas, lipídeos e calorias. O autor relata que o armazenamento não alterou significativamente o pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (TSS), mesmo em condições favoráveis ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ao abrigo de luz), e justifica que a estrutura do carotenoide e a matriz alimentar podem estar relacionados a estabilidade dos mesmos nestes purês.

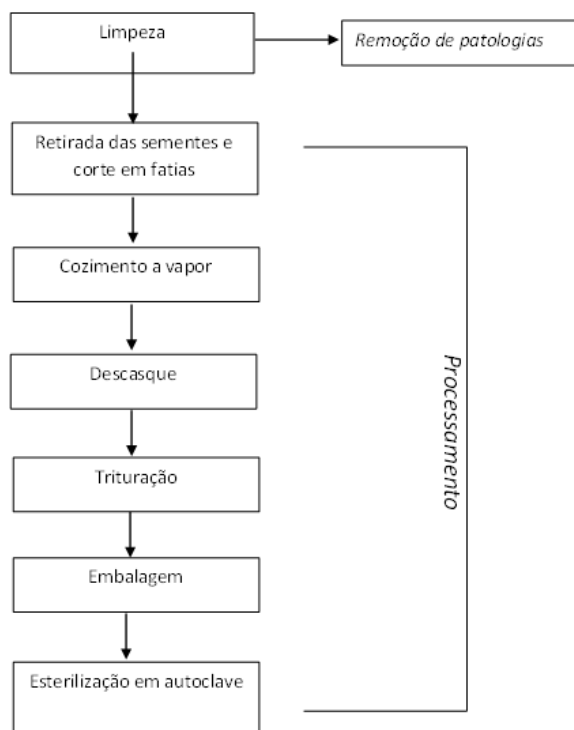
Gliemmo et al. (2009), ao verificarem a estabilidade da cor em purês de abóbora (*C. moschata*, Duchesne ex Poiret), relataram que há uma melhor estabilidade da cor ao usar formulações de purês com pH de 5,00 contendo sorbato de potássio (KS) e armazenados em embalagens PCPC (polivinil clorídrico-polivinilideno copolímero). Kebede et al. (2014b) verificaram que produtos de reações de degradação oxidativa de ácidos graxos insaturados e carotenoides foram detectados em altos níveis após esterilização por alta pressão e alta temperatura. Ao utilizarem radiação gama em purês de abóbora, Gliemmo et al. (2014) verificaram que este processo reduziu a microbiota original durante a estocagem ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e o pH também diminuiu, podendo este fato ter acontecido devido à presença de bactérias ácido-láticas.

A abóbora também possui um perfil volátil característico, compreendendo aldeídos, cetonas, álcoois, derivados de furano, compostos sulfurados e n-heterocíclicos (SIEGMUND et al., 2004). A formação destes compostos voláteis está ligada a reações químicas, tais como a degradação de carotenoides, de lipídeos e reação de Maillard (KEBEDE et al., 2014a).

A obtenção do purê de abóbora em nível industrial ainda é inovação no mercado. No trabalho pioneiro de Provesi (2010), pode ser encontrada uma proposta para o processamento do purê de abóbora, apresentada na Figura 4, com algumas modificações.

As abóboras são previamente lavadas com água potável e são removidas as partes com patologias, transportadas para a área de processamento, onde se realiza a retirada das sementes e o corte em fatias. Os pedaços são cozidos em vapor para amolecimento do tecido vegetal, além de amaciar e permitir a redução da carga microbiana e inativação de enzimas que podem modificar a qualidade sensorial na estocagem do produto. Em seguida, as peças são descascadas e a polpa resultante triturada para obtenção do purê, tratado termicamente nas embalagens em autoclave (PROVESI, 2010).

**Figura 4** - Fluxograma do processamento do purê de abóbora baseado na proposta de Provesi (2010).



Fonte: adaptado de Provesi (2010).

### 3.1.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos de cor amarela, alaranjada, ou vermelha, lipossolúveis, que se encontram em vários frutos e hortaliças, inclusive na abóbora, e são os principais precursores de vitamina A, atuando como antioxidantes. São biossintetizados em plantas superiores, algas, fungos e bactérias. Os animais não são capazes de sintetizá-los, embora sejam capazes de metabolizá-los. Como as plantas são capazes de biossintetizar os carotenoides, sua composição é enriquecida pela presença de pequenas concentrações de carotenoides ou traços de precursores biossintéticos (KRINSKY, 1998; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; CARVALHO et al., 2006; GARCIA et al., 2007; KNOCKAERT et al., 2012a).

Evidências epidemiológicas sugerem que uma dieta rica em carotenoides está associada com a melhora à resposta imunológica e redução dos riscos de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, ateroscleroses e cataratas (GONZÁLEZ et al., 2001; MURKOVIC et al., 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). Os carotenoides protegem as células e organismos contra a foto-oxidação e podem desativar o oxigênio singlet, que é mutagênico, capaz de inativar enzimas e danificar moléculas de DNA e lipídeos (GONZÁLEZ et al., 2001).

O teor de carotenoides é outro importante índice de qualidade a ser considerado, pois sua cadeia de carbonos insaturados é susceptível a algumas reações, como oxidação e isomerização durante o processamento e estocagem de alimentos, mudando assim seu valor nutricional (PROVESI et al., 2012).

Os principais carotenoides isolados da abóbora são  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e luteína, que são responsáveis pela sua coloração (SPEEK et al., 1988; SEO et al., 2005; GLIEMMO et al., 2009). O  $\beta$ -caroteno é responsável pela cor da abóbora e, do ponto de vista nutricional possui propriedades que previnem alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (MURKOVIC et al., 2002; GARCIA et al., 2007; SHI et al., 2010; AMORIM-CARRILHO et al., 2014).

Arima et al. (1990), ao pesquisarem a composição de abóboras do nordeste brasileiro, verificaram que a *C. moschata* (variedade baianinha) apresentava 19 carotenoides, dos quais o  $\beta$ -caroteno foi o principal encontrado, cerca de 74% do total médio da espécie, quase 11 vezes o encontrado em outras espécies de abóbora, o que a torna uma das maiores fontes pró-vitamina A. A composição qualitativa e quantitativa de carotenoides em abóboras varia dependendo da espécie, cultivar, estágio de maturação, das condições de cultivo e da



sazonalidade. Na fruta imatura, o principal carotenoide é a luteína, enquanto na fruta madura predominam o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -caroteno (PROVESI, 2010).

Existem diversos estudos em diferentes espécies e variedades de abóbora, em que se analisou a composição de carotenoides, mostrando altas concentrações destes compostos nas frutas frescas. No entanto, há inúmeras quantidades de cultivares, variedades e condições de crescimento que ainda não foram estudados, além de poucos estudos sobre composição de carotenoides de produtos industrializados derivados da abóbora (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; AZEVEDO-MELEIRO et al., 2007; PROVESI et al., 2011).

Vários fatores podem afetar a estabilidade dos carotenoides, como o tipo e a forma, a concentração de oxigênio, presença de metais, exposição à luz, tratamento térmico, matriz, entre outros (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; PROVESI et al., 2011). Apesar dos carotenoides serem moderadamente termoestáveis, as consequências dessas modificações são: a perda de cor, da atividade biológica e a formação de alguns compostos voláteis que provocam sabores indesejáveis (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; AYVAZ et al., 2012). Devido à instabilidade, na maioria das vezes, o processamento do purê de abóbora causa degradação dos carotenoides. Dependendo da severidade do tratamento térmico utilizado, podem ser induzidas isomerizações, degradações oxidativas, entre outras reações (GRANADO et al., 1992; GAMA et al., 2007; AYVAZ et al., 2012).

A utilização de temperaturas elevadas com tempos mais curtos melhorou a retenção de carotenoides, como apresentado por Lin et al. (2005a), que obtiveram melhor retenção do licopeno em sucos de tomate esterilizados (121 °C) por 40 s. Ao investigarem a estabilidade dos carotenoides de sucos de tomate armazenados em frascos de vidro, com e sem a presença de luz, e em latas, a diferentes temperaturas, Lin et al. (2005b) verificaram que os compostos analisados, luteína, licopeno e  $\beta$ -caroteno, apresentaram perdas em todas as amostras, mas essas foram maiores nos sucos armazenados em temperaturas mais elevadas, com exposição à luz e contato com oxigênio.

Zepka et al. (2009) pesquisaram o efeito do aquecimento sobre carotenoides em suco de caju e verificaram o aparecimento de isômeros *cis* e epóxidos, além do desaparecimento de algumas xantofilas durante o tratamento térmico, agravado pelos ácidos presentes no suco.

Provesi (2010) verificou em purês de abóbora que a etapa de cozimento foi a principal responsável pelas reduções na concentração

dos carotenoides. A matriz de alimentos com altos teores de pectina e fibras, tal como a abóbora, confere certa estabilidade aos carotenoides durante o processo, como observado por Marx et al. (2003), que verificaram isto ao pesquisar que o  $\beta$ -caroteno em sucos de cenoura está presente na forma cristalina, forma que está relacionada com a estabilidade no processamento. Após o tratamento térmico também ocorre maior facilidade na extração de carotenoides, produzindo um aumento no seu teor total em relação aos vegetais frescos (KHACHIK et al., 1992). Esta melhor liberação pode estar associada também à maior biodisponibilidade destes compostos da matriz vegetal submetida ao tratamento térmico (VAN HET HOF et al., 2000). Estudos sobre as consequências do processamento (cozimento ou esterilização comercial) e do armazenamento na composição de carotenoides em purês de abóbora são importantes, pois estes podem se apresentar instáveis em altas temperaturas (PROVESI, et al., 2011; KEBEDE et al., 2014a).

Shi et al. (2010) utiliza a extração supercrítica com dióxido de carbono da abóbora (*C. moschata*) fresca para extrair vários carotenoides (principalmente  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e luteína) em comparação a extração com solvente orgânico. Os autores relatam que na extração supercrítica, o controle de temperatura e pressão possuem significantes efeitos nos rendimentos de carotenoides.

### **3.1.3 Compostos voláteis do purê de abóbora no *headspace* da embalagem**

Os frutos e derivados geralmente apresentam uma composição complexa de constituintes voláteis. Porém, sabe-se que apenas uma fração dos compostos voláteis está envolvida diretamente na qualidade do aroma e sabor das frutas, dentre estes, apresentando impactos odoríferos distintos. Assim, o conhecimento da composição dos voláteis associados às ferramentas sensoriais permite selecionar compostos importantes para descrever a qualidade de um determinado fruto. Este segmento de pesquisa é de importante relevância, pois tem auxiliado na seleção de cultivares, denominação de origem, manejo pré e pós-colheita e beneficiamento de frutas (WANG et al., 2009; DAMIANI et al., 2009; SOUSA GALVÃO et al., 2011). Existe uma grande diversidade de frutas que ainda não foram exploradas quanto aos compostos voláteis, como a abóbora.

A pesquisa envolvendo compostos voláteis tem início com uma etapa de isolamento e concentração da fração volátil através de um determinado método de extração, seguida por uma análise cromatográfica, na qual ocorrerá a separação, quantificação e/ou

identificação dos analitos, e uma última etapa subsequente que consiste no processamento dos dados (VALENTE et al., 2000). Os compostos voláteis são geralmente analisados por cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massa (EM). CG-EM é um método muito utilizado para identificar aromas, odores ou substâncias tóxicas, mas para isso é necessário incluir um primeiro passo envolvendo a extração da fração volátil (DELGADO et al., 2011). Assim, a preparação da amostra é uma etapa crucial para a análise do perfil volátil. Métodos tradicionais de preparação de amostra usam solventes e temperaturas para extração destes componentes que podem induzir a mudanças nas estruturas dos analitos (OLIVEIRA et al., 2004).

A microextração em fase sólida (SPME – *Solid Phase Microextraction*) é uma técnica de preparação de amostra mais comumente utilizada para a determinação de diversos componentes voláteis de matrizes sólidas e líquidas em curto espaço de tempo e de maneira simples. Esta técnica é uma alternativa para extração, não induzindo a modificações nos componentes voláteis e tem sido usada para minimizar o uso de solventes tóxicos e combinar a introdução da amostra, extração e pré-concentração em um único passo, adequando-se às sensibilidades dos detectores de CG. Além disso, esta técnica é simples, facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo, é aplicável a muitos tipos de analitos, rápida, livre de solventes, de baixo custo, facilmente automatizada, seletiva e sensitiva. (PAWLISZYN, 1997; VALENTE et al., 2000).

Para a extração da fração volátil de matrizes complexas, as fibras mais comumente empregadas são misturas de dois ou mais polímeros como DVB/PDMS (divinilbenzeno/polidimetilsiloxano) e ou DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano), pois estes polímeros possuem diferentes mecanismos para adsorver/absorver os componentes e assim, ter a capacidade de extrair compostos de diferentes polaridades (MARTENDAL et al., 2011). O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. O tipo de fibra é escolhido de acordo com a matriz que se deseja analisar. O guia de seleção de uso para as fibras comercialmente disponíveis relacionadas na Tabela 2 são úteis como ponto de partida, mas devem ser preferencialmente conferidas experimentalmente (SUPELCO INC, 1996).

**Tabela 2** - Guia de seleção de fibras de SPME comercialmente disponíveis.

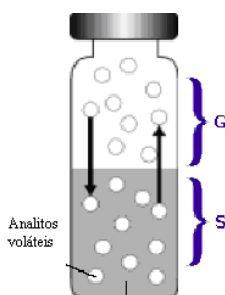
<b>Tipo de analito</b>	<b>Fibra recomendada</b>
Gases e compostos de baixo peso molecular (PM 30-225)	75µm/85 µm Carboxen / polidimetilsiloxano
Voláteis (PM 60-275)	100 µm polidimetilsiloxano
Voláteis, aminas e compostos nitro-aromáticos (PM 50-300)	65 µm polidimetilsiloxano / divinilbenzeno
Polar semi-voláteis (PM 80-300)	85 µm poliacrilato
Compostos de elevado peso molecular não-polares (PM 125-600)	7 µm polidimetilsiloxano
Não-polar semi-voláteis (80-500 PM)	30 µm polidimetilsiloxano
Os álcoois e compostos polares (40-275 PM)	60 µm de Carbowax (PEG)
Compostos voláteis e semi-voláteis, em C3-C20 (PM 40-275)	50/30 µm divinilbenzeno/carboxen em polidimetilsiloxano
Análise de traços de compostos (PM 40-275)	50/30 µm divinilbenzeno/carboxen em polidimetilsiloxano
Aminas e os compostos polares (apenas HPLC)	60 µm polidimetilsiloxano / divinilbenzeno

Fonte: Sigma-Aldrich (2013).

O *headspace* de uma embalagem é definido como o espaço vazio entre o produto e a embalagem, onde estão contidos os compostos voláteis que volatilizam da matriz alimentar. A determinação de compostos voláteis é de grande relevância, pois estes são responsáveis pelo aroma e sabor, e a consequente aceitação do produto, além de indicativos de alterações sofridas durante o tratamento térmico ou processamento. Neste grupo estão inclusos compostos como aldeídos, álcoois, cetonas, terpenos, éteres, ésteres, furanos e hidrocarbonetos (PAWLISZYN, 1997).

De acordo com Pawliszyn (1997), existem dois métodos possíveis de extração, a direta e a de *headspace*, sendo a última indicada para analitos de média e alta volatilidade. As variações mais conhecidas desta técnica incluem o método do *headspace* estático e o método do *headspace* dinâmico (*purge-and-trap*). No modo estático, a amostra é armazenada e selada em um frasco hermético (Figura 5) e os analitos voláteis são coletados no *headspace* do frasco após equilíbrio de volatilização. O *headspace* (HS) por SPME acoplado ao CG-MS é uma técnica valiosa para análises de compostos voláteis e semi-voláteis e tem sido amplamente utilizada em análise de alimentos (PAWLISZYN, 1997).

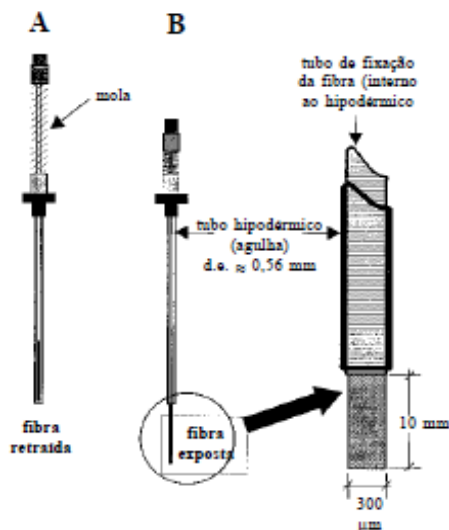
**Figura 5** - Frasco hermético para SPME contendo amostra sólida (S) e o *headspace* (G) contendo os compostos voláteis da matriz alimentícia.



Fonte: Labhut Education Center (2013).

A Figura 6 ilustra uma fibra comercial em que o recobrimento, ou filme extrator, tem espessura de 100  $\mu\text{m}$ .

**Figura 6** - Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm); (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100  $\mu\text{m}$  de espessura.

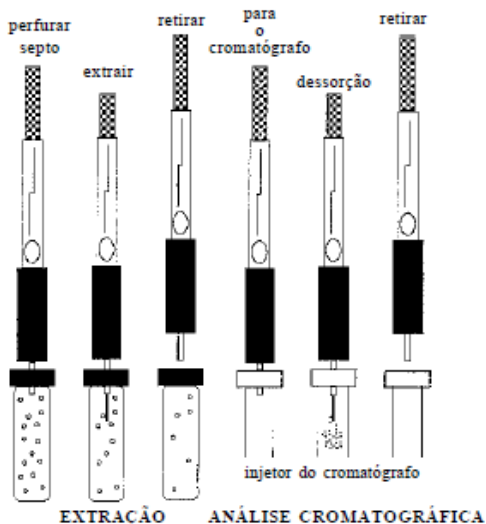


Fonte: Valente et al. (2000).

As espessuras dos recobrimentos de fibras comerciais variam de 7 a 100  $\mu\text{m}$  e seus volumes de 0,03 a 0,7  $\mu\text{L}$ . A extração ocorre mergulhando a seção recoberta na amostra, ou no seu “*headspace*”. As fibras extraem pequenas quantidades de analito, o que facilita sua dessorção e subsequente separação cromatográfica (VALENTE et al., 2000).

As fibras são frágeis, razão pela qual o dispositivo mostrado na Figura 6 foi projetado para que ela possa ser retraída para dentro do tubo hipodérmico durante operações que possam danificá-las, tais como a de transporte e as de perfurar o septo do frasco de amostra e o do injetor do CG. Realizada a extração, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do CG, onde os analitos são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica (Figura 7) (VALENTE et al., 2000).

**Figura 7** - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG.



Fonte: Sulpeco, Inc (1996).

Na extração por SPME, as moléculas dos analitos devem se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento. Para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (PAWLISZYN, 1997). Além disso, a espectrometria de massa (MS) é utilizada para obter informação da massa molecular e de características estruturais, tanto qualitativa quanto quantitativa da amostra (PAWLISZYN, 1997).

### 3.2 TRATAMENTO TÉRMICO EM ALIMENTOS

O tratamento térmico é um dos mais importantes métodos de preservação de alimentos e tem a finalidade principal de inativar enzimas, patógenos e outros micro-organismos deteriorantes capazes de torná-los impróprios para o consumo. Também é utilizado para melhorar a biodisponibilidade de nutrientes, como os carotenoides, uma vez que

decompõe as estruturas da célula vegetal. Porém, propriedades sensoriais e nutricionais tendem a ser alteradas durante o processo. Desta forma, modelos cinéticos de destruição térmica são essenciais para concepção de novos processos, assumindo um alimento seguro e dando uma retenção máxima aos fatores de qualidade. Em todas as suas formas de aplicação, o processamento térmico persiste em ser o mais amplo método utilizado para preservação e extensão da vida útil de alimentos (GHANI et al., 2002; CHEN et al., 2004; DUTTA et al., 2006; AWUAH et al., 2007; TEIXEIRA, 2007; WILSON et al., 2008; SIMPSON, 2009; BYUN et al., 2010b; SHIBESHI et al., 2011; KNOCKAERT et al., 2012b; ALONSO et al., 2013; RATTAN et al., 2014; LAU et al., 2015; TEREFE et al., 2016).

Em tratamento térmico, tanto na esterilização quanto na pasteurização, as embalagens preenchidas e seladas são sujeitas a aquecimento e resfriamento. Alternativamente, trocadores de calor de fluxo contínuo podem ser usados em produtos embalados sob condições de assepsia. Estes regimes de aquecimento e resfriamento, que são conhecidos como “processos”, precisam ser determinados e validados de acordo com um produto específico, colocados em um determinado equipamento e aquecido conforme o tipo do equipamento (SIMPSON, 2009). A severidade de um tratamento térmico depende: do tipo e da resistência térmica dos micro-organismos e enzimas presentes no alimento; da contagem inicial microbiana presente no alimento antes do tratamento; do pH, atividade de água e conteúdo de sal do alimento; do estado físico do alimento (líquido, pastoso, pós, etc.) e outros fatores que podem interferir na transferência de calor e na eficiência da sua aplicação (AWUAH et al., 2007; KNOCKAERT et al., 2012b).

A pasteurização implica em destruição ou redução, por meio de aplicação de calor (entre 65 e 100 °C e 1 atm), de todos os micro-organismos patogênicos e deteriorantes em um estado vegetativo, que podem produzir doenças ou alterações em alimentos, com um pH inferior a 4,6. Neste caso, apenas os micro-organismos que se desenvolvem são os que alteram o alimento, não patogênicos ao homem. Este tradicional processo físico de descontaminação de alimentos é ainda de uso comum, sendo eficiente, ambientalmente amigável, saudável, e de baixo custo quando comparado com outras tecnologias. Além de usar temperaturas mais brandas, permite maior retenção das propriedades originais da matéria prima. Alimentos tipicamente pasteurizados incluem bebidas como leites, suco de frutas, cervejas, bebidas carbonatadas, laticínios, carnes, produtos marinhos, molhos e outros ingredientes de alimentos (JAY, 2005; TEIXEIRA, 2007;



SIMPSON, 2009; ARIAS-MENDEZ et al., 2014; LESPINARD et al., 2015).

Conforme a definição moderna de alimento pasteurizado apresentada por Simpson (2009), pasteurização foi redefinida pelo *U. S. Department of Agriculture* como “algum processo, tratamento, ou combinação destes, que é aplicado a alimentos para reduzir o mais resistente micro-organismo(s) de relevante saúde pública para um nível não desejável, e que não apresente um risco de saúde pública em condições normais de distribuição e estocagem” (NACMCF, 2013). Esta definição, todavia, inclui os processos de pasteurização não térmicos como a alta pressão, campo elétrico pulsado e plasma a frio.

A esterilização é a operação de eliminação de micro-organismos de um meio qualquer. A esterilidade é a ausência de qualquer micro-organismo detectável e viável em um meio ou em fase gasosa que se dá por um processo de aquecimento, por um tempo suficiente, que destrói todos os organismos vivos, esporos e vírus em um recipiente pressurizado à alta temperatura. Uma selagem hermética mantém um ambiente que previne o crescimento de outros micro-organismos de alta resistência e, mais importante, previne recontaminação e patógenos produtores de toxina durante a estocagem. A esterilização é comumente usada para preservar produtos alimentícios na indústria de alimentos (SILVA et al., 1993; AWUAH et al., 2007; TEIXEIRA, 2007; SIMPSON, 2009; ALONSO et al., 2013; LI et al., 2016).

A *Food and Drug Administration* (FDA, 2013) define esterilidade comercial como “A condição atingida pela aplicação de calor, esterilizante químico ou outro tratamento apropriado que torna equipamento e containers livres de micro-organismos patogênicos capazes de se reproduzir em alimentos sobre condições de não refrigeração normais de estocagem e distribuição” (AWUAH et al., 2007; TEIXEIRA, 2007; LI et al., 2016).

Um equipamento em sistema fechado, conhecido como autoclave, é usado para esterilizações por bateladas. A temperatura é elevada até 121 °C quando o ar é inicialmente retirado e todo o vapor é realocado, este vapor úmido é comumente usado para uma efetiva autoclavagem. A elevada temperatura e a longa duração podem eliminar todos os micro-organismos vivos, esporos e vírus. Para eliminação de bactérias e fungos contaminantes, deve se tratar um determinado meio com aquecimento a alta pressão, embora esporos de fungos possam sobreviver se somente aquecimento é usado a 121 °C e 105 kPa. De fato, uma autoclave funciona como uma panela de pressão e é um

equipamento conveniente e econômico para o processo de esterilização (NAJAFPOUR, 2007; ALONSO et al., 2013).

Para esta proposta, um produto pré-embalado está sujeito a um perfil de tempo-temperatura prescrito e calculado para assegurar a redução de esporos e micro-organismos a níveis inofensivos ao consumo humano, mesmo se estocado por um longo período (ALONSO et al., 2013). Para produtos estáveis de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,6$ ) usando tecnologia de aquecimento convencional, o padrão industrial para aplicação é no mínimo, um processamento térmico equivalente a  $121,1^\circ\text{C}$  por 3 min para atingir o menor ponto de aquecimento de um produto. O processo aplicado é delineado para chegar ao menos em 12 log de redução de esporos do patógeno *Clostridium botulinum* (AWUAH et al., 2007; LEADLEY et al., 2008; ARIAS-MENDEZ et al., 2014)

Awuah et al. (2007) apresentam a cinética de inativação térmica de micro-organismos, que é obtida primeiramente pela curva de sobrevivência, que é uma curva logarítmica do número de micro-organismos que sobrevive a um determinado tratamento térmico em uma dada temperatura e tempo de aquecimento. Esta suposição indica que a destruição microbiana geralmente segue uma cinética de primeira ordem. Dois parâmetros chave ( $D$  e  $z$ ) são determinados através das curvas de sobrevivência e resistência, respectivamente. O valor  $D$  representa um tempo de aquecimento (min) que resulta em 90% de redução de uma população microbiana existente, sendo expresso matematicamente como apresentado na Equação 1:

$$D = \frac{t_2 - t_1}{\log(A) - \log(B)} \quad (1)$$

Onde:

$A$  = contagem de sobreviventes no tempo inicial (UFC/mL)

$B$  = contagem de sobreviventes no tempo final (UFC/mL)

$t_1$  = tempo inicial (min ou s)

$t_2$  = tempo final (min ou s)

A taxa constante da reação de primeira ordem ( $k$ ) é obtida da Equação 2.

$$k = 2,303/D \quad (2)$$

A sensibilidade da temperatura (valor  $z$ ), a qual representa o intervalo de temperatura que resulta em uma redução de 10 vezes a contagem microbiana, é representada matematicamente (Equação 3).

$$Z = \frac{T_1 - T_2}{\log(D_1) - \log(D_2)} \quad (3)$$

Onde:

$D_1$  = valor D na temperatura inicial (min ou s)

$D_2$  = valor D na temperatura final (min ou s)

$T_1$  = temperatura inicial (°C ou K)

$T_2$  = temperatura final (°C ou K)

Estudos de cinética de morte bacteriana costumam indicar reações de primeira ordem em relação ao tempo. Além disso, taxas de morte microbiana geralmente sofrem maiores acelerações com aumento da temperatura do que com reações concorrentes que levam à perda da qualidade. Este fato explica as vantagens bem conhecidas da qualidade dos processos de alta-temperatura em curto período (HTST) e ultra alta temperatura (UHT), cujos conceitos são limitados para os alimentos sólidos (DURANCE, 1997).

Diversos trabalhos estudaram os efeitos de tratamentos térmicos com outros não convencionais. Muitos utilizaram diversos tipos de purês em suas pesquisas. Leadley et al. (2008) fizeram um estudo comparativo de esterilização convencional com esterilização a alta pressão em purês de vagens, que também foram estudadas por Singh et al. (2015a; 2015b), ao verificar o efeito das condições de processamento térmico sobre estes mesmos purês enlatados.

Wilson et al. (2008) verificaram a combinação de tratamento térmico convencional com alta pressão em temperaturas elevadas para eliminar esporos em alimentos. Knockaert et al. (2012b) estudaram a degradação de licopeno em purê de tomate com óleo de oliva, através do efeito de pasteurização e esterilização entre tratamento térmico em banho e alta pressão. Kebede et al. (2014a; 2014b) compararam o processo térmico convencional com alta pressão em temperatura elevada, no perfil volátil de cebola, batata, abóbora e beterrabas, e em cenouras de diferentes cores. Kebede et al. (2015a; 2015b; 2015c) investigaram mudanças químicas durante a vida útil de purês de cenoura e purês de brócolis tratados em autoclave e termicamente com alta pressão.

Palmers et al. (2015) verificaram a formação de furanos na esterilização por alta pressão e altas temperaturas em purê de espinafre. Rattan et al. (2014) compararam diversos processos térmicos em autoclaves (com e sem agitação) na letalidade, cor e textura de batatas enlatadas. Zhou et al. (2014) compararam o efeito de alta pressão hidrostática e banho termostático na qualidade microbiológica e físico-

química da abóbora (*C. maxima*) sob refrigeração. Batmaz et al. (2015) fizeram uma comparação de processos em autoclave convencional, autoclave com agitação e um equipamento alternativo para esterilização de purê de banana. Já Sevenich et al. (2015) verificaram o impacto de alta pressão com esterilização térmica em derivados de peixe e purês do tipo “*baby food*”.

Mesías et al. (2016) compararam o impacto de esterilização convencional com aquecimento ôhmico em vegetais para purês do tipo “*baby food*”. Evelyn et al. (2015) e Evelyn et al. (2016) compararam a inativação microbiana de purê de morango e suco de maçã com alta pressão, ultrassom e processamento térmico em banho termostático. Terefe et al. (2016) analisaram os efeitos do processamento térmico sob alta pressão nas enzimas e na qualidade de peras. Daryaei et al. (2016) verificam o teor de letalidade de esporos em meio pouco ácido por processamento térmico com pressão. Stratakos et al. (2016) processando suco de tomate, compararam o efeito do tratamento térmico convencional com um sistema de micro-ondas.

Há relatos na literatura de perdas de qualidade do alimento associadas ao processamento convencional na embalagem flexível *retort pouch*, como mudanças na cor, perdas de vitaminas, odores indesejáveis e mudanças na textura (BYUN et al., 2010b). Byun et al. (2010a) ressaltam que produtos enlatados não são considerados pelos consumidores como de alta qualidade e, por isso, há mais ênfase na qualidade da vida útil dos produtos em embalagem *retort pouch*. A embalagem *retort pouch* minimiza o dano térmico nas características qualitativas do alimento (nutritivas e sensoriais) e outros problemas devido ao rápido aquecimento com base no perfil da embalagem quando comparado às latas.

O processamento térmico, especificamente em embalagens flexíveis *retort pouch*, tem sido usado como uma técnica comum de conservação na indústria de alimentos para estabilidade de alimentos pouco ácidos. O processamento comercial na embalagem *retort pouch* assegura uma redução ou inativação de micro-organismos formadores de esporos, suficiente para garantir esterilidade comercial (BYUN et al., 2010b). Alguns efeitos da interação da embalagem com os alimentos podem ocorrer, porém há poucos dados disponíveis sobre isso.

Joshi et al. (2003) estudaram o efeito da interação do alumínio em molhos de tomate embalados em *pouch*, verificando o nível de resíduos provenientes da embalagem, e observaram que os molhos estocados a temperaturas mais altas apresentavam maior conteúdo residual de alumínio.

Ghani et al. (2001; 2002) verificaram, através de *software* computacional, alterações de parâmetros em sopa de cenoura acondicionada em *pouches*, como perda de vitamina C conforme aumentava a temperatura e de acordo com a região da embalagem submetida ao tratamento térmico. Ayvaz et al. (2012) estudaram, entre outros parâmetros, o efeito da temperatura com alta pressão de diversas embalagens *pouch* na conservação do  $\beta$ -caroteno de cenouras e observaram que, com menores temperaturas de estocagem (em torno de 25 °C), houve uma maior retenção dos carotenoides durante 12 semanas, ao contrário de temperaturas maiores de estocagem (de aproximadamente 37 °C). Potter et al. (1982) já haviam demonstrado que a deterioração durante a estocagem de pêssegos processados termicamente pode ser minimizada pelo uso de *retort pouch*.

### 3.3 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO EM ALIMENTOS

Nos últimos anos, os tratamentos não térmicos vêm ganhando espaço pelo interesse mundial em melhorar a segurança e a qualidade, sem comprometer as características nutricionais, funcionais e sensoriais dos alimentos. O interesse também está em processos de inovação em baixa temperatura para a conservação de alimentos. Em contraste ao tradicional processo térmico, estas tecnologias emergentes estão se mostrando confiáveis nos processos físicos, incluindo alta pressão, campo elétrico pulsado e plasmas a baixa temperatura que inativam micro-organismos no ambiente ou moderadamente eleva temperaturas em pequenos tempos de tratamento. O termo “processamento não térmico” é frequentemente usado para designar tecnologias que são efetivas em temperatura ambiente ou temperatura subletal (PEREIRA et al., 2010; SUROWSKY et al., 2015).

Segundo Li et al. (2016), essas novas tecnologias podem ser classificadas em dois grupos. O primeiro grupo se refere aos processos à alta pressão, UV, luz pulsada, ultrassom e campo elétrico pulsado em combinações com calor. O outro grupo se refere a tecnologias que possam ser consideradas como puramente não térmicas, que incluem plasma frio e irradiação. Alguns tratamentos podem envolver aquecimento devido à geração de energia interna (por exemplo, aquecimento adiabático e aquecimento resistivo durante alta pressão e campo elétrico pulsado, respectivamente), no entanto, eles são classificados como não térmicos, uma vez que são contrários às tecnologias de processamento térmico, sendo facultativo o uso de altas

temperaturas para eliminar os micro-organismos, evitando o efeito nocivo do aquecimento nas propriedades sensoriais, cor e valor nutritivo dos alimentos (PEREIRA et al., 2010; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013).

Os tratamentos não térmicos apresentam como vantagens a melhor manutenção do sabor, cor, aroma, textura e dos nutrientes dos alimentos processados quando comparados aos mesmos alimentos processados com emprego de calor e ainda apresentam menor gasto energético. Também apresentam melhorias na eficiência dos processos, melhora na segurança do produto, aumento dos atributos de qualidade e aumento da estabilidade e vida útil (RAMOS et al., 2006; WAN et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; MUKHOPADHYAY et al., 2012; SUROWSKY et al., 2015; TROY et al., 2016; ZHU et al., 2016).

Enquanto tecnologias emergentes têm demonstrado numerosas vantagens e potenciais para a indústria de alimentos, há aplicações comerciais limitadas devido ao número de fatores envolvidos. Em alguns casos, o entendimento da indústria sobre as novas tecnologias é reprimido pela falta de conhecimento sobre elas e seu impacto na segurança e qualidade do produto. Estas novas tecnologias ainda necessitam vencer as suas deficiências visando aplicações em escala industrial (PEREIRA et al., 2010; TROY et al., 2016; ZHU et al., 2016).

O processo de aplicação de campo elétrico pulsado (CEP) é uma tecnologia que utiliza curtos pulsos de eletricidade, que causam a eletroporação na parede celular do micro-organismo, inativando-o. O CEP tem se mostrado eficaz para inativar micro-organismos patogênicos e deterioradores em temperaturas ambientes, estendendo assim a vida útil de diferentes produtos alimentares sem induzir mudanças significativas negativas nos atributos nutricionais e sensoriais. Além da inativação microbiana, o CEP pode induzir mudanças na estrutura e textura de alimentos, potencializando melhorias nas suas propriedades funcionais ou auxiliando no desenvolvimento de novos produtos. É amplamente reconhecido que CEP tem um grande potencial como uma tecnologia alternativa para pasteurização. Sua eficácia na inativação de micro-organismos é dependente dos parâmetros do processo, do micro-organismo e do meio. Apesar de não poder ser usado sozinho como uma tecnologia de esterilização, alguns estudos têm mostrado que CEP combinado com aquecimento pode se transformar em uma potencial tecnologia para esterilização (WAN et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; GALANAKIS, 2012; LI et al., 2016; TROY et al., 2016; ZHU et al., 2016).

A aplicação de alta pressão com CO<sub>2</sub> (APDC) usa pressões menores do que 500 bar, que é bem menor do que a pressão utilizada em processos a alta pressão hidrostática (APH) que giram em torno de 500 a 1000 bar, também eficiente no processamento de alimentos. O principal parâmetro que influencia na APDC é o CO<sub>2</sub> e não a pressão elevada, embora a pressão ajude na melhor penetração do CO<sub>2</sub> para o interior das membranas celulares. Embora muitos outros gases (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, ar e tetrafluoreetano) tenham sido experimentados para redução microbiana, não se mostraram tão efetivos como o CO<sub>2</sub> em termos de sorção e desorção de gás pelas células. A pressurização do CO<sub>2</sub> concede letalidade na bactéria, seja por afetar diretamente os constituintes moleculares, ou pela própria dissociação dentro da sua espécie de reação iônica tais como bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e hidrogênio (H<sup>+</sup>). A dissolução de CO<sub>2</sub> na água presente nos alimentos gera ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e resulta em diminuição do pH que, por conseguinte, melhora a penetração na membrana celular. As funções metabólicas das células são afetadas por mudanças do pH, a atividade enzimática, o balanço eletrolítico e a lixiviação de constituintes internos. Nenhuma dessas mudanças é provada ser singularmente responsável pelo efeito biocida do CO<sub>2</sub> pressurizado. Existem hipóteses de sinergismo em muitos desses efeitos (WAN et al., 2009; MUKHOPADHYAY et al., 2012; ZHU et al., 2016).

A aplicação de plasma frio em pressão atmosférica ou plasma não térmico na indústria de alimentos tem restrita exploração científica. O plasma frio é composto de espécies altamente reativas, incluindo moléculas de gases, principalmente compostos de fótons, íons e elétrons livres que são efetivos diante de uma ampla faixa de micro-organismos, incluindo patógenos, formadores de biofilmes e esporos bacterianos. A capacidade de esterilização do plasma a frio depende principalmente do tipo de gás de arraste, além da voltagem e do tempo de tratamento. Esta tecnologia tem mostrado um grande potencial como um novo método de esterilização (GALANAKIS, 2012; SUROWSKY et al., 2015; LI et al., 2016; TROY et al., 2016).

A aplicação de campo elétrico pulsado (CEP), alta pressão com CO<sub>2</sub> supercrítico (APDC) e plasma frio se destacam por serem promissoras tecnologias para substituição do tratamento térmico convencional. Em todos os sentidos, a relação entre a percepção da qualidade pelo consumidor e a direção da indústria de alimentos para satisfazer o que este necessita é complexa e constituída por muitos componentes diferentes. A ciência e a inovação desempenham um maior

papel em equipar a indústria para responder aos preceitos e expectativas do consumidor.

### **3.3.1 Tratamento em campo elétrico pulsado (CEP)**

A demanda por produtos de alta qualidade e processados através de metodologias mais suaves tem aumentado nos últimos anos, estimulando desta forma o desenvolvimento de métodos não térmicos de processamento. Dentre estes métodos, o emprego de CEP apresenta-se como uma das alternativas promissoras de substituição ao tratamento térmico convencional por apresentar vantagens como melhor manutenção de atributos sensoriais e nutrientes de alimentos processados comparados aos mesmos tratados com emprego de calor, além de apresentar menor gasto energético e minimizar incrustações e entupimentos da zona de tratamento do equipamento (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999; FIALA et al., 2001; MANAS et al., 2001; GÓNGORA-NIETO et al., 2004; ZHONG et al., 2005; TSUKAMOTO, 2007; GERLACH et al., 2008; CRAVO et al., 2009; HUANG et al., 2009; ZHU et al., 2016).

A tecnologia de CEP tem recebido atenção mundial de universidades, indústrias e grupos de pesquisa. Ela pode ser utilizada por muitas operações em alimentos e bioengenharia, como por exemplo inativação de células microbianas, melhoramento da transferência de massa em células animais ou vegetais ou desintegração de lodo (LEBOVKA et al., 2004a; GERLACH et al., 2008; HUANG et al., 2009; SOLIVA-FORTUNY et al., 2009; JAEGER et al., 2010; BOULAABA et al., 2013; BOULAABA et al., 2014).

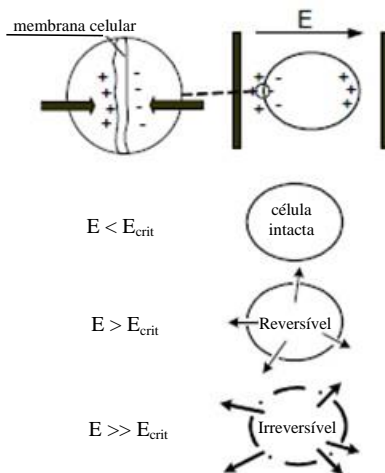
O processamento de alimentos via aplicação de CEP consiste em submeter o produto a campos elétricos de alta intensidade (da ordem de 0,1 a 80 kV/cm), repetidos muitas vezes (constituindo o número de pulsos) entre dois eletrodos, durante intervalos de tempo muito pequenos (da ordem de  $\mu$ s ou ms), a fim de inativar enzimas e destruir a carga microbiana, substituindo o processamento térmico empregado para a mesma finalidade, não somente para manter uma aparência fresca, mas também diminuir perdas de compostos de aroma e sabor (GÓNGORA-NIETO et al., 2004; RAMOS et al., 2006; CRAVO et al., 2009; ZHU et al., 2016).

A eliminação de micro-organismos como bolores, leveduras e bactérias com aplicação de CEP depende da intensidade do campo elétrico e do tempo de aplicação. Quando as células são expostas a um dado campo elétrico, em potenciais maiores que 1 V, suas membranas são geralmente permeabilizadas, ocorrendo ruptura e mudanças na



conformação das membranas celulares. Este fenômeno é chamado “eletroporação”, formando temporários (reversíveis) ou permanentes (irreversíveis) poros através das membranas, que facilitam a liberação de conteúdo extracelular (Figura 8). O objetivo é perfurar as membranas celulares e reduzir a carga microbiana dos alimentos, e no caso de ser irreversível, leva à inativação ou morte dos micro-organismos. Esta técnica pode ser usada em substituição ao processamento térmico atualmente empregado para este propósito (ZIMMERMANN et al., 1974; GÓNGORA-NIETO et al., 2004; MAÑAS et al., 2005; TOEPFL et al., 2007; GERLACH et al., 2008; ZHU et al., 2016). Elevada energia do pulso ( $> 10 \text{ kV/cm}$ ) causa permanente desintegração da membrana celular e, portanto, a destruição da célula bacteriana, através da irreversível formação do poro com a ruptura, como acontece na pasteurização para descontaminação de alimentos líquidos e sólidos (KNORR et al., 1994; HEINZ et al., 2003; SCHILLING et al., 2007; SOLIVA-FORTUNY et al., 2009; JANOSITZ et al., 2011).

**Figura 8** - Representação esquemática do mecanismo de permeabilização da membrana por forças eletro-compressivas induzidas por um campo elétrico externo. O aumento da intensidade do tratamento levará a formação de largos e irreversíveis poros na membrana.  $E$  = força do campo elétrico (V/cm).



Fonte: adaptado de Toepfl (2006).

Os pulsos elétricos de pequena duração têm como objetivo minimizar o efeito Joule (calor), e assim diminuir os efeitos indesejáveis do calor nos alimentos. No entanto, a aplicação deste tratamento não descarta a hipótese de levar a um aumento de temperatura no produto, devido ao aquecimento ôhmico, e por isso o processo é normalmente mantido em temperaturas subletais, explorando as vantagens de ser uma tecnologia não térmica. O baixo consumo de energia de alguns formatos de ondas do pulso é muito atrativo para a indústria de alimentos, devido à possibilidade de conservar alimentos com pouca energia e, conseqüentemente, menores custos ( $< 10 \text{ J/mL}$ ) (ZIMMERMANN et al., 1974; FIALA et al., 2001; PETTIT et al., 2002; GÓNGORA-NIETO et al., 2004; MAÑAS et al., 2005; RAMOS et al., 2006; TOEPFL et al., 2007; GERLACH et al., 2008; CRAVO et al., 2009).

A tecnologia de CEP é considerada melhor que tratamento térmico convencional porque evita ou reduz mudanças nas propriedades físicas e sensoriais dos alimentos. Alguns aspectos importantes na tecnologia por pulso elétrico são: a geração de altas intensidades elétricas, o desenho da câmara que deve conceder tratamento uniforme aos alimentos com aumento mínimo na temperatura e a disposição dos eletrodos que minimizam o efeito de eletrólise (CRAVO et al., 2009). A condutividade elétrica do alimento é um fator importante em relação ao processo, considerando que a energia estocada no capacitor ( $Q$ ,  $J$ ) é dada pela Equação 4 (MITTAL et al., 2005).

$$Q = \frac{C V^2}{2} \quad (4)$$

Onde:

$C$  = capacitância (F);

$V$  = voltagem (V);

A capacitância efetiva ( $C$ ) pode ser calculada pela Equação 5.

$$C = \frac{\tau \sigma A}{d} \quad (5)$$

Onde:

$\tau$  = largura do pulso (s);

$\sigma$  = condutividade elétrica do alimento (S/m);

$A$  = área da superfície do eletrodo ( $\text{m}^2$ );

$d$  = distância entre os eletrodos (m).

Nas últimas quatro décadas, muitos estudos foram realizados para definir parâmetros de processo, cinética e mecanismos de inativação microbiana, a fim de validar e implementar esta tecnologia

em um nível comercial vantajoso e permitindo mais possibilidades para intensificá-la. O CEP possui maior potencial ao ser utilizado em substituição ao tratamento térmico de alimentos líquidos homogêneos que podem ser bombeados facilmente e são menos propensos ao fenômeno de ruptura dielétrica no produto, o que é indesejável, muito embora haja alguns trabalhos sobre aplicação de CEP em produtos sólidos como maçã, cenoura e batata, a fim de melhorar a textura dos mesmos ou aumentar o rendimento do suco extraído (GÓNGORA-NIETO et al., 2004; LBOVKA et al., 2004a; GERLACH et al., 2008; HUANG et al., 2009; SOLIVA-FORTUNY et al., 2009; JAEGER et al., 2010).

Diversas pesquisas para aplicação e limitações do processamento via CEP para uma ampla faixa de alimentos e patógenos têm sido conduzidas pelo meio acadêmico e por indústrias. Uma grande série de dados experimentais está disponível para guiar algumas aplicações ao processamento de alimentos. Apesar do histórico, no entanto, o CEP vem sendo usada comercialmente há pouco tempo de maneira significativa, principalmente nos Estados Unidos, Canadá e na Europa. Este processo está agora sendo explorado em indústrias, incluindo processamento de alimentos, tratamento de efluentes, biocombustíveis e processos de extração. Todos compartilham o objetivo de acessar o material intracelular em plantas e micro-organismos como um passo inicial para os resultados desejados do processo. Diversos pesquisadores têm mostrado que o processo via CEP é equivalente à pasteurização, em termos de redução de patógenos para uma ampla faixa de alimentos líquidos. Para alimentos sensíveis ao calor, existem consideráveis benefícios no gosto, cor e valor nutricional através do processo de CEP. A aplicação desta tecnologia para outros processos industriais se consolida diretamente na pesquisa em processamento de alimentos, e assim, novas aplicações de CEP estão emergindo significativamente (KEMPKES et al., 2012; JOANNES et al., 2015).

A primeira aplicação comercial de CEP para preservação de suco de frutas foi relatada nos Estados Unidos, processando 200 L/h de sucos de maçã, morango e outros, e apresentando seu potencial para uma exploração industrial. O sistema de tecnologia CEP é associado com o uso de mínima energia e grande eficiência de energia em relação ao processamento térmico. Por exemplo, em tratamento para suco de maçã, a energia utilizada no CEP é 90 % menor do que a quantidade de energia usada em HTST (alta temperatura e curto tempo). Em suco de

laranja, estudos têm confirmado que o tratamento por CEP retém todas as propriedades físico-químicas, inclusive com 97,5 % da vitamina C (CLARK, 2006; KUMAR et al., 2015).

Os experimentos realizados por Doevenspeck (1984) mostraram que CEP pode ser aplicado para rompimento celular em alimentos e então, desenvolveu-se e expandiu-se em seguida para a inativação de micro-organismos e tratamento de efluentes. Baseado nestes experimentos, o processo “Elcrack” para a desintegração de matéria animal, tal como peixe ou carne e “Esteril” para descontaminar meios líquidos foi desenvolvido por *Krupp Maschinentechnik GmbH*, Alemanha (SITZMANN et al., 1988).

Após isso, importantes patentes para aplicação de tratamentos via CEP foram depositadas por *Krupp* para a inativação de micro-organismos em estado vegetativo em leite e sucos de frutas com uma força de campo elétrico de até 30 kV/cm, com aquecimento devido à alta energia de dissipação e, conseqüentemente, altos custos de operação que inibiram uma aplicação industrial de sucesso. Mais tarde, outras patentes foram depositadas pela *PurePulse Technologies* (San Diego, Estados Unidos), com campo elétrico variando de 10 a 25 kV/cm. A inativação microbiana e os efeitos na qualidade do suco de fruta foram investigados por Dunn et al. (1987), aumentando a vida útil para uma semana. Hoje em dia, mais de 20 grupos de pesquisa estão trabalhando nesta área no mundo, mas ainda há poucos sistemas industriais e comerciais disponíveis (CLARK, 2006; SHAMSI et al., 2009; KUMAR et al., 2015).

Não está esclarecido se a indústria de alimentos irá aceitar totalmente o CEP como uma tecnologia para processamento. No entanto, CEP já está sendo usado em âmbito industrial em algumas indústrias de suco de fruta na Europa. O número de aplicações de CEP está crescendo ao longo dos anos. Mesmo assim, seu alto potencial para substituir ou complementar métodos convencionais, que provém de bases para estudos contínuos de CEP podem ser observados como de significativa consideração para todos os campos do processamento de alimentos (JANSEN, 2015). A exploração comercial do CEP como uma alternativa para as técnicas de preservação tradicional requer uma análise detalhada da segurança do processo, custo efetivo e benefícios ao consumidor (TOEPFL et al., 2007).

Heinz et al. (1999) pesquisaram e concluíram que a intensidade do pulso elétrico em termos de força do campo e a quantidade de energia aplicada, ou seja, número de pulsos, foram importantes na determinação do nível de inativação microbiana, assim como Toepfl et

al. (2007), que ainda ressaltaram a importância das propriedades da matriz alimentar a ser investigada. Segundo Fiala et al. (2001), outros importantes fatores no processo foram o comprimento do pulso e a temperatura de entrada. O pH e a condutividade do alimento além do estado fisiológico dos micro-organismos também desempenham um papel importante na determinação da cinética de inativação. Barba et al. (2012) relataram que as condições de processamento de CEP recomendadas para a inativação de *E. coli* e outros patógenos é de 25 – 35 kV/cm por 20 – 300  $\mu$ s.

### 3.3.1.1 Parâmetros do processo

#### A) Força do campo elétrico

Ao aplicar um campo elétrico externo com força suficiente nas células em suspensão em um meio eletricamente condutivo, o acúmulo de cargas às membranas microbianas não condutivas sofrerá indução. Assim, haverá formação de poros quando um determinado valor limite do potencial da transmembrana for excedido (aproximadamente 1 V) (ZIMMERMANN, 1996).

A força do campo externo crítico é altamente dependente do tamanho da célula e sua orientação no campo. Com um menor tamanho de célula, a força de campo requerida aumenta bruscamente e as variações no formato da célula podem causar consideráveis aumentos de E (força do campo). O aumento da força do campo elétrico foi relatado em publicações por aumentar a eficiência do tratamento, mas é limitado pela força dielétrica da matriz alimentar, que normalmente fica na faixa entre 60 a 80 kV/cm. Associações de colapsos e arqueamentos causarão fluxo de corrente no canal estreito e irão promover indesejáveis reações eletroquímicas, formação de bolhas e erosão do eletrodo. Isto pode ser prevenido pela otimização da distribuição do campo na câmara excluindo pontos críticos, assim evitando presença de bolhas de ar pela degaseificação ou operação em contra pressão (HODGINS et al., 2000; HEINZ et al., 2002; ALVAREZ et al., 2003; HEINZ et al., 2003; TOEPFL, 2006).

#### B) Tempo de tratamento, energia específica e geometria do pulso

Além do pico de intensidade do campo elétrico do produto, a largura e o número médio de pulsos aplicados têm frequentemente sido utilizados para avaliar a intensidade do tratamento. O aumento do tempo de tratamento resulta em alta inativação microbiana (SALE et al., 1967).

A largura do pulso é definida como o tempo em que o pico do campo é mantido por pulsos quadráticos ou, o tempo até decair para 37 % dos pulsos de decaimento exponencial. Normalmente, aumento no número de pulsos causa aumento no tempo de tratamento, pois a largura do pulso é fixada pela configuração do gerador de impulsos. Em geral, aumento na inativação foi encontrado quando o tempo de tratamento é elevado, mas em alguns casos, a saturação foi relatada após determinadas quantidades de pulsos. Enquanto que para câmaras de bateladas o número de pulsos por volume é bem definido, para câmaras de fluxo contínuo um número médio tem sido considerado. Além disso, em muitos casos a zona de tratamento com um campo elétrico acima da força de campo elétrico crítica é diferente para cada geometria de câmara. Isto pode, em particular, ser encontrado no caso de configuração colinear, em que a distribuição da força de campo tem sido considerada quando se calcula o tempo de residência médio na zona de tratamento. No entanto, a energia específica aplicada foi sugerida como um parâmetro de intensidade que pode ser estimada pelo aumento da temperatura do produto e capacidade térmica do meio, assumindo um sistema adiabático onde a energia fornecida ao meio de tratamento é totalmente convertida em calor (TOEPFL, 2006). Mais apuradamente, isto pode ser calculado por todos os formatos de ondas, baseados em determinados sinais de voltagem e corrente próximos aos eletrodos pela Equação 6.

$$W_{Pulso} = \int U(t)I(t)dt \quad (6)$$

Para pulsos de decaimento exponencial, a energia específica aplicada pode também ser estimada pela energia estocada nos bancos de capacitores conforme Equação 7, onde  $U$  descreve a carga de voltagem e  $C$ , o capacitor, mas a razão de perdas em um eventual resistor protetor ou rede formadora de pulso e cabos necessita ser levada em conta.

$$W_{Pulso} = \frac{U^2 C}{2} \cdot f \cdot \dot{m} \quad (7)$$

Baseado na condutividade do meio e força do campo elétrico medido, a energia específica aplicada para decaimento exponencial e pulsos retangulares pode também ser calculada pela Equação 8.

$$W_{\text{específico}} = f \cdot \frac{1}{\dot{m}} \cdot \int_0^{\infty} k(T) \cdot E(t)^2 dt \quad (8)$$

onde  $E$ ,  $k(T)$ ,  $f$  e  $\dot{m}$  descrevem a força do campo elétrico, a condutividade do meio, a taxa de repetição e a vazão mássica, respectivamente. O aumento da temperatura devido à dissipação de energia pode ser utilizado para avaliação do processo pela comparação da energia aplicada com o produto a granel após o tratamento (TOEPFL et al., 2007).

Do ponto de vista dos processos, a energia aplicada requerida para atingir uma dada taxa de inativação microbiana ou desintegração das matrizes celulares parece ser vantajosa para ser usada como um parâmetro de intensidade do tratamento e para indicar os custos de operação. No entanto, nem tempo de tratamento nem energia específica são adequados para descrever suficientemente os parâmetros de processamento, visto que nenhuma informação é dada sobre a energia fornecida por pulso ou o número de pulsos por volume de elemento. Apesar dos diferentes formatos de onda serem aplicáveis para tecnologia de CEP, as formas mais comuns são: decaimento exponencial e pulsos quadrados (ou quadráticos). Sistemas geradores de pulsos quadrados requerem uma chave interruptora com capacidade de desligamento ou uma rede formadora de pulsos. Como estas chaves estão dificilmente disponíveis para sistemas de aplicações de alta potência, conexões em série ou paralelas de interruptores ou redes formadoras de pulsos distribuídos ou juntos a vários bancos de capacitores e elementos indutivos têm sido usados (MOHAN et al., 1995; GAUDREAU et al., 2001).

De Haan et al. (2002) concluíram que um sistema de decaimento exponencial não excederá uma eficiência de energia de 38 % e compararam pulsos quadrados com pulsos exponenciais, assumindo que o excesso de voltagem de pulsos exponenciais resultam em perdas excessivas de energia. O impacto de tempos elevados de pulso da forma retangular de 2 a 100  $\mu$ s para 1 ms na permeabilização das membranas celulares foi investigada por Kotnik et al. (2003). Nenhuma diferença significativa foi encontrada e a eficiência do tratamento foi correlacionada ao tempo com amplitude do pulso acima do crítico. As características do pulso de um formato exponencial são altamente dependentes dos parâmetros do circuito de carga e descarga. O pico de voltagem e a capacidade da energia estocada determina a energia

aplicada por pulso, resistência e indução do circuito de descarga e influência do tempo do pulso elevado e da largura do pulso. O impacto das características do impulso na inativação microbiana tem sido discutido extensivamente, mas uma vez que não são parâmetros independentes, sua influência não tem sido totalmente elucidada até agora (TOEPFL, 2006).

### C) Temperatura de tratamento

A temperatura tem tido um efeito altamente sinérgico na eficácia do tratamento, pois tem influência significativa na estabilidade e fluidez na membrana celular. Enquanto a baixas temperaturas a estrutura do fosfolípídeo da membrana é empacotada em uma estrutura gelificante, sua ordenação diminui com a elevação da temperatura. A fase dependente da temperatura muda de um gel para uma estrutura líquida cristalina afetando a estabilidade da membrana celular (STANLEY, 1991).

O efeito do aumento da eficiência do CEP em elevadas temperaturas de tratamento tem sido relatado em diversos estudos (HEINZ et al., 2003; LI et al., 2005; TOEPFL et al., 2007). Lebovka et al. (2004a) investigaram o efeito da temperatura de tratamento nas propriedades da textura de cortes de maçã, mostrando que um pré-aquecimento a 50 °C resultou em mais efetivos danos no tecido que tratamento CEP sozinho e melhor extração de suco por prensagem.

#### 3.3.1.2 Fatores do meio de tratamento

As propriedades e os constituintes dos produtos têm significante influência no crescimento microbiano e na resistividade contra diferentes técnicas de inovação. Semelhante ao tratamento térmico, uma forte dependência de suscetibilidade contra campos elétricos pulsados nos parâmetros do produto tem sido relatado e parâmetros físico-químicos como pH e atividade de água do produto influenciam fortemente a inativação microbiana. O meio por si só já representa a indução do tratamento se um CEP é aplicado para desintegração de tecido. As propriedades do tecido, como tamanho da célula e condutividade, terão impacto na eficácia do tratamento, assim como propriedades do produto, como a capacidade de ser bombeado, se for fruta ou tubérculo, o tamanho do pedaço influenciará o manuseio do produto durante, por exemplo, uma aplicação de CEP em modo contínuo (TOEPFL, 2006).



### A) Condutividade

A condutividade do meio  $k(T)$  é um dos parâmetros chave para processamento CEP e também é função da temperatura do meio (REITLER, 1990). Um meio rico em espécies iônicas como, por exemplo, o suco de tomate, apresenta problemas para atingir uma voltagem suficiente para uma força de campo supercrítica, uma vez que um pico de força de campo menor é gerado através da câmara de tratamento. Este efeito é importante para o tratamento de células vegetais ou animais, bem como para atingir inativação microbiana para conservação de alimentos líquidos. A condutividade é o inverso da resistividade e é medida em Siemens por unidade de comprimento (S/m). Como a condutividade da maioria dos alimentos é fixada por suas propriedades intrínsecas ou fórmulas, somente a escolha de uma configuração de eletrodo e geometria com alta carga de resistividade ajuda a diminuir este efeito e melhora a divisão de voltagem no circuito de descarga. Porém, o aumento da temperatura levará a mudanças na condutividade durante o tratamento. Além de sua influência na força do campo, a condutividade pode determinar a diferença entre a força iônica no meio e no citoplasma. A membrana será enfraquecida e mais suscetível a um pulso elétrico no meio com alta força iônica, causando alta permeabilidade e mudanças estruturais (JAYARAM et al., 1993). A relação entre taxa de inativação e condutividade do meio foi investigada por alguns autores, mostrando significativo aumento na inativação em menor força iônica e menor condutividade (HÜLSHEGER et al., 1981; VEGA-MERCADO et al., 1996), embora Alvarez et al. (2000) não confirmaram esta hipótese.

### B) Efeito das bolhas de ar e partículas

A força dielétrica na matriz alimentar tem uma influência significativa na aplicação de CEP, visto que uma ruptura dielétrica deve ser prevenida. Bolhas de ar, que não resistem a altas forças de campo elétrico podem estar presentes, no caso de produtos gaseificados, ou serem liberadas devido a aumento de temperatura ou reações eletroquímicas. Em particular, para inativação microbiana, onde a força do campo elétrico requerido varia de 30 – 50 kV/cm, o ar tem que ser removido do produto. Além do avanço dielétrico, onde uma corrente alta fluirá dentro de um canal estreito no interior da bolha ao invés do líquido, as propriedades dielétricas diferentes do ar influenciarão na eficiência do tratamento. O efeito da perturbação das bolhas de ar presentes indica que nas regiões de fronteira de bolhas, uma significativa

queda na força de campo causará problemas na segurança de alimentos. Efeitos similares têm sido encontrados quando aglomerações de micro-organismos e/ou partículas com diferentes propriedades dielétricas como glóbulos de gordura, estão presentes (GÓNGORA-NIETO et al., 2003; TOEPFL et al., 2003).

A composição do produto tem sido levada em conta na escolha de parâmetros de processamento para um determinado alimento. Por exemplo, para tratamento de alimentos sólidos como matéria vegetal ou animal ou frutas espremidas, o ar tem sido removido para evitar descargas elétricas, e produtos que formam espumas podem ser inadequados para tratamento de CEP (GÓNGORA-NIETO et al., 2003; TOEPFL et al., 2003).

### C) Características de células microbianas

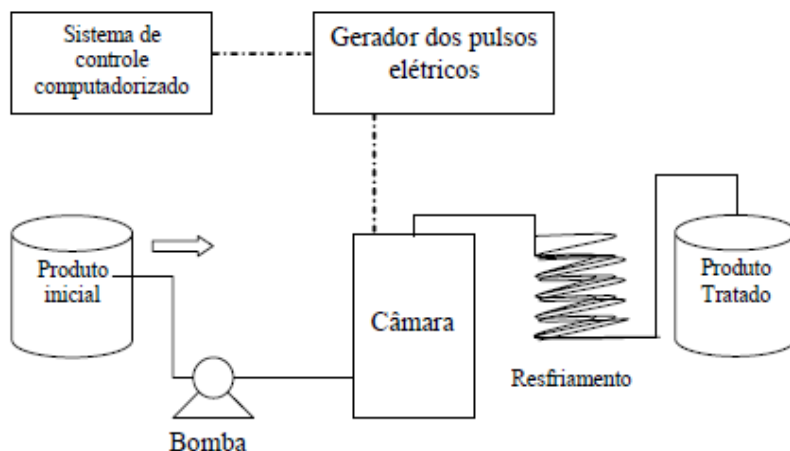
Em geral, organismos gram-positivos parecem ser menos sensíveis. Uma influência do tratamento CEP nas células em diferentes fases de crescimento não foi observada por Sale et al. (1967), mas sim por Jacob et al. (1981), Gaskova et al. (1996) e Alvarez (2000), este último, relatando alta eficácia para células em fase logarítmica de crescimento. O CEP não se mostrou uma eficiente ferramenta para inativação de endosporos ou ascospores, e a germinação de esporos após o tratamento não é induzida. Embora algumas publicações descrevam uma leve inativação de alguns tipos de esporos como Raso et al. (1998), pode não ser possível esterilizar alimentos a menos que se combine com outras técnicas como aquecimento ou realizar germinação prévia e inativar células vegetativas. Vale observar que a resistência das células contra o CEP não tem relação com sua resistência contra outro tratamento, seja térmico ou não térmico (RASO et al., 1998; TOEPFL, 2006; TOEPFL et al., 2007).

Toepfl et al. (2003) e Aronsson et al. (2005) relataram que cepas de *Listeria*, que são altamente sensíveis ao aquecimento mostraram-se altamente resistentes ao CEP. Lado et al. (2003) compararam a inativação de nove diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* após tratamento a 25 kV/cm e 25 °C, os quais atingiram menos que 1 até 3,5 ciclos log de redução. Nenhuma correlação para sensibilidade térmica ou genótipo foi encontrada. Esta variedade enfatiza que ainda há uma necessidade de identificar cepas alvo resistentes para avaliar e provar a segurança e eficácia do processo.

### 3.3.1.3 Equipamento utilizado para CEP

Os principais componentes requisitados para a aplicação de CEP são: um sistema de geração de pulsos e uma câmara de tratamento (Figura 9). Um pré-requisito crucial para economia e eficiência na produção é uma operabilidade contínua com capacidade de alta taxa de fluxo, com o desenvolvimento de câmaras contínuas, onde o alimento é bombeado enquanto está sendo exposto ao campo elétrico em temperatura elevada, ambiente ou de refrigeração. Antes de um tratamento, trocadores de calor podem ser usados para pré-aquecer o meio. Depois, a energia elétrica dissipada acaba resultando em uma elevação da temperatura que tem que ser removida antes do acondicionamento asséptico (evitando recontaminação). Uma das principais vantagens do tratamento CEP é sua operabilidade contínua com tempos de processamento muito curtos e facilidade de implementar o sistema nas linhas de processamento existentes (TOEPFL, 2006).

**Figura 9** - Diagrama esquemático de sistema de processamento contínuo por meio de aplicação de CEP.



Fonte: Ramos et al. (2006).

O sistema de modulação do pulso transforma a potência elétrica de um nível de voltagem de baixa utilidade para pulso de campos elétricos de alta intensidade. A geração de pulsos exponenciais ou retangulares consiste de um circuito de carregamento e

descarregamento, onde no carregamento, o dispositivo de estoque de energia é carregado através de um resistor por uma fonte de alimentação de alta tensão DC. A geração do CEP requer lento carregamento e rápido descarregamento de energia, uma vez que a largura do pulso é curta em comparação ao tempo entre os pulsos. A tensão de carregamento  $U_0$  requerida para geração dos pulsos de suficiente força de campo elétrico é altamente dependente da distância dos eletrodos. Para dois eletrodos paralelos, a força do campo elétrico  $E$  é dada pela Equação 9 (TOEPFL, 2006).

$$E = \frac{U}{d} \quad (9)$$

onde  $U$  é a tensão (kV) e  $d$  (m) é a distância entre os eletrodos. Tensões na faixa de 10 – 60 kV têm sido comumente usadas para tratamento de alimentos. Aumento de distância entre os eletrodos para obter capacidades de taxas de fluxo altas impõe aumento da tensão de carregamento e então uma sobrecarga no sistema de comutadores (chaves comutadoras - *switch*). A potência elétrica é mais comumente estocada em capacitores conectados em série ou paralelos e descarregada na câmara de tratamento através de um comutador de alta voltagem e resistores de proteção de microssegundos. Como comutadores de descarga, muitos dispositivos são aplicáveis com suas desvantagens e limitações. O tipo de chave comutadora (*switch*) determinará a taxa máxima de repetição e a seleção da máxima corrente e tensão que podem suportar. Um centelhador, que é basicamente um sistema com dois eletrodos com arco na parte de cima, propicia uma geração de pulso muito simples e confiável quando a tensão de ruptura é excedida e também pode lidar com alta voltagem e corrente, mas limitado a frequências abaixo de 100 Hz (TOEPFL, 2006).

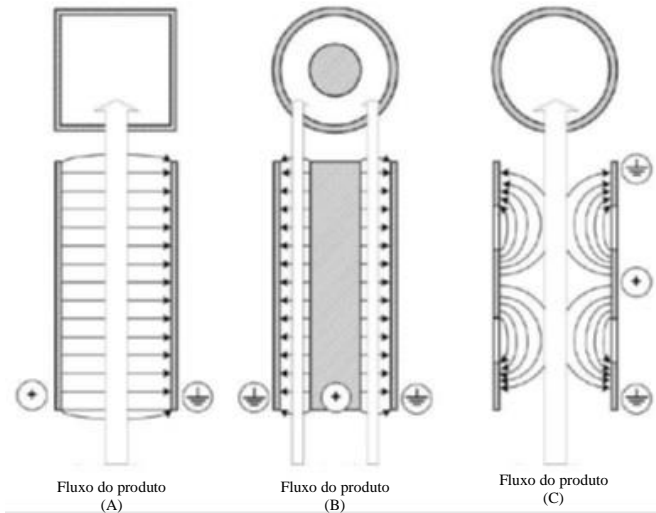
Em um sistema de armazenamento capacitivo, quando o comutador de alta tensão é fechado por um sinal de disparo ou após, a sua tensão de ruptura foi alcançada. A energia armazenada é descarregada para a terra pelo circuito de descarga com resistor de proteção e pela câmara de tratamento com a matriz alimentar. Dependendo do tipo de chave e a configuração do circuito de descarga, diversas formas de onda de pulso são possíveis, mas principalmente duas têm sido usadas: exponencial e quadrática (TOEPFL, 2006).

A geração de pulso de decaimento exponencial requer uma chave com somente um capacitor ligado, sendo que a energia total estocada será descarregada. Já os pulsos quadráticos podem ser

realizados tanto por uma descarga incompleta de um capacitor com alta capacidade, quanto por uma chave com capacidade de ligar/desligar ou uma rede mais complexa de formação de pulsos, fornecendo uma tensão relativamente constante ao longo da largura do pulso. Estudos comparando a eficácia de diferentes formatos de pulsos para inativação CEP foram realizados por Góngora-Nieto et al. (2002) e Kotnik et al. (2003), que concluíram que ambos são efetivos para inativação microbiana, mas pulsos quadráticos salvariam energia e requerem menos esforço para resfriar.

A câmara de tratamento, em que o alimento é exposto aos pulsos, é constituída de pelo menos dois eletrodos: um deles em alta voltagem; outro em potencial de terra, separados por um material isolante em diferentes configurações geométricas que podem ser placas paralelas, coaxiais ou colineares cilíndricas (Figura 10). Um grande número de pesquisas foi realizado com sistema de placas paralelas em modo descontínuo e em seguida em fluxo contínuo de operação. Câmaras em batelada fornecem muitas vantagens para uso em laboratório e requerem pequenos volumes de meios de tratamento, além de temperatura de tratamento fácil de manter, resfriamento de eletrodos e taxas de repetições baixas. Sobretudo, número de pulsos para cada elemento de volume é bem conhecido. Além do nicho de produtos para uma aplicação industrial, as câmaras contínuas são necessárias para atingir alta capacidade de volume e uma fácil integração entre as linhas de processamento de alimentos já existentes (TOEPFL, 2006).

**Figura 10** - Configurações de câmaras de tratamento para CEP contínuo: a) placas paralelas; b) coaxial e c) colinear.



Fonte: adaptado de Toepfl (2006).

Entre as diferentes configurações de eletrodos apresentadas (Figura 10), placas paralelas proporcionam o campo elétrico mais uniforme em uma grande área útil entre as placas, mas a intensidade do tratamento é reduzida em regiões limítrofes. Em câmaras de bateladas sem fluxo de mistura ou fluxo de produto conduzindo mudanças de posição, uma considerável parte do volume pode permanecer sem ser processada, ou seja, um efeito caudal em cinética de inativação microbiana. Já nas câmaras contínuas, isto pode ser prevenido pela adição de zonas de tratamento na linha ou fluxo de canais desorientados. Para atingir alta taxa de fluxo como requer as aplicações industriais, os pulsos têm que ser aplicados com alta taxa de repetição, o que leva a um rápido aumento da temperatura do meio. Manter a temperatura constante pode requerir altos esforços em refrigeração, implementação de canais de resfriamento no eletrodo ou um resfriamento intermediário entre múltiplas zonas de tratamento. (ZHANG et al., 1995).

O eletrodo e o isolante devem ser de grau alimentício e autoclavável, considerando-se também suas propriedades eletroquímicas. Ouro, platina, carbono e óxidos metálicos têm sido relatados como alternativa aos comuns eletrodos de aço inoxidável (BUSHNELL et al., 1996). Erosões no eletrodo e deposição de

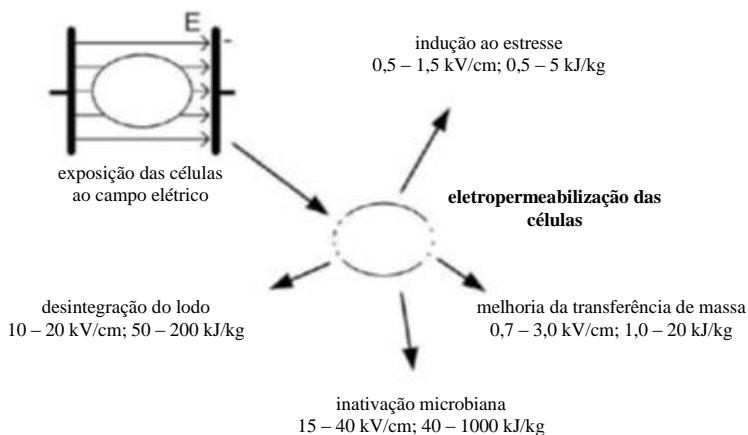
partículas na matriz alimentar foram relatadas (MORREN et al., 2003; TOEPFL et al., 2003). O tratamento CEP em alimentos embalados sem contato direto com o eletrodo tem sido discutido nos últimos anos, mas questões tais como o quão eficiente e suficiente uma força de campo elétrico (homogênea) pode ser induzida ou quanto de energia de pulso necessária pode ser transferida internamente ao produto, terão de ser abordados.

Uma câmara colinear consiste de uma série de eletrodos cilíndricos ocios separados por isolantes em que o produto é bombeado através da perfuração e o fluxo não é perturbado por qualquer impedimento.

#### 3.3.1.4 Aplicações e objetivos do CEP

Muitas aplicações de CEP foram investigadas em alimentos, na biotecnologia e na medicina nas últimas décadas, observando o impacto nas membranas celulares biológicas. A Figura 11 apresenta uma visão geral de possíveis aplicações e intensidades do processamento requeridas:

**Figura 11** - Exposição de células biológicas a um campo elétrico e aplicações em processamentos de alimentos, biotecnologia e resíduos com a força de campo elétrico típica e energias requeridas de aplicação.



Fonte: adaptado de Toepfl (2006).

### A) Indução ao estresse

A aplicação de um tratamento de baixa intensidade com baixa força de campo elétrico e/ou baixo número de pulso, embora inicie por um canal condutor através da membrana, não causa necessariamente ruptura celular irreversível. A ruptura pode ser reversível e o método ser usado em bioengenharia, induzindo reações de estresse em sistemas vegetais ou culturas de células. Angersbach et al. (2000) relataram reversível eletroporação em corte de batata, onde após um tempo de 0,7  $\mu$ s e 1,7 V, o poro já é formado e as propriedades eletricamente isoladoras puderam ser recuperadas em poucos segundos, restaurando a vitalidade e atividade metabólica da célula (PUC et al., 2004; TOEPFL et al., 2007).

Um tratamento CEP a temperaturas amenas não danifica enzimas ou proteínas, então um potencial para extração de componentes de valor é fornecido como observado por Guderjan et al. (2005), os quais conseguiram melhoras na extração de compostos de milho, óleos de soja e oliva, fornecendo um potencial desenvolvimento de conceitos de processos por ativação de células como “biorreatores” para produção de alimentos com alta qualidade e alta concentração de constituintes funcionais.

### B) Desintegração de matéria biológica

Muitas operações em alimentos e bioengenharia como extração, prensagem ou secagem incluem um tratamento enzimático ou térmico ou moagem para rompimento do material celular, as quais requerem alta quantidade de energia mecânica ou térmica bem como estocagem e tempo para uma maceração enzimática, levando a significantes perdas de substâncias de valor agregado nutricional e fisiológicas. A aplicação de CEP em tecidos celulares leva a aumento nos coeficientes de transferência de massa como foi observado por vários autores (DOEVENSPECK, 1984; KNORR et al., 1998, FINCAN, 2004). Operando em temperaturas ambientes, um tratamento com suficiente força de campo elétrico, frequência de pulsos e/ou energia de aplicação resulta em formação de largos poros permanentes enquanto a qualidade do produto é retida em contraste com tratamentos térmicos ou enzimáticos (KNORR et al., 2001; TOEPFL, 2006).

### C) Preservação do meio líquido



A inativação microbiana por CEP tem sido estudada nos últimos anos, inicialmente em sistemas de tratamento em batelada e modelos de alimentos que são livres de gorduras e proteínas. Embora os mecanismos de ação não estejam totalmente elucidados até hoje, parâmetros chave de processamento foram identificados e a inativação de ampla variedade de células vegetativas tem sido mostrada (SALE et al., 1967; ZHANG et al., 1995; HO et al., 2000; BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999).

Salienta-se que a inativação para a maioria dos micro-organismos deteriorantes ou patogênicos, em termos de intensidade, força de campo e energia aplicada é muito maior do que o tratamento em plantas e células animais. Em virtude do tratamento com CEP desintegrar o tecido do alimento sólido, fica impossível manter as propriedades do alimento se as propriedades de textura do produto precisam ser mantidas o que tem restringido o tratamento apenas ao meio líquido. O potencial para atingir redução suficiente de micro-organismos tem sido apresentado em diversos trabalhos com ampla variedade de alimentos processados, sucos de frutas e vegetais, cervejas, leite, ovos e caldo nutriente (ZHANG et al., 1994; MARTÍN-BELLOSO et al., 1997; HODGINS et al., 2002; ULMER et al., 2002; BENDICHO et al., 2002; HEINZ et al., 2003).

Além da inativação microbiana, também se verifica a redução da atividade enzimática por CEP embora as enzimas apresentem determinada resistividade ao tratamento (VAN LOEY et al., 2001; YANG et al., 2004; SCHUTEN et al., 2004).

### **3.3.2 Tratamento em alta pressão com dióxido de carbono supercrítico (APDC)**

A alta pressão com dióxido de carbono (APDC) é outro tratamento que está sendo extensamente utilizado como uma técnica não térmica para pasteurização de alimentos. Alternativamente aos processos térmicos, APDC utilizando CO<sub>2</sub> na forma supercrítica pode ser aplicada para controlar enzimas e bactérias deteriorantes ou patogênicas com o mínimo de perdas do conteúdo nutricional. O processo não somente é ambientalmente amigável pela natureza não tóxica do CO<sub>2</sub>, mas também envolve a aplicação de baixas pressões quando comparada ao processo de alta pressão hidrostática (APH). Além de ser uma tecnologia para melhorar a segurança microbiológica dos produtos alimentares, preservando características nutricionais e

sensoriais, o processamento APDC fornece um meio para manter a qualidade dos alimentos, evitando tratamentos térmicos ou conservantes químicos. Também é muito utilizada para extração de compostos de interesse, com potencial aplicação para modificar a funcionalidade e melhorar propriedades sensoriais e reológicas dos alimentos (YORDANOV et al., 2010).

A maioria das pesquisas com APDC tem sido conduzida utilizando suspensões de culturas puras de diferentes tipos de micro-organismos e o método é preferencialmente aplicado a produtos alimentícios líquidos. No entanto, poucos trabalhos foram realizados com alimentos sólidos, sendo a maioria com enfoque na inativação microbiana, enquanto que informações sobre os efeitos nas propriedades físico-químicas dos alimentos são bem restritas (DAMAR et al., 2006; GARCÍA-GONZALEZ et al., 2007).

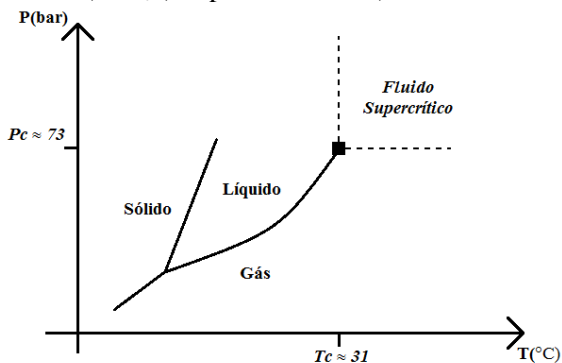
Fraser (1951) foi o primeiro a mostrar o potencial de dióxido de carbono pressurizado para inativação de bactérias. Desde então, muitos estudos têm demonstrado que dióxido de carbono tem um efeito inibitório para vários micro-organismos e vários meios. No entanto, quando pressurizado, pode-se atingir melhor efeito inibitório em patógenos (LI et al., 2012; XU et al., 2011; CHENG et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2013; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2013). Esta técnica usa a condição de CO<sub>2</sub> sob pressão, geralmente até 350 bar, em que o alimento permanece em contato com o solvente sobre condições sub ou supercríticas por um determinado tempo. Desde a primeira demonstração do uso de APDC para inativar micro-organismos, por exemplo, *E. coli* em 1987 (KAMIHIRA et al., 1987), o uso de CO<sub>2</sub> pressurizado com relativa moderação tem sido uma atrativa opção para esterilização (SPILIMBERGO et al., 2003) assim como um tratamento alternativo para APH.

### 3.3.2.1 Fluidos supercríticos

Os fluidos supercríticos são conceituados como um estado da matéria em que a substância apresenta propriedades intermediárias entre um gás e um líquido, nas proximidades do ponto crítico. Este conceito também se refere ao fato de uma substância se encontrar em uma condição de temperatura e pressão acima dos seus valores críticos ( $T_c$  e  $p_c$ ). A temperatura crítica ( $T_c$ ) de uma substância é definida como a temperatura acima da qual uma substância pura não pode ser liquefeita, independente da pressão que for aplicada. Por conseguinte, a pressão crítica ( $p_c$ ) é definida como a pressão de vapor do gás na temperatura crítica. O ponto crítico é representado pela fase líquida e fase vapor, às

quais se tornam idênticas, ou seja, somente uma fase existe conforme esquematizado na Figura 12 (REID et al., 1988; SANDLER, 1989).

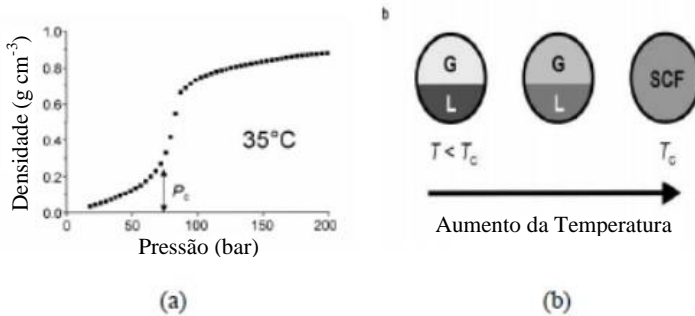
**Figura 12** - Diagrama pressão vs. temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição da região supercrítica para  $\text{CO}_2$ :  $P_c$  (pressão crítica) e  $T_c$  (temperatura crítica).



Fonte: Sandler (1989).

A substância no estado de fluido supercrítico, próximo ao ponto crítico, não se caracteriza nem como um gás, nem como um líquido, do ponto de vista termodinâmico, e é descrita como uma fase intermediária aos dois extremos, pois se assemelha tanto a um gás, por causa da baixa viscosidade e alta difusividade, quanto a um líquido, tendo em vista sua alta densidade (REID et al., 1988). A Figura 13 ilustra a densidade do  $\text{CO}_2$  puro ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) em função da pressão e a representação esquemática do equilíbrio entre gás-líquido para fluido supercrítico (SCF) conforme o aquecimento até temperatura crítica na pressão acima da  $p_c$ .

**Figura 13** - (a) Variação de densidade do CO<sub>2</sub> puro a 35 °C; (b) Representação da variação a partir do equilíbrio entre gás e líquido ( $T < T_c$ ) para fluido supercrítico ( $T \geq T_c$ ), em que a substância é aquecida até sua temperatura crítica ( $T_c$ ) na pressão acima de  $p_c$ .



Fonte: Cooper (2000).

Dentre os diversos fluidos supercríticos, o CO<sub>2</sub> tem tido destaque por apresentar propriedades críticas moderadas que permitem o processamento a temperaturas próximas a ambiente e pressões relativamente amenas (entre 80 e 200 bar). Além disso, CO<sub>2</sub> tem diversos benefícios potenciais, uma vez que não é inflamável, inerte do ponto de vista químico, não tóxico, pode ser facilmente obtido com alta pureza, prontamente disponível com relativo custo baixo quando comparado a outros gases, baixa temperatura crítica (31,1 °C), que é levemente acima da temperatura ambiente. Desta forma, o CO<sub>2</sub> pode ser amplamente utilizado na indústria de alimentos, pois degradação térmica não é um problema quando um processo é operado próximo à temperatura crítica (REID et al., 1988; FURUKAWA et al., 2009; GARCIA-GONZALEZ et al., 2009; FERRENTINO et al., 2011).

A solubilidade do CO<sub>2</sub> em água é relativamente superior comparado aos demais fluidos, o que garante melhor interação com produtos compostos principalmente por líquidos, dando um grande potencial bactericida. Os fluidos supercríticos inicialmente eram mais utilizados em processos de extração/separação e, mais recentemente, tem sido pesquisados no intuito de obter inativação microbiana (REID et al., 1988).

Ao utilizar APDC, o alimento é preservado de efeitos adversos de calor e assim, mantém as características físicas, nutricionais e sensoriais do produto fresco. Dióxido de carbono pressurizado tem a capacidade de difundir através dos sólidos e dissolver em materiais, resultando em

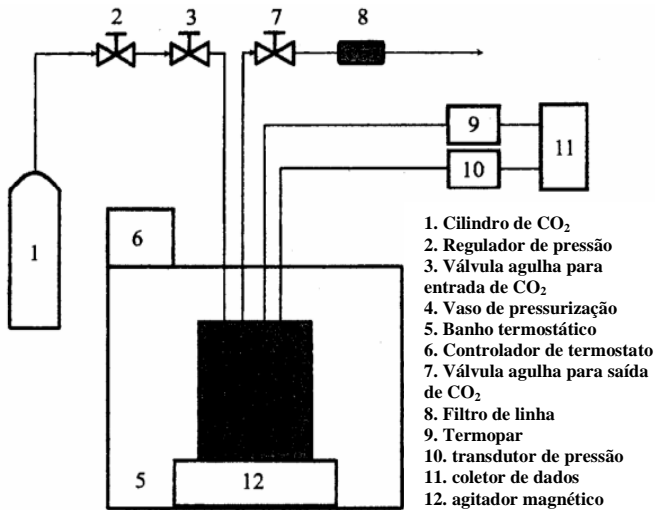
ação bactericida (REID et al., 1988; ERKMEN, 2001a, 2001b, 2001c; SPILIMBERGO et al., 2002; ZHANG et al., 2006; GARCIA-GONZALEZ et al., 2007; FURUKAWA et al., 2009; GARCIA-GONZALEZ et al., 2009; FERRENTINO et al., 2011; SILVA et al., 2013).

### *3.3.2.2 Sistemas de alta pressão para inativação microbiana*

Atualmente, estão disponíveis sistemas do tipo batelada, semi-contínuo e contínuo para o processamento de CO<sub>2</sub> pressurizado. Em sistema por batelada, o CO<sub>2</sub> e o alimento a ser tratado estão em estado estacionário em um recipiente hermético durante o tratamento. Já o modo semi-contínuo possibilita o fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> por meio do recipiente, enquanto que o sistema contínuo permite fluxos de ambos (CO<sub>2</sub> e alimento) através do sistema (DAMAR et al., 2006).

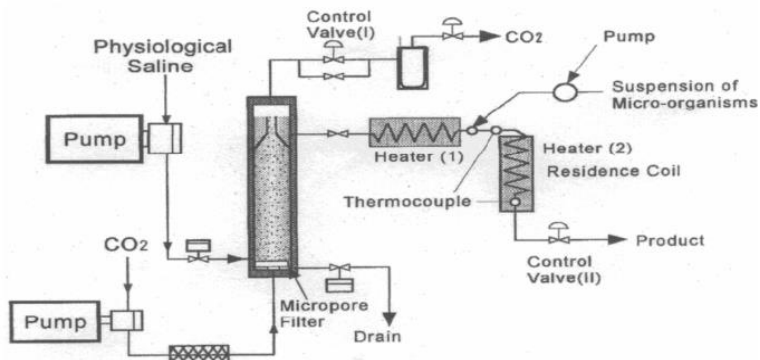
Um sistema batelada simples apresenta cilindro de gás de dióxido de carbono, regulador de pressão, vaso (célula) de pressão, banho termostático (para resfriar ou aquecer) e válvula de alívio de CO<sub>2</sub>, como apresentado na Figura 14. A amostra é colocada no vaso (célula) de pressão e a temperatura é ajustada, de acordo com a especificação desejada. Em seguida, o CO<sub>2</sub> é injetado no recipiente até a saturação da amostra, nas condições de temperatura e pressão desejadas. A amostra permanece no vaso de pressão por um determinado tempo e, em seguida, a válvula de descarga é aberta para a liberação do CO<sub>2</sub>. Em alguns casos é possível incluir um agitador magnético para reduzir o tempo de saturação da amostra com o CO<sub>2</sub>.

**Figura 14** - Esquema de unidade de alta pressão com sistema em batelada.



Fonte: adaptado de Hong et al. (1999).

Em um sistema semi-contínuo de micro bolhas, como esquematizado na Figura 15, o CO<sub>2</sub> líquido e uma solução salina são bombeados para o vaso (célula) de pressão. O CO<sub>2</sub> líquido muda para fase gasosa por meio de um evaporador, que é disperso na solução salina através de um filtro, com tamanho de poros iguais a 10 µm. As micro bolhas de CO<sub>2</sub> sobem enquanto são dissolvidas na solução. Em seguida, a solução saturada com CO<sub>2</sub> é aquecida até a temperatura desejada e a amostra é bombeada para que entre em contato com o CO<sub>2</sub> (SHIMODA et al., 2001).

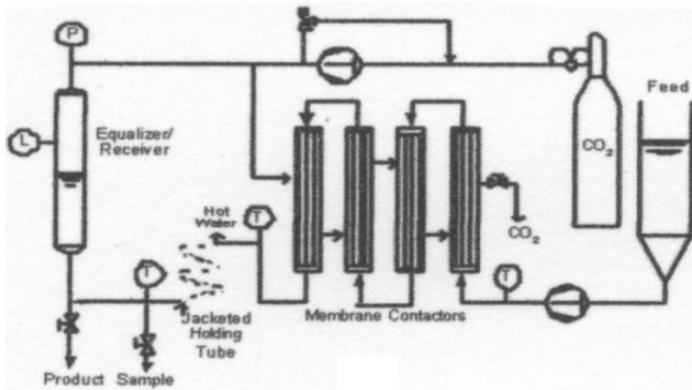
**Figura 15** - Esquema de uma unidade de sistema semi-contínuo.

Fonte: Shimoda et al. (2001).

Em um sistema contínuo, uma bomba de  $\text{CO}_2$  é utilizada para pressurização do sistema enquanto o alimento é bombeado continuamente com uma bomba de líquidos de alta performance. Este arranjo é eficiente na saturação do líquido com o  $\text{CO}_2$ , pois possibilita uma maior área de contato. A Figura 16 ilustra um exemplo de um sistema contínuo constituído por membranas tubulares ocas em série, para o contato entre o solvente e o produto, desenvolvido por Sims e Estigarribia em 2002. Na membrana de contato, o  $\text{CO}_2$  não é misturado ao líquido. O que ocorre é um processo de difusão instantânea do  $\text{CO}_2$  no líquido até níveis de saturação. O  $\text{CO}_2$  é reciclado e reutilizado no processo (DAMAR et al., 2006).

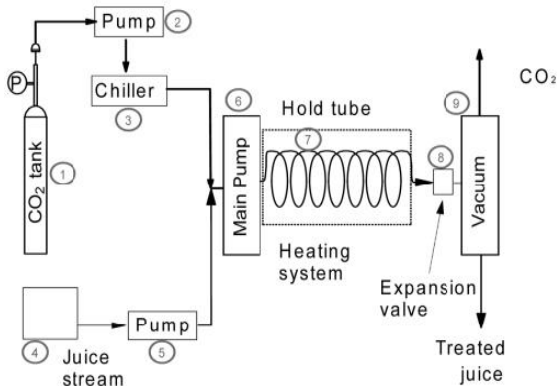
Em um sistema desenvolvido pela *Praxair Co.* (Chicago, Ill., EUA) representado pela Figura 17, o  $\text{CO}_2$  e o produto são bombeados e misturados antes de passarem pela bomba de alta pressão, que elevará a pressão do sistema até o valor desejado para o processo. A temperatura é controlada e o tempo de processo é ajustado com a taxa de fluxo do produto escoado pela serpentina. No final do processo, há uma válvula de descarga para a liberação do  $\text{CO}_2$  da mistura. Também é possível retirar o  $\text{CO}_2$  residual do alimento utilizando um tanque a vácuo.

**Figura 16** - Exemplo de unidade de alta pressão em sistema contínuo por Sims e Estigarribia.



Fonte: Damar et al. (2006).

**Figura 17** - Esquema de unidade de alta pressão em sistema contínuo desenvolvido pela Praxair Co.



Fonte: Damar et al. (2006).

### 3.3.2.3 Utilização de alta pressão com CO<sub>2</sub> para inativação de micro-organismos

Diversos estudos têm relatado o uso de APDC para a inativação de micro-organismos, seja na matéria prima ou no alimento já processado, embora sejam limitadas as informações sobre a variação da resistência microbiana ao APDC disponíveis na literatura. Assim, comparações efetivas dos dados publicados são dificultadas pelas



diferentes condições e metodologias utilizadas. No entanto, somente a suscetibilidade de diferentes micro-organismos nestes estudos pode ser comparada (ERKMEN, 2001a; ZHANG et al., 2006; FURUKAWA et al., 2009; FERRENTINO et al., 2011; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2013).

A inibição do crescimento microbiano pelo  $\text{CO}_2$  ainda não é totalmente esclarecida, bem como os mecanismos para inativação de micro-organismos. De acordo com Garcia-Gonzalez et al. (2007), que coletaram diversos trabalhos da literatura para melhor entendimento do mecanismo de inativação microbiana pelo tratamento com APDC, algumas hipóteses foram listadas:

a. Solubilização do  $\text{CO}_2$  pressurizado na fase líquida externa:

O  $\text{CO}_2$  presente no *headspace* pode se dissolver na água para formar o ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que em seguida se dissocia formando o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) (Equações 10 a 12), principalmente em amostras com elevada quantidade de água. Consequentemente, a água em contato com o  $\text{CO}_2$  pressurizado normalmente libera íons  $\text{H}^+$ , em função da formação e dissociação do  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , diminuindo o pH extracelular, que então, pode inibir o crescimento microbiano e diminuir a resistência microbiana à inativação em função do aumento do consumo de energia para manter a homeostase do pH pela força motriz do próton. No entanto, a redução do pH não é suficiente para designar o efeito letal do  $\text{CO}_2$ . A diminuição do pH contribui para o aumento da permeabilidade da membrana, facilitando a penetração do  $\text{CO}_2$  na membrana celular (etapa b).



b. Mudanças na membrana celular:

O  $\text{CO}_2$  pode se espalhar na membrana plasmática e acumular dentro da sua camada lipofílica interna. O montante de  $\text{CO}_2$  acumulado na fase lipídica da membrana pode provocar um colapso tanto estrutural quanto funcional na membrana celular devido a uma perda na cadeia lipídica, o que pode elevar a fluidez e, portanto, a permeabilidade da membrana.

c. Diminuição no pH extracelular:

Em função do aumento da permeabilidade da membrana, o  $\text{CO}_2$  pressurizado pode penetrar facilmente na membrana celular bacteriana e acumular no interior do citoplasma das células, onde as concentrações relativas de  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  aquosos estão sendo controladas pelo pH interno como resultado da homeostase do pH para mantê-lo constante (essencial para viabilidade celular ideal e atividade celular). Sendo assim, as células microbianas, ao serem expostas ao  $\text{CO}_2$  pressurizado não são capazes de manter favorável a homeostase do pH do citoplasma.

d. Inativação de enzimas chave ou inibição do metabolismo celular em função da diminuição do pH:

As enzimas, que compõem a maioria das proteínas no citosol, têm atividade máxima no pH ótimo para cada uma delas. Sendo assim, a atividade enzimática diminui drasticamente abaixo ou acima do pH ótimo, fazendo com que a redução do pH citosólico possa causar inibição e/ou inativação de enzimas essenciais para a regulação dos processos metabólicos celulares.

e. Efeito inibitório do  $\text{CO}_2$  e do  $\text{HCO}_3^-$  no metabolismo:

A regulação de uma via metabólica pode ocorrer em vários níveis. A taxa de reação enzimática não é uma função somente do pH, mas também das concentrações intracelulares de elementos fundamentais da regulação da atividade enzimática, como substratos, produtos e cofatores. A concentração de ácido carbônico ( $\text{HCO}_3^-$ ) parece ser fundamental para a regulação da atividade enzimática e em função dela, algumas enzimas são estimuladas e outras inibidas.

f. Desordem do balanço eletrolítico intracelular:

Quando a pressão é aplicada e se acumula  $\text{CO}_2$  no interior do citoplasma das células microbianas, danos letais ao sistema biológico podem ocorrer. Este fato pode converter o  $\text{HCO}_3^-$  para  $\text{CO}_3^{2-}$ , o que poderia precipitar eletrólitos inorgânicos intracelulares (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) a partir de células e membranas celulares. Estes eletrólitos inorgânicos, além de serem reguladores importantes de um grande número de outras atividades celulares, ajudam a manter as relações osmóticas entre as células e os meios que as rodeiam. Essa alteração pode ter efeitos prejudiciais sobre o volume das células.

g. Remoção de componentes vitais da célula e da membrana celular:

O  $\text{CO}_2$  acumulado pode remover constituintes vitais das células ou membranas celulares devido ao seu poder de solvatação relativamente alto. Neste mecanismo, sob pressão, o  $\text{CO}_2$  primeiramente penetra nas células para construir a densidade de um nível crítico no

interior das células, depois, remove componentes intracelulares (como fosfolipídeos e compostos hidrofóbicos) para perturbar ou alterar a estrutura das membranas e/ou o equilíbrio do sistema biológico, promovendo assim a sua inativação.

Os autores observaram que estes passos mencionados não acontecem consecutivamente, mas simultaneamente em uma forma complexa e inter-relacionada (LIN et al., 1992a; LIN et al., 1994; HONG et al., 1999).

Spilimbergo et al. (2003) também relataram que os efeitos biocidas da APDC nas bactérias patogênicas em alimentos são devidos a: rompimento da parede celular em função da pressão interna; modificação da membrana celular e extração de lipídeos da parede celular; inativação de enzimas essenciais para o metabolismo microbiano; extração de compostos extracelular, conforme o que foi exposto anteriormente por García-Gonzalez et al. (2007).

Além disso, diferentes fatores afetam a inativação de micro-organismos por APDC. Entre os principais, são: temperatura, pressão, taxa de despressurização, número de ciclos de pressurização, tempo de processo, proporção entre volume de CO<sub>2</sub> e produto, população inicial de micro-organismos, meio e fase de crescimento microbiano (ZHANG et al., 2006; GARCIA-GONZALEZ et al., 2007; SILVA et al., 2013). Zhang et al. (2006) e Garcia-Gonzalez et al. (2007) elencaram diferentes abordagens publicadas a respeito dos fatores que afetam a inativação microbiana, listadas na sequência.

#### 1) Efeito da pressão:

Em geral, o aumento da pressão de um sistema de APDC aumenta a inativação de micro-organismos, conseqüentemente, será necessário um tempo menor de processo para que se atinja o mesmo nível de inativação. A pressão controla a taxa de solubilização do CO<sub>2</sub> e sua solubilidade no meio e isto é favorecido quando há incremento da pressão, que facilita a acidificação do meio externo e o contato do CO<sub>2</sub> com as células. Além do mais, o poder de solvatação do CO<sub>2</sub> é aumentado com a elevação da pressão, o que facilita a remoção de constituintes essenciais das células e da membrana celular. Todavia, o efeito da pressão é limitado até a saturação da solubilidade do CO<sub>2</sub> no meio (LIN et al., 1993; LIN et al., 1994; HONG et al., 1999).

#### 2) Efeito da temperatura:

A taxa de inativação aumenta com a elevação da temperatura, de uma forma geral, pois estimula a difusividade do CO<sub>2</sub> e também pode aumentar a fluidez da membrana celular, facilitando assim, a penetração

do CO<sub>2</sub>. Porém, o tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado não deve ser realizado em temperaturas muito acima da T<sub>c</sub> do CO<sub>2</sub>, pois nesta região, a densidade do solvente e, por consequência, sua capacidade de solubilização diminui com a elevação da temperatura. Também altas temperaturas devem ser evitadas, em função da qualidade nutricional e sensorial do alimento, que podem vir a sofrer prejuízos (LIN et al., 1993; LIN et al., 1994; HONG et al., 1999).

3) Efeito do estado físico do CO<sub>2</sub>:

O processo APDC pode ser realizado em condições subcríticas (líquido ou gás) ou supercríticas, dependendo da temperatura e da pressão do CO<sub>2</sub>. No ponto crítico ou nas suas proximidades, o CO<sub>2</sub> apresenta características intermediárias entre um líquido e um gás, que possibilita uma maior inativação microbiana, em comparação ao CO<sub>2</sub> no estado subcrítico, como relatado por Lin et al. (1992b), Hata et al. (1996), Dillow et al. (1999) e Gunes et al. (2005); embora Enomoto et al. (1997) tenham relatado melhor inativação de esporos de *B. megaterium* em APDC na condição subcrítica.

4) Efeito da agitação:

A agitação pode aumentar a solubilização do CO<sub>2</sub> e o seu contato com as células microbianas, facilitando a penetração do CO<sub>2</sub>, favorecendo a inativação. Porém, não há relatos na literatura que indiquem a velocidade adequada para favorecimento da inativação microbiana (DILLOW et al., 1999; LIN et al., 1994).

5) Efeito do conteúdo de água:

Células vegetativas presentes em meio com baixa a<sub>w</sub> apresentam menor grau de inativação, indicando que a resistência à inativação aumenta com a diminuição do conteúdo de água. Muito provavelmente, a inativação microbiana é maior quando a água está presente no meio devido ao aumento na solubilidade do CO<sub>2</sub> que aumenta a formação e dissociação do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e a liberação de íon H<sup>+</sup> e assim, reduzem o pH do meio (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

6) Suscetibilidade de diferentes micro-organismos:

As bactérias gram-positivas possuem parede celular com composição e espessura diferenciada, o que proporciona maior resistência ao processamento por APDC, em relação às gram-negativas (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

7) Efeito da concentração bacteriana inicial:

Nas mesmas condições, quando a população inicial de bactérias é menor, maior inativação é obtida e, conseqüentemente, nos casos em que a contagem microbiana inicial é elevada, necessita-se elevar o tempo de processo para obtenção do mesmo nível de inativação. A

elevada contagem inicial de micro-organismos parece exercer um efeito de proteção entre as células, fazendo com que fiquem menos expostas ao efeito do CO<sub>2</sub> pressurizado. Por outro lado, quando a carga inicial é menor, as células ficarão mais expostas ao CO<sub>2</sub> durante o processo e assim, mais sensíveis à inativação (ERKMEN, 2000; TAHIRI et al., 2006).

8) Efeito das características físico-químicas do meio:

Alimentos ou meios que possuem característica físico-química complexa parecem exercer uma proteção das células microbianas quando comparados a soluções mais simples, influenciando na taxa de inativação que é afetada fortemente pelos constituintes do meio de cultura e composição do alimento durante o processo APDC. A presença de componentes lipídicos pode estar relacionada a isto. A gordura provavelmente dificulta a penetração do CO<sub>2</sub> nas células por meio de uma alteração na parede e na membrana celular (LIN et al., 1994; GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

9) Efeito do estágio do crescimento bacteriano:

No geral, os micro-organismos que estão na fase estacionária são mais resistentes à temperatura e pressão quando comparados aqueles da fase log. Células que estão no final da fase exponencial foram mais sensíveis ao tratamento quando comparadas àquelas que estavam na fase estacionária, pelo fato de que, na fase estacionária, os micro-organismos são capazes de sintetizar novas proteínas que protegem as células em condições adversas (HONG et al., 1999).

10) Efeito da combinação de processos:

Vários estudos foram realizados combinando o processo APDC com outros tratamentos, como alta pressão hidrostática (APH), irradiação, campo elétrico pulsado, etc. Esta abordagem, oriunda da Teoria dos Obstáculos, pode favorecer o efeito letal sobre o processamento não térmico bem como, diminuir a severidade dos processos para obtenção de um determinado grau de inativação (PARK et al., 2002; SPILIMBERGO et al., 2003; FROEHLICH et al., 2009; PATARO et al., 2010).

De uma forma geral, o tratamento com APDC tem sido sugerido como uma opção ao processamento de alimentos, principalmente por seu potencial para inativar micro-organismos. Por ser uma tecnologia não térmica, o uso de dióxido de carbono pressurizado tem obtido destaque pelo seu potencial em preservar alimentos evitando a ação do calor para as mudanças físicas, nutricionais e sensoriais (CHOI et al., 2008; NORTON et al., 2008;

GARCIA-GONZALEZ et al., 2009; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2013).

### 3.3.3 Tratamento em plasma frio

Uma das mais recentes tecnologias para processamento de alimentos é o plasma não térmico em pressão atmosférica. É comumente descrita como plasma frio, não térmico ou “resfriado” e inclui uma variedade de benefícios em relação à temperatura de entrada e a eficácia antimicrobiana, que faz com que o plasma seja altamente atrativo para aplicação em alimentos sensíveis à temperatura. Nos últimos 10 anos, muito interesse tem sido mostrado na tecnologia de plasma como um possível tratamento para inativação microbiana (SHARMA et al., 2009; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; STOICA et al., 2014; BAIER et al., 2015; MOK et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015).

Apesar do plasma ser uma tecnologia emergente em muitos campos de aplicação, historicamente a tecnologia de plasma remonta desde o século XVIII, sendo identificada primeiramente como uma mistura de íons e elétrons. O termo plasma só foi definido em 1923, por Irving Langmuir (1881 – 1957), um químico americano, que observou oscilações específicas em gás ionizado e foram determinados pela densidade e massa do elétron. Ele então os chamou de “oscilações plasma” que são gerados devido a uma carga de distribuição não homogênea e a uma tendência natural desta carga para redistribuição uniforme dentro do plasma (SUROWSKY et al., 2015).

Nos últimos 20 anos, o número de publicações com plasma frio cresceu muito, sendo aplicado para diversas funções, entre as principais, esterilizar equipamentos médicos e cateteres. Em 1996, Laroussi foi um dos primeiros a descrever um novo método de esterilização usando uma descarga luminosa gerada à pressão atmosférica, examinando a inativação da bactéria *Pseudomonas fluorescens* em solução de extrato de levedura com glicose polipeptona. Nesta época também, as primeiras aplicações em relação a alimentos foram estudadas, além de materiais de superfícies de contato com alimentos. Desde então, o plasma frio tem sido testado em um número de superfícies e micro-organismos com resultados satisfatórios em termos de inativação. Os primeiros tratamentos diretos em alimentos foram estudados por Montenegro et al. (2002) que inativaram a bactéria *E. coli* O157:H7 através de um pulso de um sistema de plasma não térmico em suco de maçã (LAROUSSE, 1996; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; STOICA et al., 2014; MOK et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015).

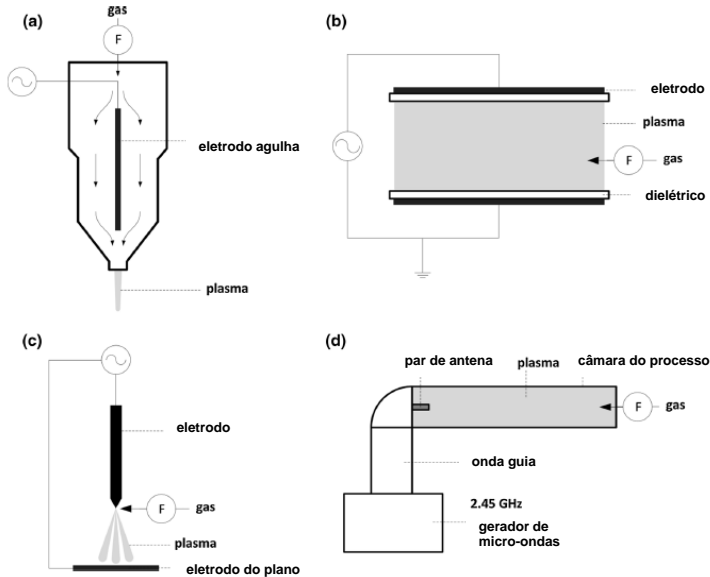
De acordo com Surowsky et al. (2015), a química do complexo plasma é conduzida por elétrons. Eles realizam ionização, que é necessária para manter o plasma e são responsáveis pela excitação atômica/molecular, dissociação e produção de estados moleculares radicais e metaestáveis. O resultado é um meio gasoso ativo que pode ser seguramente usado sem danos térmicos aos materiais circundantes.

Quando o plasma é gerado em condições amenas de temperatura, (às vezes em condições ambiente), é referido como plasma frio em pressão atmosférica. A temperatura do plasma frio é em torno de 30 a 60 °C, sendo esta temperatura preferida pela indústria de alimentos devido a baixa energia requerida para sua geração (MISRA et al., 2011; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013).

As fontes de plasma mais comuns para a geração de plasma não térmico em pressão atmosférica são jatos de plasma, descargas em barreira dielétrica (DBD), descargas corona e descargas micro-ondas.

A Figura 18 ilustra as configurações esquemáticas de diferentes fontes de plasma à pressão atmosférica.

**Figura 18** - Configurações esquemáticas de diferentes fontes de plasma à pressão atmosférica: (a) jatos de plasma em pressão atmosférica; (b) descargas em barreira dielétrica (DBD, configuração plana); (c) flâmula de descarga corona (configuração ponta-plano); (d) autônoma através da câmara com descarga de micro-ondas em movimento.



Fonte: adaptado de Surowsky et al. (2015).

Os jatos de plasma frio (ou não térmico) em pressão atmosférica produzem pequenas flâmulas que são tipicamente geradas em uma faixa de radiofrequência. Consiste de dois eletrodos, mas a configuração com um eletrodo também pode ser estabelecida. A distância entre os eletrodos geralmente fica na faixa de alguns milímetros e o gás do processo (geralmente gases nobres) é inflamado em tensões de cerca de 100 V. As principais vantagens deste tipo são suas pequenas dimensões, aplicabilidade e capacidade para penetrar em espaços estreitos (Figura 18a) (WELTMANN et al., 2008).

Na descarga em barreira dielétrica (DBD), o plasma é normalmente gerado entre dois eletrodos que são separados por uma barreira dielétrica. Além da configuração plana (Figura 18b), também existem configurações co-planas e descargas de superfície, que podem ser operadas em um modo difusional (descarga uniforme) e em modo



filamentoso (canais de descargas muito pequenas). Os parâmetros cruciais deste processo são o gás de arraste, a distância entre os eletrodos e a operação elétrica da descarga. Entre as vantagens de DBDs estão: a grande variedade de gases que podem ser utilizados, o baixo fluxo de gás necessário em comparação a outras configurações, a possibilidade de inflamar descargas homogêneas até vários metros, bem como, a boa adaptação devido às diferentes geometrias dos eletrodos. No entanto, relativas altas voltagens da chama ( $> 10$  kV) são necessárias, dependendo da distância do eletrodo, o que faz com que seja essencial precaução e isolamento (EHLBECK et al., 2011; MISRA et al., 2015).

A descarga corona (Figura 18c) surge próxima ao eletrodo afiado onde o campo elétrico é suficientemente amplo para acelerar randomicamente a produção de elétrons até o nível de energia de ativação dos átomos ou moléculas dos gases circundantes. As geometrias típicas são as ponta-plano (*point-to-plate*) (por exemplo, eletrodo fortemente curvado e plano - Figura 18c) e configurações cilíndricas, que podem ser operadas em corrente contínua (DC) ou modo alternado, e o eletrodo pode ter potencial negativo ou positivo. A descarga corona normalmente pode ser gerada por dispositivos muito simples com desprezíveis custos iniciais e operacionais. Elas são, portanto, suscetíveis a um modelo para pesquisa experimental sobre as propriedades microbidas de descargas elétricas. No entanto, sua aplicação é limitada a tratamentos não uniformes de pequenas áreas (RAIZER et al., 1991; PEKÁREK, 2010; CUBAS et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015)

Comparado aos outros tipos de plasma já citados, as descargas por micro-ondas (Figura 18d) não são geradas sem eletrodos, e sim por um magnetron (normalmente a 2,45 GHz) e são guiados para a câmara de processo por uma onda guiada ou cabo coaxial. Os elétrons presentes no gás de arraste absorvem as micro-ondas, levando ao aumento de energia cinética e, conseqüentemente, a reações de ionização por colisões fixas (EHLBECK et al., 2011). A maior vantagem das descargas por micro-ondas é a configuração sem eletrodo e que pode ser inflamado em ambiente com ar. O consumo de gás é moderado, mas dependendo do gás usado, uma grande quantidade de espécies reativas pode ser produzida (por exemplo,  $N_xO_y$ ,  $O_3$ ,  $O_2^-$  e OH). Entre as desvantagens, está a limitação espacial. Para descontaminação direta de grandes áreas, descargas em determinada ordem são necessárias, em

forma similar ao arranjo de jatos de plasma (UHM et al., 2006; SUROWSKY et al., 2015).

Todos esses tipos de plasma podem ser operados em modo direto ou indireto. Uma aplicação direta usualmente inclui uma grande variedade de espécies reativas, uma vez que a maioria deles age em milissegundos. Plasmas indiretos ou remotos são normalmente gerados em uma câmara separada e podem gerar espécies reativas tais como óxido nítrico e ozônio que entram em contato com os produtos a serem tratados. Uma das vantagens de plasmas indiretos é que energias de ionização muito altas podem ser aplicadas, levando a um forte grau de ionização que torna o plasma mais reativo (STOFFELS et al., 2006).

Atualmente, inúmeras fontes de diferentes plasmas a pressão atmosférica são usadas em pesquisas. Elas diferem em configurações gerais (por exemplo, jato de plasma ou DBD; modo direto ou indireto), o gás de arraste usado, o tipo de excitação e a velocidade de fluxo do gás de arraste, sendo que estas características afetam fortemente a eficácia do plasma, por isso é importante descrever as propriedades da fonte geradora do plasma tão precisamente possível (STOICA et al., 2014; SUROWSKY et al., 2015).

Uma vez que o plasma é gerado e descarregado, ele entra em contato com a matriz a ser tratada, que pode ser um sólido ou um líquido. O processo em geral começa com a criação de um plasma primário, incluindo elétrons e íons em volume de produção, seguido pela formação de íons ou radicais quimicamente ativos. Elétrons, íons e radicais livres bem como radiação eletromagnética no espectro UV/VIS são então posteriormente transferidos à superfície da interface do plasma onde iniciarão processos fundamentais como um processo de transformação (*etching plasma*), deposição, recombinação, não excitação e emissão secundária de sólidos (SCHRAM, 2002).

O processo de transformação (*etching plasma*) pode ser inflamado pelo oxigênio atômico, levando a compostos voláteis como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, acompanhados por uma perda de massa, proveniente de uma separação da primeira camada (atômica) da superfície e também com as reações químicas da superfície, desta forma, habilitando plasma para ser usado como uma técnica de descontaminação (WILLIAMS, 1997; NAGATSU et al., 2005; BERMÚDEZ-AGUIRRE, 2013; STOICA et al., 2014; MOK et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015; OH et al., 2016).

De acordo com Deng et al. (2006), a inativação de micro-organismos por plasma pode ser devido ao efeito do aquecimento, partículas carregadas, campos elétricos, fótons UV e algumas espécies

reativas tais como oxigênio atômico, moléculas de oxigênio metaestáveis, ozônio e radicais hidroxil, que são comumente encontrados em descarga de gás. Em particular, quando argônio (Ar) é usado como gás de arraste e inicia o contato com ar, algumas espécies geradas são átomos de oxigênio, radicais OH, átomos de nitrogênio, radicais NO, íons nitrogênio e átomos excitados de argônio, entre outros (GEORGESCU et al., 2010).

Ratner et al. (1990) relataram que a descontaminação por plasma é eficiente com diversos gases, como O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, ar, H<sub>2</sub>, halogênios, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e SF<sub>6</sub>. O tratamento por plasma tem sido efetivo para inativar ampla faixa de micro-organismos incluindo esporos (FEICHTINGER et al., 2003; LEE et al., 2006; MISRA et al., 2011; STOICA et al., 2014) e vírus (TERRIER et al., 2009;). Também há estudos em que o plasma frio foi usado para redução de micro-organismos em morangos, maçãs, melões, mangas, peras, pimentas e nozes (SHAKILA BANU et al., 2012; KIM et al., 2014; MISRA et al., 2014a, 2014b).

Escassas informações estão disponíveis sobre o mecanismo de inativação de células sob tratamento de plasma, bem como, mudanças físico-químicas que podem ocorrer nos produtos (GRZEGORZEWSKI et al., 2011). Existem hipóteses de que diferentes espécies de plasmas ataquem quimicamente os micro-organismos e podem criar um efeito sinérgico por processos alternativos intracelulares (KLÄMPFL et al., 2012).

### *3.3.3.1 Impacto do plasma na superfície de alimentos*

Surowsky et al. (2015) compilaram diversos estudos sobre a inativação de micro-organismos em superfícies de alimentos sólidos, através de publicações que datam desde 2003. Muitos dos trabalhos lidam com o impacto de determinados parâmetros do processo tais como composição do gás, taxa de fluxo do gás, tempo de exposição ao plasma, potência de entrada e umidade relativa ou o tipo de aplicação do plasma (direto ou indireto) (DENG et al., 2007a; DENG et al., 2007b; KLOCKOW et al., 2008; NIEMIRA et al., 2008; VANNINI et al., 2009; RAGNI et al., 2010; KIM et al., 2011; NORIEGA et al., 2011; RØD et al., 2012; SCHNABEL et al., 2012), enquanto que outros discutem o impacto de fatores importantes como o estado fisiológico dos micro-organismos, que são altamente influenciados pela fase de crescimento e condições de crescimento (temperatura, pH, composição do meio). O impacto da carga microbiana inicial vem sendo investigado em diversos

estudos (SONG et al., 2013; BAIER et al., 2013; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2013; MOK et al., 2015).

O fato de um tratamento por plasma ser de superfície com uma profundidade de penetração baixa, remete à importância de outros dois importantes fatores: as condições da superfície em que os micro-organismos estão localizados e a carga/densidade microbiana que possibilita a formação de biofilme (SUROWSKY et al., 2015).

Critzer et al. (2007) relataram que a superfície de produtos como melão cantaloupe e alface impedem a inativação, devido a superfície irregular que favorece locais para os micro-organismos não serem atingidos por tratamentos antimicrobianos. Fernández et al. (2013) observaram que a topografia do substrato tem uma importante influência na eficácia da inativação bacteriana por plasma. Estruturas de alimentos tais como estômatos da alface, convoluções de superfície de morangos e paredes de células eucarióticas de cortes de batata podem criar barreiras físicas e assim, protegerem células bacterianas. Além disso, fatores intrínsecos como cutícula vegetal (cera) ou outros componentes podem também contribuir para a proteção de bactérias aderidas. Também existe diferença significativa observada na inativação de micro-organismos localizados entre pericarpo das frutas e cortes de superfície.

Perni et al. (2008) examinaram o impacto de plasma frio em diferentes micro-organismos no pericarpo de manga e melão *honeydew* usando jatos de plasma (hélio – oxigênio) e atingiram > 3 log ciclos de inativação após 5 segundos para *E. coli* em ambas superfícies, e para *S. cerevisiae* 10 segundos na manga e 30 segundos no melão. Em contraste, tempos muito mais longos foram necessários quando os mesmos micro-organismos estiveram localizados nos cortes de superfícies dos mesmos alimentos. Os autores relatam que a diferença se baseia na migração do micro-organismo internamente no tecido da fruta, levando a uma redução do impacto das espécies reativas do plasma devido a sua profundidade de penetração limitada. A profundidade de penetração do plasma é também interessante para observar a formação de biofilmes, uma vez que pode consistir de múltiplas camadas e ter espessura de diversos micrômetros. Também há forte limitação se houver camadas adicionais de impurezas como fragmentos de células e sujidades (VLEUGELS et al., 2005; XIONG et al., 2011; JAHID et al., 2014).

### 3.3.3.2 *Impacto do plasma nas propriedades e componentes de alimentos*

Em relação ao impacto nas propriedades e componentes dos alimentos, o plasma frio em pressão atmosférica tem sido proposto para ser uma alternativa promissora aos métodos de pasteurização. Devido ao seu caráter não térmico, alterações típicas do tratamento térmico como mudanças na cor, formação de odores e sabores indesejáveis e perdas de valores nutricionais podem ser minimizados. Nos últimos anos, poucos estudos têm sido publicados analisando o impacto do plasma nos atributos sensoriais, polifenóis, proteínas, enzimas e propriedades como pH e estrutura celular (GAROFULIC et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015).

O impacto do plasma na cor das superfícies dos alimentos é provavelmente o mais estudado, talvez pelo fato deste parâmetro ser um indicador de frescor e qualidade e influenciar a decisão de compra do consumidor. Bermúdez-Aguirre et al. (2013) relataram o efeito do plasma com descarga corona na alface romana e verificaram que o tratamento leva a alterações leves no aumento de  $L^*$  (luminosidade) e  $a^*$  (vermelho/verde) bem como uma leve redução no valor de  $b^*$  (amarelo/azul). Também, o valor  $L^*$  de tomates cereja diminuiu levemente; no entanto, o valor  $a^*$  decresceu enquanto  $b^*$  se manteve intacto. Para salada de milho, tratada com jatos de plasma com argônio – oxigênio, a diferença de cor total ( $\Delta E$ ) aumentou (BAIER et al., 2014). Misra et al. (2014b) avaliando cor em morangos tratados por plasma verificaram que  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  diminuíram ligeiramente mas não significativamente ( $p < 0,05$ ).

Grzegorzewski et al. (2009; 2010) estudaram o efeito sobre os polifenóis, dos quais, a quercetina e o kaempferol foram degradados após 120 segundos de exposição ao plasma, possivelmente pela ação de radicais OH, enquanto miricetina e taxifolina tiveram fraca degradação, levando a crer que as diferenças da estabilidade dependem da presença ou ausência de características estruturais (MAKRIS et al., 2002). Surowsky et al. (2013) relatam que a aplicação de plasma reduz a atividade enzimática, mais precisamente da polifenoloxidase e da peroxidase, que também foram estudadas por Henselová et al. (2012). Tappi et al. (2013) confirmaram o mesmo comportamento em polifenoloxidase em maçã.

Somente a partir de 2012 alguns estudos relativos à característica sensorial dos alimentos tratados por plasma estão disponíveis, sendo alguns relativos a queijo e carne suína, onde o plasma

foi responsável por leves perdas em relação à cor, odor, textura, enquanto a aparência, sabor, aroma e aceitabilidade foram marcadamente reduzidos (LEE et al., 2012; KIM et al., 2013a; KIM et al., 2013b).

### 3.3.3.3 *Impacto do plasma em interações com líquidos*

Além de tratar superfícies sólidas, também pode ser formado plasma em ambiente gás-líquido, bem como diretamente em fase líquida. Um ambiente gás-líquido pode ser, por exemplo, uma fase gasosa com vapor d'água, um sistema gás-líquido (um eletrodo na fase gasosa, um em fase líquida), uma descarga sobre a superfície da água ou uma descarga em bolhas ou com gotas e partículas. Nestes sistemas, o plasma é gerado em fase gasosa contínua e assim entra em contato com as moléculas, aglomerados, gotas e superfícies planas dos líquidos. Em contraste, uma geração direta de plasma na fase líquida pode ser realizada pela formação de microbolhas e por regiões de baixa densidade líquida e, líquido aquecido pela energia de entrada na fronteira líquido-eletrodo (KOLB et al., 2008; LEWIS, 2008; JOSHI et al., 2009; SUROWSKY et al., 2015).

O plasma gerado em ambiente gás-líquido é similar ao “normal” de fase gasosa. A diferença entre eles está no fato de que líquidos agem como um eletrodo adicional, que oferece novos e interessantes comportamentos físicos e químicos, bem como, aplicações. Em comparação com plasma gerado diretamente em líquidos, a força dielétrica é menor (kV/cm vs. MV/cm) (SUNKA, 2001; KOLB et al., 2008).

No contexto de mecanismos físicos, a umidade da fase gasosa se apresenta importante. Usando uma descarga corona contínua do tipo “ponta-plano”, tem sido mostrado que à medida que há aumento da umidade, a voltagem inicial corona diminui devido aos baixos coeficientes de ionização e baixa mobilidade dos íons, levando a um decréscimo da corrente corona (BIAN et al., 2010).

Estudos têm mostrado que o campo elétrico para formação de descargas de flâmulas estáveis e rupturas, aumenta com a umidade o que é devido às elevadas reações de recombinação do íon elétron (ALEKSANDROV et al., 1998; MIKROPOULOS et al., 2008). No caso do plasma ser gerado na fase gasosa próximo a uma superfície líquida, as propriedades do líquido como condutividade, pH e temperatura bem como a composição do gás, o material do eletrodo e a polaridade do campo podem ter um impacto importante nas propriedades do plasma

(LOCKE et al., 2006; BRUGGEMAN et al., 2009; THAGARD et al., 2009).

Uma vez que o plasma entra em contato com moléculas de água, reações de dissociação com elétrons ocorrem, dependendo do conteúdo de água e da energia do elétron. Os tipos de reações químicas que ocorrem na interface gás-líquido são:

a. reações ácido-base: efeitos ácidos podem ser causados por espécies secundárias formadas pelo plasma, por exemplo, ácido nítrico e ácido nitroso, espécies de nitrogênio excitados e seus produtos ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ) e a formação do oxigênio singlet (BRISSET et al., 1990), além de peróxido de hidrogênio e íons hidrogênio como produtos de espécies primárias (OH e O) e secundárias ( $H_2O_2$  e  $O_3$ ), bem como uma ionização induzida pelo plasma de moléculas de água que podem levar à diminuição do pH (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; MOK et al., 2015).

b. Reações de oxidação causadas por espécie reativa do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS): são as mais importantes reações do plasma quando se relaciona a inativação de micro-organismos ou degradação de compostos orgânicos. A maior ROS formada em líquidos é o OH, que pode ser gerado pela dissociação e ligações de elétrons, além da dissociação térmica e íons estáveis e metaestáveis. No entanto, a concentração de OH é claramente afetada, por exemplo, pela umidade da fase gasosa, presença de óxidos de nitrogênio e possibilidade de reações de recombinação que levam a produtos moleculares estáveis (PEYROUS et al., 1989; CHEN et al., 2005; SOLOSHENKO et al., 2009; KANAZAWA et al., 2011; THAGARD et al., 2009). As RNS também são interessantes em relação à oxidação de compostos orgânicos em ambiente gás-líquido. Através da reação de NO com radicais OH, nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) são formados, podendo influenciar o pH do líquido e levar a geração de peroxinitritos altamente reativos que possibilitam o estresse oxidativo nos lipídeos das membranas celulares. No entanto, a ação do peroxinitrito depende fortemente do pH do líquido (sendo mais favorável em ambientes com  $pH < 6,8$ ) (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; MOK et al., 2015).

c. Reações de redução causadas por espécies redutoras (por exemplo, radicais H e OH): se tratando de ambiente gás-líquido, radical hidrogênio (H) e radical superóxido ( $O_2^-$ ) são os mais importantes agentes redutores, sendo relevantes na degradação de compostos em alta afinidade com elétron e compostos contendo grupos de nitrogênio. Segundo Watts et al. (1999), mais uma vez, o pH é

importante para que ocorra essas reações, visto que  $O_2^-$  é predominante ativo em valores de pH > 4,8, pois abaixo disto, age como agente oxidante na forma de radical peridroxil ( $HO_2$ ) (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013).

d. Reações fotoquímicas iniciadas pela radiação UV do plasma: na faixa entre 190 e 350 nm, a emissão UV pode dissociar peróxido de hidrogênio, levando a formação de radical hidroxila e ozônio, conduzindo a geração de oxigênio atômico (SEINFELD et al., 2012). Compostos orgânicos presentes no líquido podem então ser atacados pela fotólise direta ou indireta (por exemplo, pela dissociação de  $H_2O_2$ ) (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013).

Em contraste com a inativação de micro-organismos em superfícies sólidas, em que o plasma pode afetar diretamente a membrana celular externa e ser transportado para o interior da célula onde pode ocorrer destruição do DNA, proteínas e outros componentes internos, algumas das espécies de plasma necessitam ser solúveis em água a fim de serem aptas a atingir a célula bacteriana. Além disso, compostos ativos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, ânions superóxidos e radicais peridroxil são formados na interface plasma-líquido, fazendo dos líquidos uma matriz suscetível para a aplicação de plasma para descontaminação (MOK et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015).

Satoh et al. (2007) atingiram aproximadamente 4 ciclos log de inativação para *E. coli* em água. Os autores sugerem que o ozônio formado é uma das espécies-chave envolvida na ação bactericida. O uso de nitrogênio e ar como gás do processo leva a acidificação do líquido, o que pode também contribuir para a inativação microbiana. Ao contrário, leites com diferentes conteúdos de gordura expostos à descarga corona com ar como gás de arraste não acarretaram decréscimo no pH, segundo relatado por Gurol et al. (2012), que ressaltam que o conteúdo de gordura no leite não afeta a suscetibilidade da *E. coli* ao tratamento, mas revela uma potencial desvantagem do processo de plasma para inativação microbiana em substratos gordurosos, assim como ressaltam também Goff et al. (1993).

Mais trabalhos em relação à interação plasma-líquido e geração de espécies reativas dependentes do pH foram citados por Ikawa et al. (2010) que atingiram reduções acima de 6 log quando a solução foi mantida suficientemente ácida devido aos radicais hidroperóxidos formados. Liu et al. (2010) obtiveram efetiva inativação de *S. aureus* quando o pH de 4,5 decresceu, degradando ácidos graxos das membranas dos micro-organismos pelo potencial oxidativo dos radicais



hidroperóxidos. Shi et al. (2011) concluíram que o decréscimo do pH em suco de laranja induzido pelo plasma frio teve um insignificante papel na inativação de micro-organismos e predizem que as espécies reativas (ROS e RNS) desempenham um papel predominante na inativação microbiana.

Em relação ao plasma para esterilização de líquidos, algumas publicações relatam que o líquido por si só já apresenta atividade bactericida após o tratamento com plasma. Kamgang-Youbi et al. (2009) relataram que a combinação da ação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nitrito e nitratos, e acidificação do meio, foram responsáveis pela inativação. Surowsky et al. (2014) relataram subsequente ação bactericida em suco de maçã contendo *Citrobacter freundii*, onde não apresentou mudanças no pH e nem 1 log ciclo de redução pôde ser obtido após exposição ao plasma. Mas, depois de 3 h, foi observada uma redução de mais de 4 log e após 24 h estocada, mais de 5 ciclos log de redução foram atingidos, mostrando que o plasma continua agindo após o tempo de exposição.

Quanto a influência do plasma no pH de líquidos, leite tratado em plasma com ar e soluções líquidas (ácido fosfórico, solução tampão-fosfato salina) com argônio não apresentaram mudanças no pH depois da exposição ao plasma. Em relação a cor do leite, suaves decréscimos foram obtidos para L\*, enquanto a\* não mudou e b\*, assim como a diferença de cor total ( $\Delta E$ ), apresentou leves aumentos (GUROL et al., 2012).

Ainda há falta de pesquisas sobre o efeito do plasma em relação às alterações de parâmetros de qualidade em alimentos. Todavia, recentes estudos incluem medidas de cor e pH, mas é necessário avaliar parâmetros gustativos e olfativos de alimentos tratados por plasma, além de levar em conta o impacto na determinação da qualidade sob os componentes como vitaminas, polifenóis e nutrientes. Também é importante obter dados relacionados a constituintes alergênicos após tratamento por plasma. Em se tratando de análise sensorial, a aceitação do mercado/consumidor de alimentos processados por plasma é essencial, visto que se utiliza de uma tecnologia emergente em que o poder de decisão de compra do consumidor não pode ser afetado negativamente. Estas questões mostram claramente que processamento de plasma em alimentos ainda é recente e futuras pesquisas são necessárias antes de tal processo ser aplicado na indústria, mas os resultados apresentados em publicações até o momento são promissores

e apontam muitas vantagens da utilização de plasma a frio em pressão atmosférica (MOK et al., 2015; SUROWSKY et al., 2015).

## **Capítulo 4 – MATERIAL E MÉTODOS**

---

Este trabalho foi realizado em quatro etapas, conforme o fluxograma representado na Figura 19.

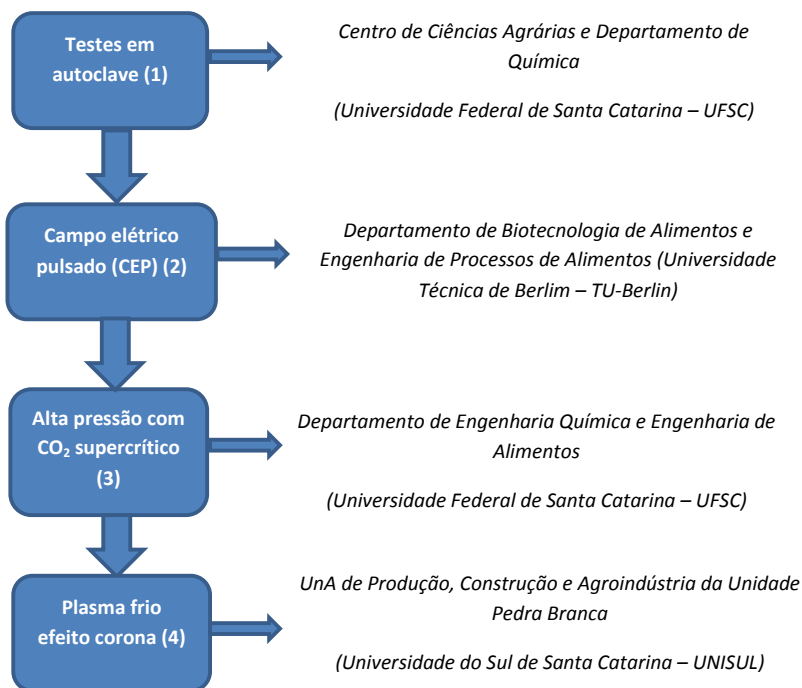
A primeira etapa (1), relativa ao estudo da esterilização do purê de abóbora em autoclave e os compostos voláteis no *headspace*, foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria atômica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis/SC.

A segunda etapa (2), relativa ao campo elétrico pulsado (CEP) foi realizada no Departamento de Biotecnologia de Alimentos e Engenharia de Processos de Alimentos do Campus III da Universidade Técnica de Berlim (*TU-Berlin*) em Berlim, na Alemanha.

A terceira etapa (3), envolvendo a pesquisa em alta pressão com dióxido de carbono pressurizado (APDC) foi realizada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica II (LATESC-II) e Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), bem como no Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças e Laboratório de Microbiologia de Alimentos 2 do Centro de Ciências Agrárias (CCA) e Departamento de Botânica (BOT) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), todos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis/SC.

A quarta etapa (4), que abrangeu o tratamento em plasma frio, foi realizada no Laboratório de Plasma e na Unidade de Articulação Acadêmica (UNA) de Produção, Construção e Agroindústria, da Unidade Pedra Branca da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) em Palhoça/SC e nos Laboratórios de Tecnologia de Frutas e Hortaliças e Microbiologia de Alimentos 2 do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis/SC.

**Figura 19** - Fluxograma de locais onde foram realizadas as etapas da pesquisa em purê de abóbora.



#### 4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

As abóboras do tipo “menina brasileira” (*Cucurbita moschata*) usadas para a produção de purê para as etapas de esterilização em autoclave, APDC e Plasma frio, foram obtidas de um estabelecimento comercial local de Florianópolis - SC, procedentes da cidade de Angelina – SC. As abóboras para CEP foram da variedade “*butternut*” (*Cucurbita moschata*), obtidas de um supermercado local (Edeka Zentrale AG & Co. KG – Berlim, Alemanha) em Berlim - Alemanha.

Para a produção do purê de abóbora, foi utilizada a parte interna da fruta, sendo descartadas as sementes e as cascas após a cocção. Para a etapa de tratamento térmico em autoclave, a embalagem utilizada para acondicionar o purê de abóbora foi a embalagem flexível do tipo *retort stand up pouch*, nylon aluminizado, fornecida pela ICB Packing® (Cotia – SP) nas dimensões 19×16×4 cm. Nas demais etapas, frascos

com tampa de rosca do tipo “*schott*” foram escolhidos para acondicionar as amostras.

#### 4.2 PREPARO E PROCESSAMENTO DO PURÊ DE ABÓBORA

Em todas as etapas, as abóboras foram higienizadas com detergente neutro e lavadas para remover os resíduos destes. Em seguida, foram retiradas as partes injuriadas da casca e as amostras foram cortadas em fatias. Na sequência, os cortes foram cozidos em vapor por 20 minutos, conforme determinado previamente pelo teste com o cozedor de Matson e de acordo com o tratado por Provesi (2010). Os cortes de abóbora cozidos foram resfriados, descascados e suas sementes foram removidas. Com isso, elaborou-se o purê mediante esmagamento manual, exceto para a etapa (2) onde se utilizou um liquidificador doméstico (Braun K3000, Kronberg, Alemanha) e um homogeneizador Ultra Turrax (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Alemanha).

Após o preparo do purê, para a realização da etapa (1), esterilização em autoclave e análise dos componentes voláteis do *headspace* em CG-MS, o purê de abóbora obtido foi acondicionado em embalagem flexível *retort stand up pouch* e lacrado em seladora com termostato (SP 400-TE, SULPACK – Caxias do Sul, Brasil). Em cada embalagem foram armazenados de 30 a 100 g de purê de abóbora.

Para a etapa (2), após trituração em liquidificador e homogeneização em Ultra Turrax, foram acondicionados 30 g de purê de abóbora em cada frasco com tampa rosca (*schott*).

Para as etapas (3) e (4), o procedimento foi semelhante à etapa (2), sendo armazenados de 25 a 30 g de purê de abóbora pronto por esmagamento manual em frascos do tipo *schott*.

Após serem acondicionados, os purês em todas as etapas seguiram para a esterilização em autoclave vertical (AVM, Marte, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Na etapa (2), o equipamento utilizado foi uma autoclave vertical automatizada (Varioklav Steam Sterilizer 500E, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Alemanha). Após a esterilização, todas as amostras foram armazenadas em refrigerador a 4 °C.

Na etapa (1), o objetivo foi verificar o efeito do tratamento térmico no purê de abóbora acondicionado em embalagens flexíveis em função do tempo de tratamento. Foram realizados testes preliminares de esterilização em 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, com eficácia avaliada por contagem para *Clostridium* sulfito redutor. Como a contagem de *Clostridium* sulfito redutor em todas as condições foi  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g,

conclui-se que o método foi eficiente. Sendo assim, baseou-se nestes resultados microbiológicos preliminares para selecionar três condições para as análises subsequentes. As condições escolhidas foram de 10, 20 e 30 minutos, no intuito de ampliar a faixa de investigação em relação ao tempo de esterilização, analisando seus parâmetros físico-químicos e, na sequência, a composição volátil do *headspace* da amostra em embalagem *pouch stand up*.

Na etapa (2), após preparo do purê e esterilização em autoclave, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5804 R, Hamburgo, Alemanha) por 15 minutos a 4500 rcf para obter o centrifugado (suco) da abóbora e facilitar os passos subsequentes das análises. Este procedimento foi necessário, pois nesta etapa que utiliza o CEP em batelada, não é viável manipular pequenos volumes de purê (da ordem de  $\mu\text{L}$ ) necessários para a realização destes testes. Sendo assim, na sequência, as amostras de suco de abóbora foram autoclavadas a 121 °C por 5 minutos, o suficiente para esterilizá-las, conforme testes preliminares. Ainda em relação às condições que foram sequencialmente testadas, uma amostra de suco de purê diluído (néctar) com proporções 70:30 v/v (70% de suco de abóbora e 30% de água destilada) foi usada com a finalidade de diminuir a condutividade elétrica da amostra que se apresentou elevada em alguns casos.

Na etapa (3) não foi necessária nenhuma adaptação no preparo do purê de abóbora para o tratamento em APDC e análises físico-químicas.

Na etapa (4) foi necessário diluir a amostra (25 g) com aproximadamente 15 mL de água destilada para que o purê ficasse com o mínimo de adequação ao tratamento de Plasma frio, uma vez que a configuração do equipamento necessitava de agitação da amostra durante o seu funcionamento por um agitador magnético, para que a maior quantidade possível de amostra fosse atingida pelo plasma.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PURÊ DE ABÓBORA

Para a caracterização do purê de abóbora foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas. Os experimentos foram realizados em suco e néctar (etapa 2) e purês (etapas 1, 3 e 4) de abóbora. As análises físico-químicas foram realizadas na abóbora *in natura* (etapas 1, 3 e 4) e nos purês elaborados do mesmo lote sem esterilização e com esterilização em autoclave (121 °C) e detalhadas em sequência.

As análises da etapa (1) foram realizadas no mesmo dia, enquanto que para os tratamentos não térmicos (etapas 2, 3 e 4) as amostras ficaram acondicionadas em refrigeração (4 °C) até o momento da realização das análises.

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho apresentam grau analítico (p.a.) e cromatográfico quando necessário, sendo utilizados sem prévia purificação.

#### **4.3.1 Condições de processamento do purê de abóbora para análises**

As análises físico-químicas do purê de abóbora foram realizadas antes e depois dos processos. A eficiência dos processos testados foi avaliada através de análises microbiológicas após a esterilização dos purês de abóbora inoculados com o micro-organismo alvo.

Na etapa (1), as análises do purê de abóbora acondicionado em embalagens flexíveis *pouch* foram realizadas em amostras sem esterilização (PNE – purê não esterilizado) e com esterilização (PE – purê esterilizado) em autoclave por diferentes tempos. Após testes preliminares (seção 4.2), ficaram determinadas as três condições a serem avaliadas (10, 20 e 30 minutos): PE-10 (purê esterilizado por 10 minutos); PE-20 (purê esterilizado por 20 minutos) e PE-30 (purê esterilizado por 30 minutos). A matéria prima *in natura* (AIN – amostra *in natura*), sem tratamento prévio (abóboras cruas) também foram avaliadas. Desta forma, todas as análises foram realizadas em triplicata.

Na etapa (2), as amostras centrifugadas (100% suco de abóbora) e centrifugadas e diluídas 70:30 (70% de suco de abóbora e 30% de água destilada), esterilizadas e acondicionadas em frascos *schott* foram encaminhadas para o tratamento de CEP e análises físico-químicas. Para o tratamento CEP, as amostras foram inoculadas com o micro-organismo alvo e este procedimento foi realizado em duplicata, inclusive o plaqueamento. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

#### **4.3.2 Análises físico-químicas**

As amostras de abóbora *in natura* e os purês de abóbora sem esterilização e com esterilização foram avaliados em triplicata.

Na etapa (1) as amostras foram avaliadas quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT), e carotenoides totais.

Na etapa (2), as amostras antes de serem submetidas ao CEP foram avaliadas quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS) e condutividade elétrica.

Na etapa (3), as amostras antes e depois de submetidas a APDC foram avaliadas quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT), açúcares redutores (TRS), carotenoides totais e umidade.

Na etapa (4), as amostras antes e após submissão ao plasma a frio foram avaliadas quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT) e carotenoides totais.

#### 4.3.2.1 Determinação de pH

Nas etapas (1), (3) e (4), o pH das amostras foi determinado por leitura direta em pHmetro digital (Quimis, Diadema/SP, Brasil) com 20 g de amostra imersa em 50 mL de água destilada em temperatura ambiente. Na etapa (2), foi realizada por leitura direta em 25 mL de amostra em pHmetro digital (Digital pHmeter Knick, Berlim, Alemanha) em temperatura ambiente.

#### 4.3.2.2 Teor de sólidos solúveis totais (TSS)

O teor de sólidos solúveis totais (° Brix) nas etapas (1), (3) e (4) foi determinado com a utilização de refratômetro modelo tropen (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) em temperatura ambiente, e os resultados expressos em °Brix ( $\text{g}_{\text{sacarose}}$  por 100 g). Na etapa (2), foi utilizado um refratômetro digital (RFM 80 Digital Refractometer, Research Equipment Engineering, Hannover, Alemanha).

#### 4.3.2.3 Acidez titulável (AT)

A acidez titulável foi determinada nas etapas (1), (3) e (4) conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2003). Foram pesados 5 g de amostra, adicionados de 50 mL de água destilada em copo de Becker de 100 mL. Em seguida, foi realizada a titulação com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob agitação até atingir pH 8,2. O cálculo utilizado para determinação da acidez titulável (AT) foi conforme a Equação 13.

$$AT (\%) = \frac{V \times f \times 100}{m \times c} \quad (13)$$

Onde:

$V$  = volume de NaOH titulado (mL)

$f$  = fator da solução de NaOH

$m$  = massa da amostra (g)

$c$  = correção para a solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (10 para NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>)



#### 4.3.2.4 Carotenoides totais

As análises de carotenoides totais foram realizadas para as etapas (1), (3) e (4). A extração dos carotenoides da matriz foi realizada utilizando a metodologia de Rodriguez-Amaya (1999).

Em um almofariz previamente refrigerado foi colocado 1 g de amostra triturada e 50 mL de acetona resfriada (*overnight*). As amostras foram trituradas e os extratos foram filtrados em funil com papel filtro (Whatman nº 4), acondicionando o filtrado em balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, 40 mL de éter de petróleo foram adicionados em funil de separação de 500 mL e o extrato transferido para este funil. Adicionou-se 300 mL de água destilada, agitado delicadamente e deixado descansar para separação das fases. Após separar as fases, descartou-se a parte aquosa e repetiu-se a lavagem por quatro vezes com 300 mL de água destilada para remoção total da acetona. A fase etérea foi coletada em balão volumétrico de 50 mL, recoberto com papel alumínio, passando a solução por um funil de vidro contendo aproximadamente 15 g de sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. Completou-se o volume com éter de petróleo. A diluição da amostra com éter de petróleo (1:1) foi necessária para estar na faixa de absorvância entre 0,2 e 0,8. A absorvância foi medida em 450 nm.

#### 4.3.2.5 Análise instrumental de cor

As alterações na coloração da etapa (4) foram avaliadas nas amostras *in natura* e após tratamento do plasma a frio, através da utilização de um colorímetro (Konica Minolta, Itália), utilizando a escala de cor CIE L\* a\* b\* (CIELAB) com iluminação D65 e ângulo de observação de 8°. O espaço de cores desse sistema é organizado em coordenadas cartesianas, onde L\* indica luminosidade (100 para branco e 0 para preto), o eixo a\* representa uma escala do verde (- a\*) ao vermelho (+ a\*), e o eixo b\* uma escala do azul (- b\*) ao amarelo (+ b\*). Foram realizadas 5 leituras em cada unidade amostral.

#### 4.3.2.6 Análise da condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi medida na etapa (2) em triplicata, através de um condutivímetro digital (WTW Conductivity Meter – Weilheim Cond 3110, Berlin, Germany).

#### 4.3.2.7 Análise de açúcares redutores totais (ART)

A análise de açúcares redutores foi realizada na etapa (3) usando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) utilizando 3,5 ácido dinitrosalicílico e realizando leitura em triplicata por espectrofotômetro

a 540 nm (Miller, 1959).

#### 4.3.2.8 Determinação de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada na etapa (3) pelo método gravimétrico em estufa a 105 °C.

#### 4.3.3 Análise de compostos voláteis no *headspace* por SPME

As amostras de purê de abóbora da etapa (1) não esterilizado e esterilizado nos tempos 10, 20 e 30 minutos foram avaliadas quanto à composição dos voláteis no *headspace* da embalagem selada, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM). O purê de abóbora não esterilizado serviu como amostra controle. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A extração dos compostos ocorreu com o emprego do método de microextração em fase sólida no *headspace* da embalagem (HS-SPME), utilizando como fase extratora a fibra de DVB/CAR/PDMS (*divinilbenzeno, carboxen em polidimetilsiloxano*) (50/30 µm de espessura/ 2 cm de comprimento) para partição dos compostos voláteis presentes na amostra. Para esta análise, foram consideradas 50 g de purê de abóbora, suficientes para gerar compostos voláteis no *headspace* da embalagem. O tempo de equilíbrio anterior à extração, para a amostra atingir uma temperatura de 40 °C, foi de 10 minutos e realizado em banho termostatizado. Ao ser atingida esta condição, a fibra foi exposta ao *headspace* da embalagem em temperatura de equilíbrio para 30 minutos de adsorção.

Após 30 minutos de exposição à fibra, o suporte de SPME foi imediatamente levado ao injetor (modo *splitless*) do cromatógrafo a gás (GC-MS QP-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão).

O cromatógrafo foi equipado com coluna capilar Restek Rtx<sup>®</sup>-5MS, (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) (Restek, Bellefonte, PA, USA), no qual os compostos voláteis foram dessorvidos a 250 °C durante 10 minutos. A separação dos compostos voláteis do purê foi realizada com base em condições cromatográficas específicas, consistindo de: rampa de aquecimento iniciando a 40 °C e mantendo-se por 4 minutos; após, a taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até atingir 195 °C. O gás de arraste utilizado foi o Hélio (He) ultra puro (99,99 %) com uma velocidade linear de 36,1 cm.s<sup>-1</sup>. A temperatura da interface e da fonte de íons foi de 260 °C e 230 °C, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado no modo de impacto de elétrons (EI) com a fonte de íons operando a 70 eV. A identificação dos compostos voláteis foi realizada utilizando um *software* da biblioteca NIST 05 acoplado ao CG-EM.

Somente os picos com intensidade absoluta superior a 50000 e probabilidade maior que 85 % foram considerados.

#### 4.3.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas dos purês de abóbora preliminares ao tratamento térmico em autoclave (etapa 1) foram realizadas no Laboratório de Análises (LABCAL) no Centro de Ciência Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) de acordo com o método da *American Public Health Association* (APHA) (2001). O micro-organismo indicador da esterilização do purê de abóbora foi o *Clostridium* sulfito redutor, pois se trata de uma bactéria do grupo dos anaeróbios mesófilos, que causam, com maior frequência, deterioração dos alimentos meio ácidos e ácidos (pH > 4,6) a partir da fermentação de açúcares, amido e pectina (JAY, 2005).

Nas etapas (2), (3) e (4), um dos objetivos foi avaliar a eficiência de cada tratamento considerado não térmico com base na inativação de micro-organismos. Por esta razão, o micro-organismo indicador desta eficiência foi a *Escherichia coli* em todos os processos a seguir.

Na etapa (2) visando à inativação microbiana por CEP, culturas de *E. coli* K12DH5a (*Hygiene Institut*, Hamburgo, Alemanha) foram preparadas de um banco de culturas 24 horas antes de cada experimento por inoculação de 50 mL em caldo nutriente. Caldo nutriente padrão I (*Standard I Nutrient Broth* - Oxoid, Basing stoke, Reino Unido) foi usado como meio de cultura. O método de plaqueamento em ágar nutriente foi usado para determinar a contagem total (UFC/mL). Todas as análises microbiológicas desta etapa (2) foram realizadas em duplicata. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C para obtenção de cultura na fase estacionária de crescimento. A contagem do crescimento de colônias microbianas em ágar padrão a 37 °C por 24 horas foi expressa em UFC/mL. Os níveis de inativação,  $\log N/N_0$ , foram avaliados para cada teste, todos em função da energia específica calculada ( $W_{\text{específico calculado}}$ ) em J/g. A contagem inicial foi de  $10^8$  UFC/mL.

Nas etapas (3) e (4), que também objetivaram atingir a inativação microbiana por APDC e plasma frio, a técnica Petrifilm (3M®) para contagem de *E. coli*/coliformes para determinar a concentração inicial e a eficiência do tratamento na redução do número de micro-organismos propagados pela superfície das amostras. Para a inoculação, 100  $\mu$ L de cultura pré ativada foram adicionados para cada amostra de 25 g e cuidadosamente misturados por aproximadamente 3

minutos com uma espátula higienizada e flambada para assegurar a distribuição total do inóculo na amostra. As amostras inoculadas foram estocadas a 37 °C por 1 hora até serem plaqueadas para a contagem inicial. Para a etapa (3), aproximadamente 3 horas depois da contagem inicial, o tratamento de APDC se iniciou, enquanto que para a etapa (4) o processo ocorreu imediatamente após a contagem inicial.

A uniformidade da distribuição do inóculo foi confirmada pela similaridade entre as contagens iniciais (entre 5 e 6 log UFC/g) em Petrifilm™ (3M, *Microbiology Products Co.*, St Paul, MN, Estados Unidos) seletivo para *E. coli*/coliformes. 1 mL de amostra foi diluída assepticamente e transferido para o centro da superfície do ágar Petrifilm™. Uma cobertura plástica fina foi vagarosamente abaixada e delicadamente pressionada sobre a superfície do ágar, para evitar a formação de bolhas de ar, e espalhar para distribuir a amostra no ágar, ficando por aproximadamente 1 minuto sem perturbações para permitir a solidificação. Água peptonada (AP) 0,1% (1:9 v/v) foi adicionada a cada controle e cada amostra tratada em APDC e plasma frio, individualmente, para as etapas de diluição. Então, a mistura de amostra e AP 0,1% foi homogeneizada por 1 minuto pela agitação dos frascos/tubos. A amostra homogeneizada (alíquota de 1,0 mL) após diluição seriada (diluição em decimal) foi plaqueada em Petrifilm™ específico para *E. coli*/coliformes. As placas foram empilhadas e incubadas horizontalmente em estufa, livre de qualquer interferência, a 37 °C por 24 horas. Após este tempo, as colônias com coloração azul ou azul-avermelhada com formação de gás nas bordas, foram contadas e convertidas para logaritmos (base 10) de unidade formadora de colônias (UFC/g) ( $\log_{10}$  UFC/g).

O grau de inativação após tratamento com CEP (2), APDC (3) e plasma frio (4) foi determinado pela avaliação do log (N) em função do tempo (t), onde N (UFC/g, unidades formadoras de colônia por grama) é o número de sobreviventes após o tratamento de acordo com a Equação (14).

$$\text{Redução} = \log \left( \frac{N_0}{N} \right) \quad (14)$$

Onde:  $N$  e  $N_0$  são a contagem microbiana no tempo  $t$  e no início do tratamento, respectivamente.

Três experimentos independentes foram realizados para cada uma das condições experimentais e os resultados foram apresentados com valores médios e desvios padrão, determinados de acordo com a contagem total em placas Petrifilm™ seletivas para *E. coli*/coliformes.

Os efeitos da pressão foram avaliados pelas médias do delineamento experimental apresentado na Tabela 4 (seção 4.5). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente através do software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, Estados Unidos), considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.5 Microscopia ótica

A microscopia ótica foi realizada para verificar possíveis alterações na estrutura celular do purê de abóbora apenas na etapa (3), antes e após o tratamento em APDC. Um teste histoquímico foi realizado usando a técnica reativa de Steinmetz de acordo com a metodologia proposta por Costa (1982). As micrografias das estruturas foram realizadas com microscópio LEICA DM2500. A coloração foi feita com o uso do corante “Blue Astra”, como proposto por Maácz e Jobs (1961); a agregação da cor que ocorre nos espaços intermicelares da celulose então destacou as paredes celulares primárias. O material foi exposto ao corante por 5 minutos e em seguida, por lavagem em água destilada. As imagens foram gravadas no formato de fotografia digital e aumentadas 400 vezes.

#### 4.4 TRATAMENTO EM CAMPO ELÉTRICO PULSADO (CEP)

O tratamento via campo elétrico pulsado (CEP) foi realizado em um sistema de batelada. Os requerimentos necessários para tal foram: um computador central para controlar a alta variabilidade dos parâmetros do processo; um gerador de alta voltagem (fonte) de 35 kV, 80 mA (HCK 800M-20000, FUG, Rosenheim, Alemanha) usado para fornecer a energia elétrica a um banco de capacitores; um banco de capacitores com 1,91 nF de até 6 capacitores em paralelo com capacidade de obter até 40,8 nF (Ceramite Y5U 6800Z, Behlke, Kronberg, Alemanha). Uma unidade de chave comutadora (*switch*) HTS 160-500 SCR, 35 kV, 5 kA, 2 kHz (Behlke, Kronberg, Alemanha) foi usada na unidade, conectada em série para os circuitos de descarga com resistor de proteção de 2,5 ohm (Stervice, França). Esta chave foi protegida contra corrente reversa por um diodo de roda livre (FDA 150-200, 20 kV, 1,5 kA, Behlke, Kronberg, Alemanha) e engatilhado por um sinal TTL de um gerador de frequência (AFG 320 Sony Tektronix, Beaverton, Estados Unidos). Como chave da fonte geradora de alta voltagem, uma A400, 5 V, 2 A (SEM Power, Basingstoke, Reino Unido) foi usada e uma câmara de tratamento com configurações de

eletrodo em paralelo.

A largura dos pulsos de  $0,8 - 1 \mu\text{s}$  (determinados em 37% do pico de voltagem), dependentes da condutividade do meio de tratamento e da câmara de tratamento usada, foram aplicados a uma frequência de 3 Hz, em diferentes forças de campo elétrico (com um máximo de  $35 \text{ kV/cm}$ ) e tempos de tratamento e a uma temperatura ambiente (em torno de  $20^\circ\text{C}$ ). A distância entre os eletrodos na cubeta foi de  $0,2 \text{ cm}$ .

Os parâmetros dos pulsos foram controlados pela alta voltagem em um sensor de corrente, conectados a um osciloscópio TDS220 (Sony Tektronix, Beaverton, Estados Unidos). A aquisição dos dados e o controle foi realizado em um computador (PC) conectado por um cabo GPIB, usando um software desenvolvido baseado no “*Test Point*” (Keithley Instruments, Cleveland, Estados Unidos). A unidade foi usada para fornecer energia pulsada às cubetas em bateladas. Uma detalhada descrição da câmara de tratamento (Figura 20) e outras configurações a partir dela e do procedimento de simulação numérica encontram-se em Toepfl (2006).

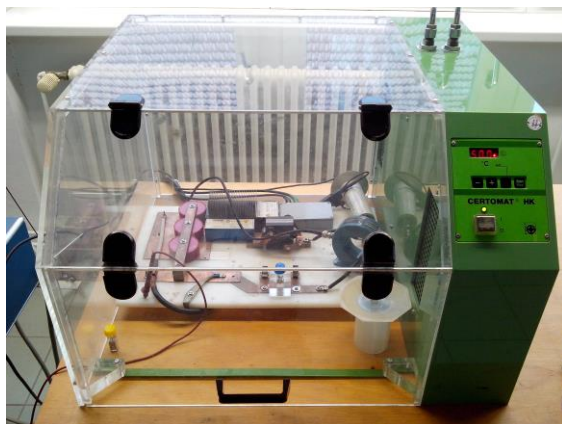
**Figura 20** - Modulador de pulsos da câmara de tratamento de CEP.



Fonte: Toepfl (2006)

Para avaliar o efeito da temperatura, um teste foi realizado a  $40^\circ\text{C}$ . As temperaturas foram ajustadas por um sensor na câmara de tratamento que regula a temperatura interna da câmara (Figura 21), com configuração descrita por Toepfl (2006).

**Figura 21** - Câmara de tratamento com sensor de ajuste de temperatura interna.



Fonte: autor.

A energia específica aplicada calculada ( $W_{\text{específico calculado}}$ ) foi avaliada como uma função da voltagem aplicada ( $V$ ), da capacidade ( $C$ ), do número de pulso ( $n$ ) e da massa da amostra ( $m$ ) de acordo com a Equação 15.

$$W_{\text{específico calculado}} = \frac{0,5 \cdot V^2 \cdot C \cdot n}{m} \quad (15)$$

Os testes foram realizados em duplicata. Amostras de suco de abóbora (centrifugado da abóbora) com um inóculo de *E. coli* K12DH5a (*Hygiene Institute*, Hamburgo, Alemanha) (1:100), em cubetas acrílicas com 2 eletrodos foram passados através da corrente elétrica. Aproximadamente 450  $\mu\text{L}$  (0,45 mL) de amostra foram colocadas nas cubetas para cada teste.

Após o tratamento de CEP, a cubeta contendo a amostra na câmara de tratamento (Figura 21) foi retirada da mesma e imediatamente colocada em um recipiente com gelo.

A Tabela 3 ilustra as condições operacionais para a aplicação de CEP no suco e néctar de abóbora. Amostras com 70% e 100% de suco de abóbora foram tratadas e a condutividade elétrica avaliada em cada caso.

**Tabela 3** - Condições operacionais para a aplicação de CEP no suco e néctar de abóbora, obtidos a partir do purê de abóbora.

Parâmetros	Valores
Temperatura inicial (°C)	20 e 40
Distância entre os eletrodos (cm)	0,2
Massa da amostra (mL)	0,40 a 0,46
Capacidade (F)	1,91
Frequência (1/s)	3
$\tau$ ( $\mu$ s)	0,8 à 1,0

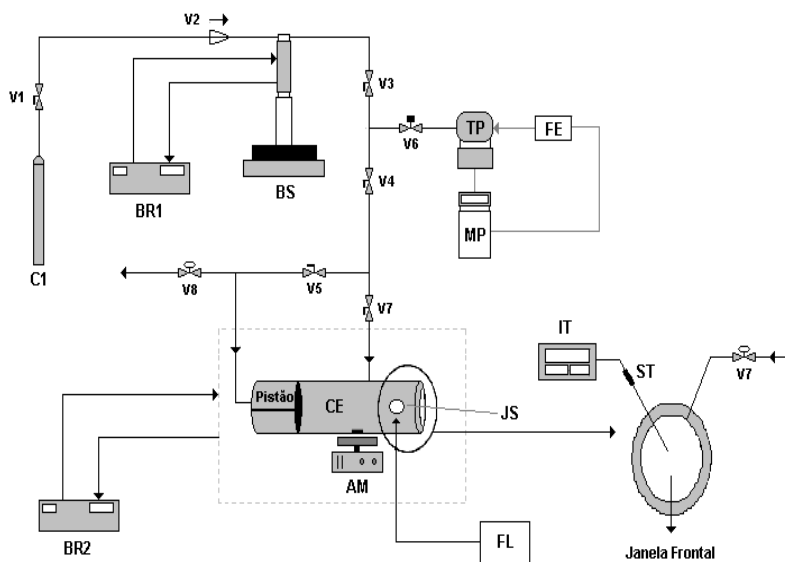
#### 4.5 TRATAMENTO EM ALTA PRESSÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO (APDC)

Todos os experimentos envolvendo o emprego de CO<sub>2</sub> supercrítico foram realizados com o mesmo aparato experimental e seguindo um procedimento padronizado.

As medidas experimentais de inativação de *E. coli* em alta pressão foram realizadas em uma célula (vaso) de volume variável. A Figura 22 ilustra o diagrama esquemático da unidade experimental utilizada neste estudo.



**Figura 22** - Diagrama esquemático do aparato experimental de APDC utilizado no processamento do purê de abóbora.



Onde:

**C1:** reservatório de solvente - armazenamento do solvente utilizado nos experimentos;

**V1:** válvula de esfera (Marca HOKE, Modelo 7155F2Y). Esta válvula, quando aberta, permite o escoamento do solvente do cilindro para bomba;

**BR:** banho de recirculação (Marca QUIMIS, Modelo 214M2) - é usado para manter a temperatura no cilindro da bomba constante;

**BS:** bomba de alta pressão (ISCO 260D) - para a verificação da inativação através desta técnica é necessário um equipamento que permita a quantificação da massa do fluido deslocado e que sirva para manipular a pressão do sistema. Bombas do tipo seringa encaixam-se perfeitamente neste contexto, pois possuem um cilindro interno onde pode ser computado o volume ou massa de fluido e, ao mesmo tempo, permite a pressurização e despressurização do sistema conforme este fluido é deslocado (a partir ou para dentro) deste reservatório, respectivamente. Neste trabalho foi utilizada uma bomba seringa (Marca ISCO, Modelo 260D) que possui um cilindro interno de 250 mL, pressão de trabalho de até 450 bar e vazão de até 107 mL/min. O cilindro da bomba é encamisado, o que possibilita a manutenção da

temperatura do reservatório em um valor pré-determinado com auxílio de um banho de recirculação (BR1);

**CE:** célula de volume variável - consiste em um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL, possuindo um diâmetro interno de 17,2 mm e comprimento de 176 mm. No interior da célula existe um pistão que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com termopar (ST) e outra com a válvula de alimentação (V7); uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral (JS) e entrada frontal (janela frontal) e traseira (fechamento e conexão com a válvula V5);

**JS:** janela de safira e janela frontal - a célula possui duas janelas de safira (*Swiss Jewel Company*), sendo uma janela frontal ( $d = 25,4$  mm e espessura = 9,52 mm) para visualização do interior da célula e outra lateral (JS) ( $d = 15,87$  mm e espessura = 4,56 mm) para entrada de luz;

**V2:** válvula de via única (Marca HOKE, Modelo 6133F2Y) - a função desta válvula é permitir o escoamento em apenas um sentido. É inserida entre o cilindro do solvente e a bomba após a válvula V1 com o intuito de evitar que pressões elevadas fossem aplicadas a cabeça do cilindro;

**V3, V4 e V5:** válvulas de esfera (Marca SWAGELOK, Modelo SS-H83PF2) - a função das válvulas de esfera é interromper e permitir o escoamento em uma determinada linha. As válvulas empregadas na unidade são do tipo esfera, com pressão de trabalho de 690 bar a temperatura ambiente; Válvula V3: utilizada para isolar a unidade da bomba de alta pressão durante a montagem e desmontagem da célula de equilíbrio. Válvula V4: utilizada para isolar a câmara do transdutor durante o processo de descarga do sistema. Sua função é impedir que qualquer quantidade de soluto entre na câmara do transdutor. Válvula V5: sua função é impedir o escoamento para o fundo da célula durante o processo de carga do solvente ao sistema e também para permitir a pressurização do fundo da célula através da passagem do líquido comprimido até o fundo do pistão;

**V6:** válvula de alívio (Marca SWAGELOK, Modelo SS-4R3A): é a válvula de segurança do sistema. Quando a pressão do sistema aumenta demasiadamente, esta válvula se abre automaticamente evitando riscos de operação. Estas válvulas de alívio possuem uma faixa de abertura que pode ser regulada (275 - 340 bar para este modelo). Após a redução da pressão do sistema, a válvula fecha mecanicamente;

**V7:** válvula de alimentação (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1): permite a alimentação do líquido comprimido à

célula. A válvula em questão permite uma abertura gradual e, conseqüentemente, uma regulagem do fluxo de solvente alimentado à célula;

**V8:** válvula de descarga (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1) - usada para descarga do sistema e despressurização do fundo da célula;

**BR2 e Linha Pontilhada:** sistema de aquecimento da célula - o sistema de aquecimento da célula é composto por uma cuba de metal adaptada ao tamanho da célula de equilíbrio, que possui roscas de fechamento alongadas para uma fixação dentro da cuba. O controle de temperatura é realizado com um banho termostatzado de recirculação (BR2) (Marca MARCONI, Modelo MA 184/6) onde há circulação de água de banho passando para a cuba e retornando ao banho. As roscas de fechamento da célula são alongadas para permitir visualização da amostra através das janelas de safira;

**IT:** indicador de temperatura (Marca DIGMEC, Modelo FHMD) - é um conjunto composto por um sensor de temperatura (termopar) tipo Y e um indicador de temperatura. É usado para medir o valor real da temperatura da solução no interior da célula. Este sensor é inserido na célula de modo que a junta fria fique no centro da célula;

**TP:** transdutor de pressão (Marca SMAR, Modelo LD 031) - é conectado a linha proveniente da bomba para verificar a real pressão do sistema. Foi utilizado um transdutor de pressão absoluto com faixa de operação de 0 – 250 bar para medida da pressão do sistema. De acordo com especificação da fábrica, a precisão do equipamento é de 0,125 % da faixa operacional (0,31 bar);

**MP:** monitor de pressão (Marca SMAR, Modelo HT2, Versão 5.08) - os valores de pressão eram coletados em um indicador que recebe um sinal digital do TP indicando a pressão da linha. Ambos os equipamentos, transdutor e monitorador eram alimentados em corrente contínua entre 12 e 30 V. Para tal foi utilizada uma fonte de energia (FE);

**FE:** fonte de alimentação de energia - utilizada para manter a tensão e alimentar em corrente contínua o transdutor e o monitor de pressão;

**ST:** termopar.

As amostras de purê esterilizado e não-esterilizado (para avaliação físico-química) foram submetidas a APDC usando CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente. Cada amostra em frasco estéril foi inoculada

com 100  $\mu\text{L}$  de *E. coli*, atingindo uma contagem total em torno de  $10^6$  UFC/mL.

O procedimento experimental utilizando o equipamento descrito iniciou-se com o carregamento do cilindro da bomba com o  $\text{CO}_2$  proveniente do cilindro de estocagem. A carga de solvente envolve algumas etapas, sendo a primeira a transferência do solvente do cilindro para a câmara interna da bomba. Neste ponto deve-se ter uma quantidade de solvente relativamente alta dentro da câmara da bomba, já que o próprio solvente era utilizado como fluido pressurizador, observando-se sempre que quanto maior a quantidade de solvente transferida para dentro da câmara da bomba, menos vezes será necessário repetir o procedimento de carga na bomba.

Em seguida, foi ajustada a temperatura do banho de recirculação (BR1), em torno de  $5 - 7^\circ\text{C}$ , para manter a temperatura no cilindro da bomba constante e a pressão foi mantida em torno de 100 bar. Neste momento, as válvulas V3 e V4 foram então abertas e a pressão foi elevada através da bomba, pressurizando toda a linha. Enquanto o fluxo do solvente estabilizava, foi realizada a montagem da célula de equilíbrio. Para isto, foram obedecidos passos cuidadosos para montagem e fechamento da mesma. Primeiramente, a montagem do pistão foi realizada, sendo que o fechamento da extremidade do fundo foi efetuado de forma que o pistão pudesse deslizar pelo interior da célula e não permitisse a passagem de fluido do fundo para a frente e vice-versa.

Após montar o fundo da célula de equilíbrio e antes do fechamento, aproximadamente 10 g de amostra foram transferidas para esta célula em condições assépticas (dentro de câmara de fluxo laminar) com prévia assepsia por álcool 70% e luz UV durante 15 min. Posteriormente, foram manipuladas as roscas de fechamento da célula. Em seguida, as linhas que contêm as válvulas V5 e V7 foram conectadas na célula e preenchidas com o solvente a baixa pressão e depois evacuadas, para remover o ar remanescente.

A bomba de seringa possui um reservatório interno encamisado (cilindro da bomba), de forma que se pode conhecer o volume de solvente dentro do reservatório a uma determinada condição de pressão e temperatura. A medida do volume deslocado, a fim de formar uma mistura de composição desejada, foi computada baseada no decréscimo do volume interno do cilindro da bomba pela abertura da válvula V7. Para tal, é necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba, com base em Angus et al. (1976).

A temperatura e a pressão do solvente na bomba foram mantidas constantes durante a carga (5 °C e 100 bar) e a massa de solvente adicionada foi computada com base em sua densidade. Desta forma, a célula foi carregada com composição global conhecida. Uma vez que o sistema encontrou-se estabilizado (com vazão da bomba estável em  $\pm 0,01$  mL/min – em torno de 30 min), a válvula V7 foi aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, até que o volume da câmara da bomba atingisse o valor pré-estabelecido para fornecer a composição desejada dentro da célula de equilíbrio. Durante o processo de carga do solvente, nenhuma pressão foi aplicada no fundo do pistão, para permitir que o experimento começasse com a célula em seu volume máximo. Após a alimentação, a pressão do sistema foi então reduzida (definindo-se um valor baixo na bomba de 40 a 55 bar) e, com a válvula V7 fechada, a válvula de esfera V5 foi aberta para permitir que o solvente entrasse em contato com o fundo do pistão. O sistema de aquecimento foi então acionado.

O sistema de aquecimento empregado foi constituído de banho de recirculação (BR2) que através de uma bomba fez-se a circulação da água e se aqueceu a mesma até o valor pré-determinado no banho (neste caso 32 °C). A temperatura da amostra no interior da célula foi então captada pelo termopar (ST) dentro da célula e monitorada pelo indicador de temperatura (IT). Mantendo a temperatura constante, iniciou-se a despressurização lenta do sistema através da diminuição gradativa da pressão pela bomba.

Durante os experimentos foi mantida uma relação constante entre massa de CO<sub>2</sub> e massa da amostra, onde a massa da amostra foi fixa em 10 g e variou-se a massa de solvente (entre 50, 75 e 100% do total de amostra), em temperatura constante (32 °C).

Assim, a pressão do sistema foi aumentada da pressão crítica do CO<sub>2</sub> até a pressão determinada a uma taxa de pressurização de 100 bar/min. Neste ponto o sistema foi mantido por tempos determinados, sendo despressurizado até a pressão crítica do CO<sub>2</sub> de acordo com a taxa de despressurização definida. Para a desmontagem da célula, o sistema foi despressurizado até 55 bar. Após os experimentos, foi realizada a contagem microbiana e os resultados foram expressos em função da redução logarítmica da contagem microbiana conforme Equação 14 (seção 4.3.4).

Inicialmente, o tempo de tratamento para todas as amostras foi mantido em 2 horas, para o delineamento experimental. Primeiramente, foi realizado um delineamento experimental 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central para assegurar a melhor condição de tratamento (Tabela 4). A

massa de CO<sub>2</sub> variou enquanto a massa da amostra foi de aproximadamente 10 g. Assim, pelas médias das análises, foi encontrada a condição de pressão na qual foi obtida a maior redução no número de micro-organismos. Então, a partir desta condição selecionada, uma cinética de inativação com tempos de 1 a 8 horas foi realizada, com todos os pontos em triplicata, sempre observando a tendência a linearização.

**Tabela 4** - Matriz do delineamento experimental com os níveis das variáveis independentes para avaliação da inativação de *E. coli* por APDC em 2 horas de tratamento, em purê de abóbora.

Experimento	Variáveis				
	Níveis	Pressão p (bar)	Níveis	Proporção de volume Razão m <sub>purê</sub> : m <sub>CO2</sub>	Redução log (N/N <sub>0</sub> )
1	-1	(75)	-1	(1:0,5)	0,50 ± 0,07 <sup>b</sup>
2	1	(275)	-1	(1:0,5)	1,09 ± 0,11 <sup>b</sup>
3	-1	(75)	1	(1:1)	1,03 ± 0,01 <sup>b</sup>
4	1	(275)	1	(1:1)	2,04 ± 0,02 <sup>a</sup>
5	0	(175)	0	(1:0,75)	0,69 ± 0,35 <sup>b</sup>
6	0	(175)	0	(1:0,75)	0,75 ± 0,18 <sup>b</sup>
7	0	(175)	0	(1:0,75)	0,84 ± 0,18 <sup>b</sup>

\* Letras minúsculas comparam as médias na mesma coluna. Letras diferentes correspondem a alteração significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

#### 4.6 TRATAMENTO EM PLASMA FRIO

O reator utilizado no plasma frio é de descarga corona do tipo gás-líquido e foi construído com a finalidade de tratar soluções aquosas em pressão atmosférica. Possui um corpo em formato de tubo cilíndrico feito de vidro e borosilicato com volume total de 250 mL do tipo pontaplano, revestido por teflon na extremidade inferior. O teflon foi escolhido para revestimento (tampa) das partes superior e inferior devido a sua baixa reatividade química. Na parte superior, separável e ajustável, também há revestimento com teflon e o eletrodo na parte central ao qual receberá a corrente elétrica necessária para ionização (Figuras 24 a 26). Na parte inferior do reator, uma placa de aço

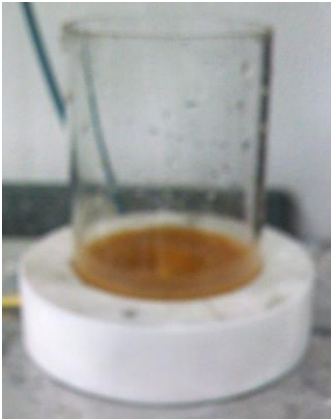
inoxidável com revestimento nas bordas em teflon, serve de fundo para atrair a corrente como um segundo eletrodo. A parte superior contém uma haste removível de teflon e ajustável conforme a altura da amostra que estiver contida na base (interna) do reator. Na parte externa há uma haste do eletrodo que recebe a corrente elétrica ao qual reagirá na parte interna. Nesta mesma parte superior, dois orifícios (septos) pequenos são responsáveis pelo recebimento do gás de arraste. A geometria empregada foi a de ponta-plano em relação ao eletrodo e a superfície aquosa.

Cada experimento foi realizado com 25 g de amostra inoculada com *E. coli* adicionada de aproximadamente 15 mL de água destilada e um agitador magnético, necessários para a homogeneização da amostra durante o experimento. A amostra foi introduzida no reator de forma asséptica em câmara de fluxo laminar, sendo assegurada a higienização por *swab*. Antes de cada ensaio, o reator foi lavado, higienizado com álcool 70% e deixado sob UV em câmara de fluxo laminar por 15 min.

O gás de arraste utilizado foi argônio (95% de pureza) introduzido em um dos septos superiores do reator com vazão de 0,3 L/min. Uma corrente contínua de uma fonte de 17 kV é utilizada para gerar o plasma. O controlador de fusão de linha (Variq) de 0 a 220 V para redução de 50 % na entrada (110 V) com tensão de pico de 9000 a 85000 V de saída. A distância do eletrodo para amostra é de aproximadamente 1 cm.

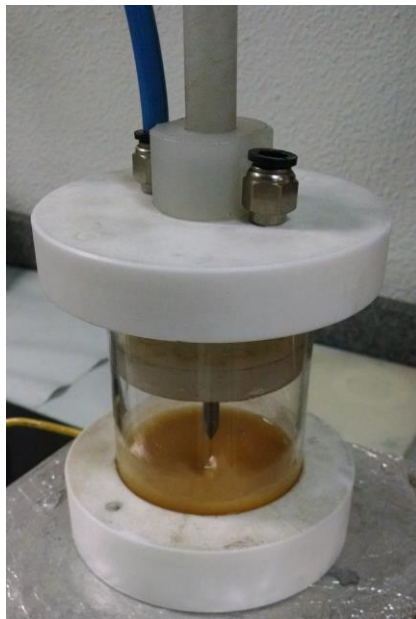
Para estabelecer as condições apropriadas e obter melhor eficácia na inativação, os testes para inativação de *E. coli* em plasma com argônio foram realizados variando o tempo de exposição ao plasma no purê de abóbora, entre 2 e 20 minutos. Os testes foram realizados em triplicatas para tempos de 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15 e 20 minutos.

**Figura 23** - Base do reator de plasma (parte inferior) com sustentação de teflon e tubo cilíndrico de quartzo.



Fonte: autor.

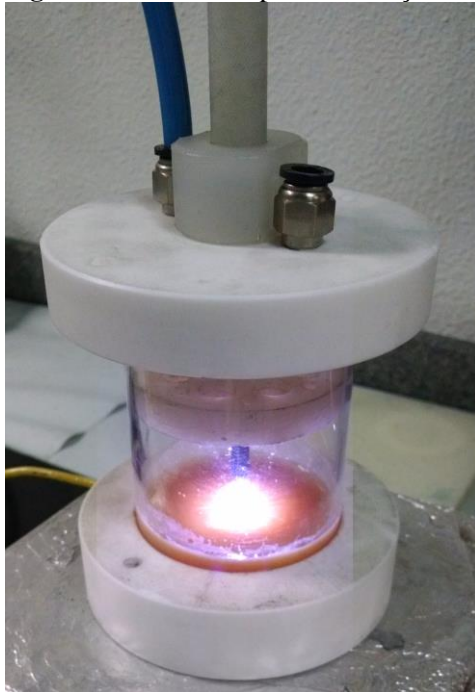
**Figura 24** - Reator de plasma com parte inferior e superior encaixada com amostra sob agitação e conexão de gás de arraste em um dos septos.



Fonte: autor.



**Figura 25** - Reator de plasma em ação sobre purê de abóbora.



Fonte: autor.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística deste trabalho foi realizada em duplicata ( $n = 2$ ) e triplicata ( $n = 3$ ) e os resultados expressos como médias  $\pm$  desvios padrão. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de comparação de médias por Tukey, sendo utilizado como critério o nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ). Os dados foram tratados utilizando o *software* Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

## Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTERILIZAÇÃO DO PURÊ DE ABÓBORA EM AUTOCLAVE

A abóbora (*Cucurbita moschata*) é uma matéria prima de baixa acidez, o que foi comprovado neste trabalho (Tabela 5). O cozimento e a posterior esterilização tiveram efeito em todos os parâmetros avaliados.

**Tabela 5** - Características físico-químicas da abóbora *in natura* (AIN), purê de abóbora sem esterilização (PNE) e purês de abóbora esterilizados a 121 °C nos tempos 10 min (PE-10), 20 min (PE-20) e 30 min (PE-30).

Amostras	pH	AT (% NaOH 1 mol L <sup>-1</sup> )	TSS (°Brix)	Carotenoides totais (µg g <sup>-1</sup> )
AIN	6,89 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,12 <sup>d</sup>	4,63 ± 0,15 <sup>c</sup>	247,95 ± 6,37 <sup>b</sup>
PNE	6,14 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,17 ± 0,12 <sup>c</sup>	5,00 ± 0,0 <sup>b</sup>	336,58 ± 3,52 <sup>a</sup>
PE-10	5,82 ± 0,03 <sup>c</sup>	2,70 ± 0,20 <sup>b</sup>	6,03 ± 0,06 <sup>a</sup>	345,38 ± 8,59 <sup>a</sup>
PE-20	5,87 ± 0,05 <sup>c</sup>	2,63 ± 0,12 <sup>b</sup>	6,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	340,29 ± 2,03 <sup>a</sup>
PE-30	5,70 ± 0,04 <sup>d</sup>	3,23 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,17 ± 0,15 <sup>a</sup>	343,27 ± 5,43 <sup>a</sup>

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna. Letras diferentes correspondem a alteração significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

O pH do alimento constitui um dos principais fatores intrínsecos que determinam o crescimento ou a sobrevivência dos micro-organismos presentes. Os valores ótimos para o crescimento de micro-organismos são próximos da neutralidade. Com base na classificação de acidez dos alimentos, o purê de abóbora em todas as condições foi caracterizado como alimento pouco ácido ( $\text{pH} > 4,6$ ) (FRANCO et al., 2001; JAY, 2005; PROVESI, 2010). A abóbora *in natura* (AIN) apresentou pH médio de  $6,89 \pm 0,06$ , estando de acordo com o encontrado por Silva et al. (2009), que trabalharam com a mesma cultivar (*C. moschata*) minimamente processada, e registraram pH em torno de 7,50 e Vilas Boas et al. (2006), que encontraram pH de 6,5.

Esta diferença encontrada pode ser atribuída às variações genéticas dos frutos estudados, bem como diferentes estágios de maturação, sazonalidade, condições de cultivo, solo, entre outros fatores. Nas amostras que sofreram tratamento térmico, houve alteração significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores de pH. Este fato pode ser explicado pela liberação de ácidos orgânicos, através do corte, fatiamento ou trituração, e também durante o tratamento térmico. Entre os purês esterilizados, observa-se diferença significativa para o PE-30, possivelmente pelo fato de o tratamento térmico contribuir para a redução do pH (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008a; 2008b).

Durante a esterilização, ocorrem desidratações e hidrólises, levando a um produto final com predominância de ácidos, como o acético e o fórmico, que podem explicar também o aumento da acidez e diminuição do pH (BUCKHOLZ, 1988). No trabalho de Provesi (2010), os resultados de pH para o purê de abóbora foram em média  $5,4 \pm 0,1$ , próximo ao obtido nesta pesquisa.

A acidez pode indicar o estado de conservação de um produto alimentício, auxiliando na detecção de processos de decomposição química ou microbiológica. Estas alterações nos purês de abóbora foram acompanhadas pela acidez titulável (AT) e pH, que nem sempre estão diretamente relacionados, seja pela propriedade do ácido, algum efeito tamponante da fruta ou outros fatores (CHITARRA et al., 2005). A AT (acidez titulável) na AIN (abóbora *in natura*) foi baixa em relação aos purês de abóbora tratados termicamente ( $0,53 \pm 0,12$ ). Entre os esterilizados observa-se que o PE-30 teve leve aumento na acidez, provavelmente devido à formação de compostos ácidos neste processo. A presença destes ácidos é um fator que pode afetar a estabilidade dos carotenoides, como por exemplo, derivados hidrolisados de pectina, que correspondem ao ácido galacturônico, que podem ter contribuído para estes resultados. Desta forma, outros compostos podem sofrer hidrólise térmica e resultar em aumento da AT do purê de abóbora (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1999; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008a; 2008b).

Os teores de sólidos solúveis totais (TSS) apresentaram valor médio de  $4,63 \pm 0,15$  na AIN, inferiores às amostras tratadas termicamente. Após cozimento a vapor e esterilização houve um leve aumento nos TSS, porém entre os esterilizados (PE-10, PE-20 e PE-30) não houve diferença significativa, indicando que o processo de autoclavagem não altera significativamente este parâmetro, e semelhante ao obtido por Provesi (2010), que obteve TSS médio de  $6,5 \pm 0,1$  °Brix nos purês de abóbora.

**Tabela 6** - Caracterização da matéria prima e dos purês de abóbora quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT), açúcares redutores totais (ART), carotenoides totais e umidade.

Amostras	pH	TSS (°Brix)	AT (% NaOH 1mol L <sup>-1</sup> )	ART (g 100g <sup>-1</sup> )	Carotenoides totais (µg g <sup>-1</sup> )	Umidade (g 100g <sup>-1</sup> )
<i>In natura</i>	6,50 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,07 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,510 ± 0,004 <sup>e</sup>	1,21 ± 0,010 <sup>d</sup>	63,21 ± 1,65 <sup>c</sup>	92,48 ± 0,16 <sup>a</sup>
Purê	6,35 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,20 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,710 ± 0,002 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,003 <sup>c</sup>	59,97 ± 0,62 <sup>c</sup>	92,50 ± 0,11 <sup>a</sup>
Purê estéril	5,75 ± 0,07 <sup>c</sup>	6,20 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,240 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,020 <sup>b</sup>	60,82 ± 0,54 <sup>c</sup>	92,07 ± 0,07 <sup>b</sup>
APDC no purê	6,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,27 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,750 ± 0,001 <sup>c</sup>	1,81 ± 0,003 <sup>bc</sup>	82,59 ± 0,29 <sup>a</sup>	91,61 ± 0,01 <sup>c</sup>
APDC no purê estéril	5,65 ± 0,03 <sup>c</sup>	6,93 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,040 ± 0,010 <sup>b</sup>	1,91 ± 0,010 <sup>a</sup>	76,82 ± 1,06 <sup>b</sup>	91,99 ± 0,01 <sup>b</sup>

\*Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas possuem diferenças significativas (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey.

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que o teor de carotenoides totais aumentou com a esterilização, e não diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) nos três tempos de esterilização. Rodriguez-Amaya et al. (1999) afirmam que os carotenoides, de uma forma geral, são bem conservados com a maioria dos métodos de cozimento. A aplicação de calor pode aumentar a disponibilidade de carotenoides, mesmo havendo perdas significativas pós e durante o processamento. A maior biodisponibilidade de carotenoides dos alimentos é alcançada quando o calor úmido é empregado, enquanto o calor seco não promove este efeito (LESSIN et al., 1997; LUCIA et al., 2008; SULTANA et al., 2008). Provesi (2010) relata que a relativa estabilidade dos carotenoides dos purês de abóbora (*C. moschata*) era prevista, porque os fatores que afetam a estabilidade foram minimizados pelo processamento térmico, ocasionando inativação de enzimas que atuam na degradação destes compostos.

Diversos estudos apresentam abóboras com importantes quantidades de carotenoides. Azevedo-Meleiro et al. (2005) verificaram que a *C. moschata* apresentou um aumento de  $5,4 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $79, \mu\text{g g}^{-1}$  durante a fase de maturação da fruta. Ramos et al. (1999) verificaram em diversos cruzamentos de abóboras de variedades locais (híbridos) entre  $100,5 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $356,4 \mu\text{g g}^{-1}$  e Amariz et al. (2009), que ao estudarem diversas abóboras do nordeste brasileiro, verificaram variações entre 191,0 e 539,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , resultados que estão de acordo com os encontrados neste trabalho.

Alguns trabalhos relatam alterações em purês com o tratamento térmico, o que pode ser explicado pelo fato de temperaturas mais elevadas favorecerem velocidades de reações, como a reação de Maillard, uma vez que a abóbora possui grande concentração de açúcares e proteínas solúveis. Tendo em vista este fato, verificou-se que os purês esterilizados por 30 min (PE-30) apresentaram alterações sensoriais no odor, na perda de água na matriz e na cor, embora não fossem avaliados colorimetricamente e sensorialmente nesta etapa (BUCKHOLZ, 1988). Durante a esterilização, ocorrem desidratações e hidrólises, chegando a um produto final com predominância de ácidos, como o acético e o fórmico, formação de aldeídos, como o formaldeído e o hidroximetilfurfural, diacetil, carbonilas e grupos enólicos, que são responsáveis pelo aroma (possuem volatilidade) e pela cor (BUCKHOLZ, 1988).

### 5.1.1 Compostos voláteis do purê de abóbora no *headspace* da embalagem *pouch*

As análises dos compostos voláteis do purê de abóbora contidos nas embalagens flexíveis *pouch* se iniciaram pela escolha da fibra disponível para SPME, comercialmente alojada num suporte manual (Supelco) no modo *headspace*. Três fibras de diferentes revestimentos foram testadas, dentre elas:

- 1) PDMS (polidimetilsiloxano);
- 2) PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno);
- 3) PDMS/CAR/DVB (polidimetilsiloxano/carboxen/divinilbenzeno).

Para testar as fibras, foram utilizadas 30 – 50 g de purê de abóbora armazenados na embalagem flexível *retort pouch*, com o tempo de microextração de 30 minutos e temperatura de 40 °C. A fibra comercial com melhor desempenho na identificação de compostos foi a tripla (PDMS/CAR/DVB), pela maior capacidade de extração de compostos, pois obteve maior soma da área dos picos cromatográficos e maior quantidade de picos extraídos em comparação com as outras duas fibras testadas, indicando ser mais seletiva em matrizes como a do purê de abóbora (APÊNDICE I).

Após a seleção da fibra a ser utilizada, foram realizadas as análises dos compostos voláteis no *headspace* da embalagem por SPME. Estas análises são importantes para a determinação de compostos formados durante o processamento e esterilização do purê de abóbora.

Para as amostras de purê não esterilizado (PNE) foram utilizados apenas 10 g de amostra em frascos devidamente destinados à metodologia de SPME (Figura 5, seção 3.1.3), pois ao utilizar-se maior quantidade de amostra (mais de 30 g), houve saturação do detector de massas (MS), que ocorre provavelmente devido à grande concentração de compostos voláteis na amostra. Este fato pode acontecer em decorrência da técnica de SPME que faz uma pré-concentração dos analitos e porque o detector possui grande sensibilidade, podendo ser saturado mesmo quando há pequenas massas de amostra.

Para a análise de compostos voláteis nos purês esterilizados (PE-10, PE-20 e PE-30) foram utilizados 50 g de amostra. Considerando que não foram encontrados, até o presente momento, outros trabalhos sobre determinação de voláteis em purê de abóbora em embalagem *pouch*, os resultados poderiam sofrer influência da falta de otimização e padronização desta metodologia para este propósito. O tempo de extração de 30 minutos a 40 °C e de injeção no cromatógrafo por 10 minutos foram

suficientes para extrair e identificar compostos voláteis das amostras.

Os compostos voláteis encontrados na degradação de carotenoides fazem parte do grupo dos aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, éteres, terpenos e hidrocarbonetos, compostos tais como  $\beta$ -ionona, 6-metil-5-hepteno-2-ona, 2-metil-2-hepteno-6-ona (e outros compostos com ionona substituinte e/ou seus produtos de oxidação), citral, linalol e aldeídos terpênicos (CROUZET et al., 1997). Servili et al. (2000), verificaram a presença de 1-octanol, nonanal, 2-decanal, 2,4-hexadienal, linalol, 3-hexen-1-ol e 1-penteno-3-ona, na análise de compostos voláteis de tomate, e são considerados como componentes de degradação de  $\beta$ -caroteno e licopeno.

Os principais compostos voláteis identificados estão listados nas Tabelas 6 a 9, selecionados de acordo com as principais funções orgânicas. Os resultados majoritários encontrados estão expressos em % médio e os dados de intensidade do pico e o percentual dos principais compostos voláteis estão apresentados nos Apêndices.

**Tabela 7** - Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de purê de abóbora não esterilizado (PNE).

Função orgânica	Principais compostos voláteis	(%)
Álcool	4-metil-1-hexanol	1,25 ± 0,63
	2-etil-1-pentanol	
	2-etil-1-butanol	
Aldeído	$\alpha$ -metilbutanal	0,05 ± 0,01
	Pentanal	
Alceno	Tolueno	27,59 ± 1,79
	1,3,5-cicloheptatrieno	
	2,4-dimetil-1-heptano	
	1,3-ciclopentadieno	
	1-octeno	
	o-xileno	
Cetona	2-pentanona	1,25 ± 0,55
	4-metil-2-heptanona	
	4-(1,1-dimetil-etil)-ciclohexanona	
Éster	Ácido oxálico	0,18 ± 0,51
Terpeno	$\alpha$ -pineno	0,63 ± 0,74
	2-careno	



**Tabela 8** - Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de purê de abóbora esterilizado (PE-10).

Função orgânica	Principais compostos voláteis	(%)
Álcool	4,8-dimetil-1-nonanol	7,12 ± 1,44
	Citronella	
	2-propil-heptanol	
	1-octanol	
	Isotridecanol	
	1-decanol	
Aldeído	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	6,39 ± 0,67
	$\alpha$ -metilpropionaldeído	
Alceno	$\beta$ -metilbutanal	2,03 ± 0,33
	Tolueno	
Cetona	1,3-ciclopentadieno	2,24 ± 0,26
	4,4-dimetil-2-pentanona	
	1-(2,2-dimetilciclopentil)-etanona	
Éster	$\alpha$ -Ionona	1,63 ± 0,16
	Ácido oxálico	
	Ácido sulfúrico	

**Tabela 9** - Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de purê de abóbora esterilizado (PE-20).

Função orgânica	Principais compostos voláteis	(%)
Álcool	Isotridecanol	4,00 ± 0,81
	3,7-dimetil-1-octano	
	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	
Aldeído	$\alpha$ -metilbutanal	6,74 ± 0,94
	$\beta$ -metilbutanal	
Alceno	Tolueno	24,43 ± 1,15
	2,4-dimetil-1-hepteno	
	1,3-ciclopentadieno	
Cetona	Ciclohexeno	0,88 ± 0,07
	2,2,6-trimetil-ciclohexanona	
	3-metil-4-heptanona	
Éster	3,5-dimetil-4-octanona	1,65 ± 0,11
	Ácido oxálico	
	Ácido sulfúrico	

**Tabela 10** - Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de purê de abóbora esterilizado (PE-30).

Função orgânica	Principais compostos voláteis	(%)
Álcool	2-etil-1-butanol	6,04 ± 0,97
	2-isopropil-5-metil-1-hexanol	
	2-etil-1-hexanol	
	Dihidro-citronelol	
	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	
	2-etil-1-decanol	
Aldeído	2-hexil-1-decanol	14,26 ± 1,34
	α-metilbutanal	
	2-metil-2-butenol	
	n-heptanal	
Alceno	β-ciclocitral	9,05 ± 0,92
	Tolueno	
	5-metil-1-hepteno	
Cetona	Safranal	1,56 ± 0,39
	α-Ionona	
	2,2,6-trimetil-ciclohexanona	
Éster	4-metil-2-heptanona	0,32 ± 0,07
	Ácido oxálico	
Éter	Ácido sulfúrico	0,19 ± 0,08
	Hexil-octil-eter	
Terpeno	α-pineno	0,08 ± 0,01

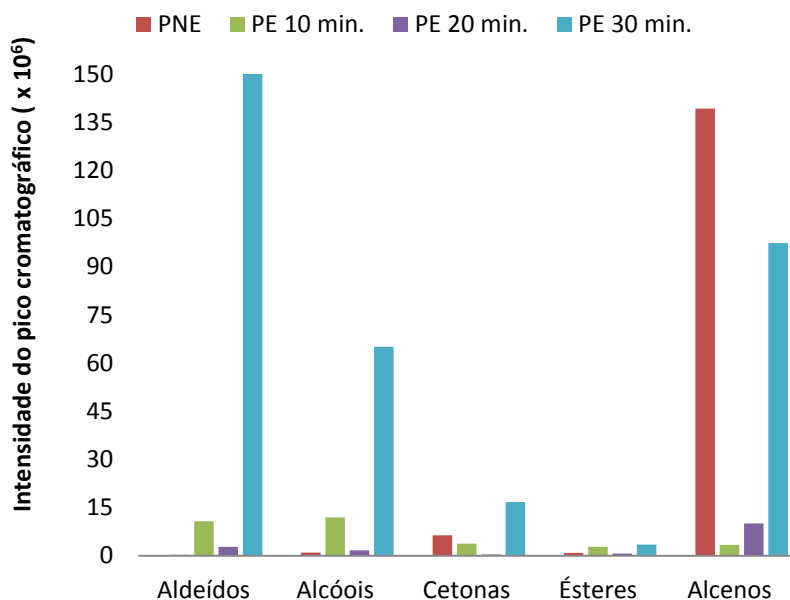
De acordo com os resultados obtidos pela identificação dos compostos voláteis via SPME, verificou-se a formação de diversos compostos que caracterizam o purê de abóbora quanto ao seu perfil aromático, dentre eles, a β-ionona, α e β-ciclocitral (conhecidamente produtos da degradação de carotenoides), safranal, terpenos (α-pineno), citronella, 2-careno, dentre outros. A presença de ésteres ácidos, conjugados com ácido oxálico e o ácido sulfúrico, também justifica as mudanças ocorridas nos parâmetros físico-químicos, quanto a redução no pH e o aumento da AT.

Com a soma das áreas dos picos obtidos de cada grupo funcional, os resultados obtidos foram expressos pela intensidade absoluta dos compostos agrupados para cada uma das condições. Estes gráficos mostram um perfil qualitativo das amostras, sendo que os compostos não foram quantificados. Mais detalhes em gráficos de intensidade absoluta do

pico em função do grupo funcional para cada amostra testada estão nos Apêndices.

Pode-se constatar que o PE-30 apresentou uma intensidade absoluta de picos maior do que as outras duas condições (PE-10 e PE-20). Isso pode estar relacionado ao fato de a exposição da amostra ao calor por mais tempo ter causado uma maior liberação de compostos da matriz e também um maior grau de degradação e formação de novos compostos, com prevalência de aldeídos (Figura 26).

**Figura 26** - Comparação da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de *headspace*/SPME, para as diferentes amostras (PNE, PE-10, PE-20 e P-30) de abóbora.



Observa-se que para todas as amostras, com exceção do PE-30, que a intensidade absoluta dos picos se manteve em valores próximos. Como já mencionado, a submissão da amostra por 30 minutos à esterilização pode estar relacionada a uma maior degradação de compostos, formação de novos compostos, tais como aldeídos, e uma maior liberação dos voláteis da matriz. Pode-se também verificar que o purê, antes de ser submetido ao processo de esterilização (PNE),

apresentou uma elevada concentração de alcenos.

Portanto, os efeitos do tratamento térmico nas condições utilizadas sobre o purê de abóbora, indicam consequências sobre as características físico-químicas e composição de voláteis esperados para este tipo de produto, sem comprometer significativamente as propriedades inerentes a esta matéria prima.

## 5.2 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO DO PURÊ DE ABÓBORA UTILIZANDO CEP

### 5.2.1 pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis totais

As condições experimentais do tratamento em campo elétrico pulsado em regime de batelada (descontínuo) requereram a diluição do purê para suco (100%) e néctar (70% suco). As características físico-químicas para os fluidos obtidos estão ilustradas na Tabela 10.

**Tabela 11** - Valores para pH, condutividade elétrica e sólidos solúveis totais nas amostras de suco de abóbora (100%) e do néctar de abóbora (70% do suco de abóbora + 30% de água destilada).

Parâmetros físico-químicos	100% suco de abóbora	70% suco de abóbora*
pH	5,01 ± 0,01	5,11 ± 0,06
Condutividade elétrica (mS/cm)	10,70 ± 0,11	8,54 ± 0,21
TSS (°Brix)	9,85 ± 0,07	6,40 ± 0,12

(\*) mistura de 70% de suco de abóbora e 30% de água destilada, considerando-se néctar de abóbora.

O pH inicial apresentado neste trabalho foi menor do que o encontrado na maioria dos trabalhos relatados na literatura com purê de abóbora. O pH encontrado por Gliemmo et al. (2009) foi de  $6,10 \pm 0,02$ , por Ahmed et al. (2014) foi  $6,31 \pm 0,02$  e por Nawirska-Olszanska et al. (2014) foi  $6,91 \pm 0,03$ . Dutta et al. (2006) encontraram valores menores que o encontrado neste trabalho, com pH de 4,35. Assous et al. (2014) relataram pH de 6,7 para abóbora egípcia (*Cucurbita moschata*). Gurtler et al. (2011) trabalharam com CEP em suco de morango com pH de  $3,43 \pm 0,05$  e Mosqueda-Melgar et al. (2007) com CEP em suco de melão de pH  $5,82 \pm 0,04$  e suco de melancia com pH  $5,46 \pm 0,11$ .

Jin et al. (2015), analisando suco de romã para a inativação de *E. coli* via CEP, verificaram que o material tem uma condutividade elétrica

entre 2,8 mS/cm e 4,5 mS/cm. O suco de morango analisado por Gurtler et al. (2011) apresentou condutividade elétrica de 4,15 mS/cm. Mosqueda-Melgar et al. (2007) trabalharam com CEP em suco de melão e melancia com condutividade elétrica de  $5,23 \pm 0,03$  mS/cm e  $3,66 \pm 0,05$  mS/cm, respectivamente e de acordo com estes autores, CEP é mais efetivo para inibição da contaminação microbiana em alimentos com menores condutividades elétricas.

Valores elevados de condutividade elétrica de um meio de tratamento diminuem a inativação de micro-organismos em aplicação constante de energia. Baixa condutividade elétrica aumenta a diferença deste parâmetro entre o meio e a membrana citoplasmática microbiana. Isto faz aumentar a diferença de condutividade elétrica e enfraquece a estrutura da membrana de micro-organismos devido a uma elevação no fluxo de substâncias iônicas através da membrana durante o tratamento CEP (VEGA-MERCADO et al., 1996; BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999). Raso et al. (1998) relataram a dependência da força do campo elétrico na condutividade elétrica de suco de frutas. Eles afirmaram que uma menor condutividade elétrica causou um grande aumento de intensidade do campo elétrico e isso resultou em maior eficiência na inativação microbiana. Esta é uma das razões pelas quais neste trabalho alguns experimentos foram realizados com a amostra centrifugada diluída (70:30 v/v) com água destilada (néctar).

O teor de sólidos solúveis (TSS) do suco de abóbora está de acordo com o encontrado para purê de abóbora (*Cucurbita moschata*) por Gliemmo et al. (2009), que encontraram  $10,5 \pm 0,5$  °Brix, Ahmed et al. (2014), que obtiveram  $10,1 \pm 0,2$  °Brix e Nawirska-Olszanska et al. (2014), que apresentaram  $11,9 \pm 0,02$  °Brix. Dutta et al. (2006) apresentaram menor teor de sólidos solúveis entre as referências,  $7,2 \pm 0,3$  °Brix, também para purê de abóbora da mesma espécie.

Mosqueda-Melgar et al. (2007) trabalharam em CEP com suco de melão de 11,1% e suco de melancia com 6,5% de TSS. Conti et al. (2015) avaliaram a qualidade da abóbora (*Cucurbita moschata* Duch.) depois de 240 dias e relataram que no primeiro dia, o conteúdo de TSS foi de 10,7 °Brix, enquanto que, ao final dos 240 dias, houve uma redução para 6,0 °Brix.

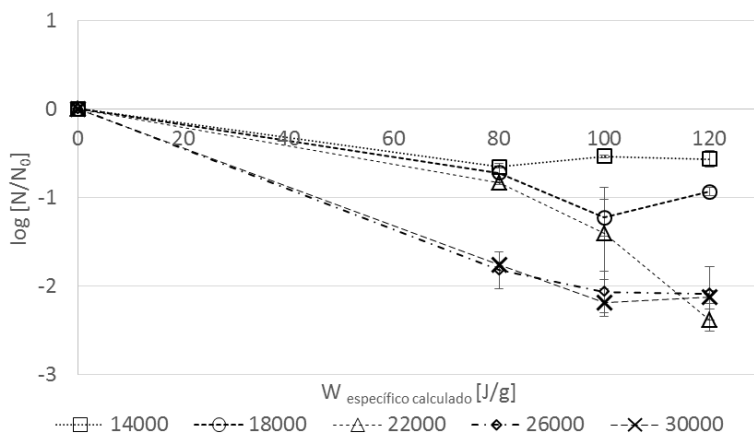
### 5.2.2 Inativação de micro-organismos por CEP

O efeito do tratamento por CEP sobre o suco e o néctar obtidos do purê de abóbora é apresentado como a relação do decréscimo no número de micro-organismos ( $\log N/N_0$ ) como uma função da energia específica

calculada ( $W_{\text{específico calculado}}$ ) seguindo um tratamento CEP com diversas forças de campo e variáveis do processo.

A Figura 27 ilustra o efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em 100% suco de abóbora, como uma função da energia específica de entrada ( $W_{\text{específico calculado}}$ ) de 0 a 120 J/g, seguindo o tratamento via aplicação de CEP com uma força de campo de 14000 a 30000 V/cm.

**Figura 27** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em 100% suco de abóbora (Experimento 1) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 ( $\square$ ), 18000 ( $\circ$ ), 22000 ( $\Delta$ ), 26000 ( $\diamond$ ) e 30,000 ( $\times$ ) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C.



Um aumento na força de campo resultou em maior taxa de inativação. Sob essas condições, uma redução acima de 2 ciclos log pôde ser obtida com energia específica de 120 J/g e força de campo acima de 22000 V/cm. Sale et al. (1967) estiveram entre os primeiros autores a relatar a inativação microbiana via CEP, aplicando 10 pulsos de variados campos elétricos para diversos micro-organismos, incluindo *E. coli*, e observaram reduções de 1 até 2 ciclos log, dependendo de diversas variáveis. Usando forças de campo de até 30 kV/cm, o processo foi efetivo para a inativação de aproximadamente 4 ciclos log (exceto esporos) em alimentos líquidos. O aumento na morte microbiana com a elevação da força do campo elétrico de 5 a 25 kV/cm e um efeito mais fraco foi

observado quando a amplitude do pulso foi aumentada de 2 para 20  $\mu\text{s}$ , apesar de nem todos os micro-organismos responderem da mesma forma ao campo elétrico.

Uma significativa relação entre a contagem de sobreviventes e energia específica aplicada foi observada por Toepfl et al. (2007), que trabalharam com tratamento de CEP em modo contínuo (com vazão de 5  $\text{kg h}^{-1}$ ) para inativar *E. coli* em solução Ringer. Os autores relataram que a inativação de *E. coli* em solução Ringer variou de 2 ciclos log a 35 °C e 80 J/g de energia específica para cerca de 6 ciclos log a 55 °C e 120 J/g de energia específica, variando a força de campo elétrico (16 – 20 kV/cm). Estes resultados, embora fossem no modo contínuo, apresentam comportamento similar aos obtidos neste estudo (Figura 27). O grau de inativação microbiana por CEP é fortemente dependente dos parâmetros do processo como força de campo, energia específica e temperatura de tratamento, bem como as propriedades da matriz alimentar. O formato do pulso, o desenho da câmara de tratamento e os efeitos do meio, tais como a precipitação de macromoléculas biológicas por íons metálicos solubilizados do eletrodo, também desempenham importante papel (STAPULIONIS, 1999; HEINZ et al., 2003).

O sistema fica instável em aplicações de campos maiores do que 35 kV/cm, desde que formação de arqueamento seja observada (MITTAL et al., 2005). Heinz et al. (2003) analisaram a inativação de *E. coli* em suco de maçã em diferentes temperaturas de tratamento (variando de 35 a 70 °C), com uma força de campo elétrico de 36 kV/cm em modo contínuo com fluxo de amostra de 3  $\text{kg h}^{-1}$ . Eles atingiram de 3 a 7 ciclos log de redução microbiana com aproximadamente 5 até 70 J/g de energia específica de entrada. Os autores também relataram que, para atingir 7 ciclos log de inativação da *E. coli*, temperaturas de 35 – 45 °C, energia específica de 80 – 120 J/g e uma força de campo elétrico de 35 – 45 kV/cm são requeridos.

Mittal et al. (2003) relataram que outro fator significativo em tratamento CEP é o tempo de tratamento ( $t$ ), que é a duração de tempo em que o líquido é exposto ao CEP. Essa variável é expressa como o produto de  $n$  (número de pulsos) e  $\tau$  (largura do pulso). Geralmente,  $\tau$  é fixo, desde que a duração seja seguida tanto pelo circuito do sistema quanto pela resistividade do material durante o tratamento. O número de pulso é então aumentado para obter maiores tempos de tratamentos e o efeito na sua variação é dependente de outros fatores. Estudos anteriores têm indicado que aumento de  $n$  aumenta a injúria celular.

De acordo com Mittal et al. (2005) e Toepfl (2006), os pulsos iniciais podem causar danos na célula devido à formação de poro ou a

perda do gradiente de pH, e pulsos subsequentes podem produzir ciclos adicionais de estresse nas membranas. No entanto, eles classificaram  $n$  como um efeito secundário e limitado, devido ao fato de que as altas taxas de morte microbiana não se relacionam ao “ $n$ ” assim como se relacionam à força de campo. Os autores afirmam que a frequência do pulso também desempenha um pequeno papel na determinação da letalidade do tratamento.

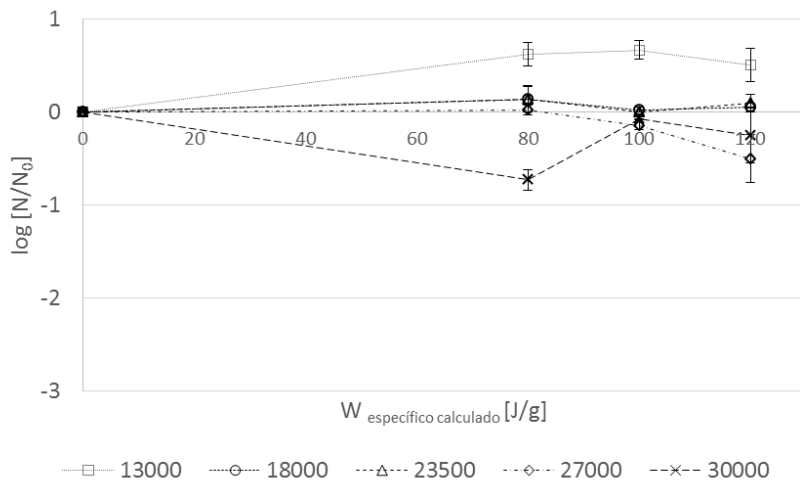
Jin et al. (2015) obtiveram um máximo de 2,83 UFC/mL de redução de *E. coli* 35218 em força de campo de 36000 V/cm, amplitude do pulso de 1  $\mu$ s e 336 J/mL de energia específica em suco de romã via CEP com fluxo contínuo. Estes autores variaram diversos parâmetros importantes em CEP e relataram que a força do campo e o tempo total de tratamento não são os únicos parâmetros que determinam a eficiência da inativação por CEP, mas todas as combinações de força do campo, sendo que frequência do pulso e amplitude do pulso necessitam ser consideradas. No entanto, as propriedades do produto e condições de manuseio afetam também a eficiência do tratamento em CEP. Palgan et al. (2011) obtiveram entre 4 e 5 UFC/mL de redução de *E. coli* em suco de maçã e *cranberry* com pulsos quadrados e monopulares, com 18 Hz de frequência, duração de 1  $\mu$ s, 20 °C na entrada (vazão de 20,8 mL min<sup>-1</sup>) e força de campo elétrico de 34 kV/cm.

A condição do micro-organismo também é outro possível fator determinante em relação ao efeito do tratamento CEP. Diferentes respostas foram observadas na aplicação do mesmo tratamento apresentado na Figura 27 quando comparado ao tratamento nas mesmas condições em que se usou uma suspensão não fresca ou congelada. Neste caso, uma redução de cerca de 1,60 ciclos log foi obtida com uma energia específica de 80 a 100 J/g usando entre 26000 – 30000 V/cm de força de campo (dados não publicados), relativamente menor quando comparado ao uso de uma suspensão fresca. Mudanças na estrutura celular neste caso também podem ter influenciado nos resultados.

Na Figura 28 pode ser observado que uma redução de cerca de 0,80 ciclos log podem ser atingidos com a energia específica de 80 J/g usando 30000 V/cm de campo de força. Sob estas condições, o néctar de abóbora (70:30) (mistura de 70% de suco de abóbora com 30% de água destilada) foi usado com o intuito de diminuir a condutividade elétrica do meio que, neste caso, ficou em 7,31 mS/cm.



**Figura 28** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em néctar de abóbora (70:30 suco:água destilada) (Experimento 2) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 13000 ( $\square$ ), 18000 ( $\circ$ ), 23500 ( $\Delta$ ), 27000 ( $\diamond$ ) e 30,000 ( $\times$ ) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C.

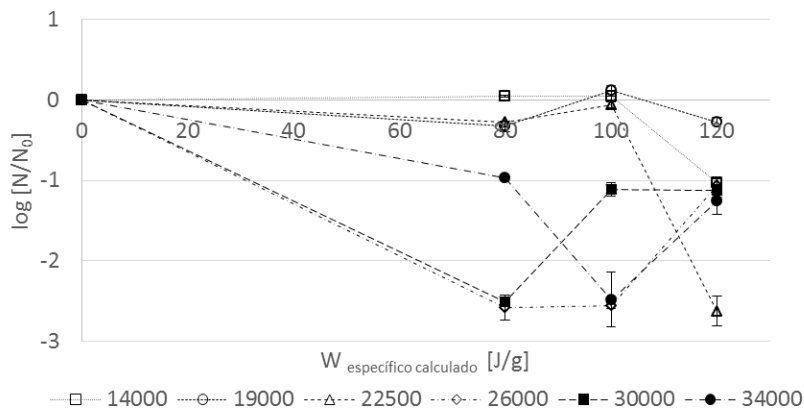


A diminuição na condutividade atingida através da diluição da amostra em água destilada pode ter contribuído para a diferença nos resultados. A condutividade do alimento líquido apresenta uma relação linear com a temperatura. No entanto, quando a temperatura é constante durante a descarga elétrica, esta se eleva dependendo da energia específica, levando a mudanças na condutividade do meio e na distribuição do campo elétrico (TOEPFL et al., 2007). Uma cepa fresca de *E. coli* foi também usada neste teste. Observou-se que quando a força do campo de 13000 V/cm foi usada, não houve efeito na inativação da *E. coli*. De acordo com Toepfl et al. (2007), grandes células são mais suscetíveis aos campos elétricos. Para pequenas células, tais como bactérias gram-negativas como a *E. coli*, pelo menos 15000 V/cm é predito ser suficiente para danos letais da maioria dos organismos em uma suspensão bacteriana exposta ao CEP. Os valores para inativação do néctar, apresentados na Figura 28, foram menores e o comportamento diferiu do apresentado na Figura 27.

Alguns fatores, como a aglomeração de células ou partículas isolantes como glóbulos de gordura, podem reduzir fortemente a letalidade do processo de CEP, sendo que o potencial requerido da membrana para a eletroporação não é atingido. Uma força de campo elétrico excedendo um potencial transmembrânico crítico é requerido e isto é dependente das propriedades da matriz alimentar e seus constituintes. Bolhas de gás isolantes eletricamente que podem ser produzidas no eletrodo por eletrólise podem causar um enfraquecimento similar do efeito do processo de CEP (GÓNGORA-NIETO et al., 2004; TOEPFL et al., 2007).

Uma redução de aproximadamente 2,5 ciclos log pode ser obtida com uma energia específica de 80 – 100 J/g e entre 26000 e 30000 V/cm de força de campo. Neste teste o volume foi levemente acima daqueles usados previamente (0,45 g) para evitar o efeito de formação de arco, a largura do pulso ( $\tau$ ) foi aumentada para 1  $\mu$ s devido à diminuição na condutividade elétrica, a suspensão de *E. coli* foi fresca e o processo foi aplicado ao néctar de abóbora (70:30) (Figura 29).

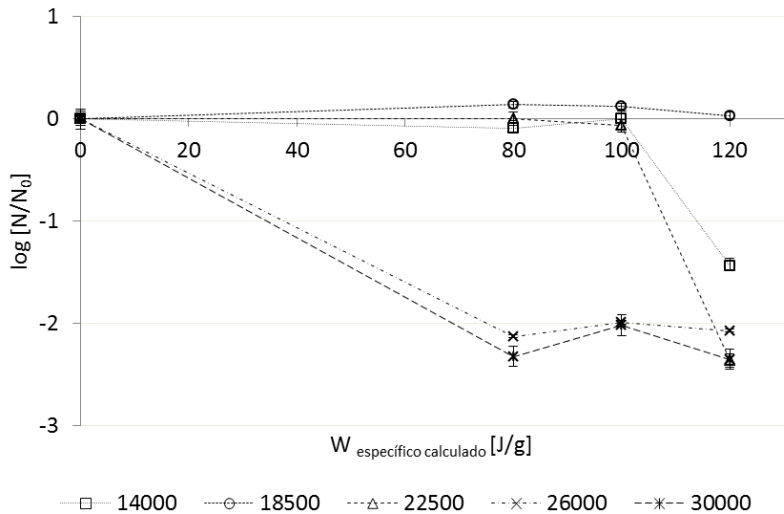
**Figura 29** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em néctar de abóbora (70:30 suco:água destilada filtrada) (Experimento 3) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 ( $\square$ ), 18500 ( $\circ$ ), 22500 ( $\Delta$ ), 26000 ( $\diamond$ ), 30000 ( $\blacksquare$ ) e 34000 ( $\bullet$ ) (V/cm). Neste teste,  $\tau$  foi 1  $\mu$ s. Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C.



Uma relativa elevação na inativação microbiana foi somente possível até 26000 V/cm. Estes resultados foram similares aos obtidos na Figura 27 ou também podem ser explicados pela elevação da largura do pulso.

A Figura 30 ilustra os resultados obtidos para 100 % de suco de abóbora. Sob estas condições, uma redução de mais de 2 ciclos log pôde ser obtida em 26000 V/cm.

**Figura 30** - Efeito do CEP sobre contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em néctar de abóbora (70:30 suco:água destilada filtrada) (Experimento 4) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 ( $\square$ ), 18500 ( $\circ$ ), 22500 ( $\Delta$ ), 26000 ( $\diamond$ ), 30000 ( $\blacksquare$ ) e 34000 ( $\bullet$ ) (V/cm). Neste teste,  $\tau$  foi 1  $\mu$ s. Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C.

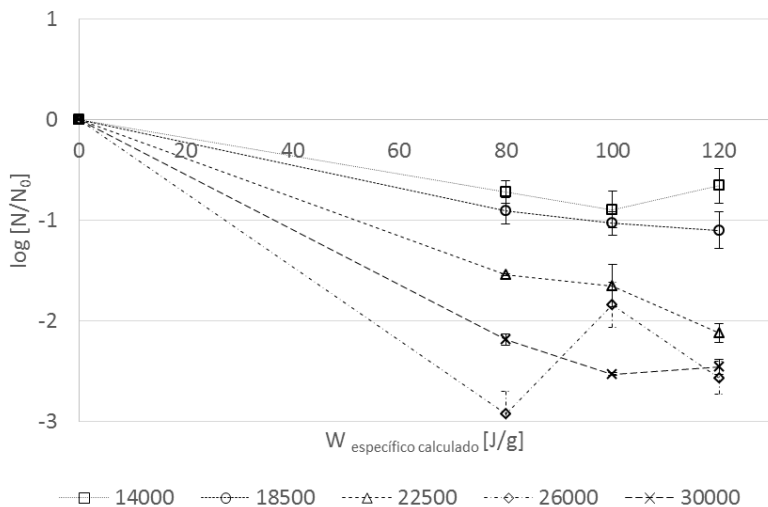


Estas condições foram menos eficientes do que aquelas aplicadas para obter os resultados apresentados na Figura 29 com néctar de abóbora, e similares ao apresentado na Figura 27. Em contraste, como pode ser analisado na Figura 27, abaixo de 26000 V/cm o comportamento das outras forças de campo difere consideravelmente, mesmo em condições semelhantes.

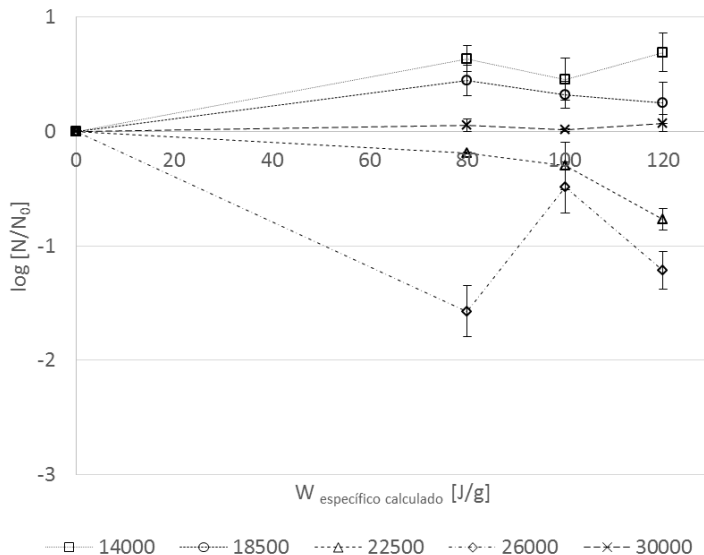
As Figuras 31 e 32 ilustram os resultados para as amostras analisadas nas mesmas condições, com diferença apenas na temperatura

de tratamento, visando observar a influência deste parâmetro nos tratamentos de CEP em batelada de sucos de abóbora.

**Figura 31** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em 100 % suco de abóbora (Experimento 5) em função da energia específica  $W$  específico calculado (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 ( $\square$ ), 18500 ( $\circ$ ), 22500 ( $\Delta$ ), 26000 ( $\diamond$ ), 30000 ( $\times$ ) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 20 °C.



**Figura 32** - Efeito do CEP sobre a contagem de *E. coli* ( $\log N/N_0$ ) em 100% de suco de abóbora (Experimento 6) em função da energia específica  $W_{\text{específico calculado}}$  (J/g) após tratamento de CEP com força de campo de 14000 ( $\square$ ), 18500 ( $\circ$ ), 22500 ( $\Delta$ ), 26000 ( $\diamond$ ), 30000 ( $\times$ ) (V/cm). Resultados são médias baseadas nos dados de dois experimentos a 40 °C.



Os resultados ilustrados na Figura 31 se referem à amostra analisada a 20 °C enquanto que os da Figura 32 foram obtidos a 40 °C. A 20 °C foi possível atingir uma maior redução microbiana, chegando em torno de 2,5 ciclos log com uma energia específica de 80 J/g e força de campo de no mínimo 26000 V/cm. No entanto, a 40 °C, a redução foi levemente acima de 1,5 ciclos log, aplicando a mesma energia específica e força de campo. Este resultado a 40 °C era o esperado, uma vez que uma elevação na temperatura é um importante fator a ser considerado em relação a inativação microbiana. Porém, a temperatura ótima de crescimento da *E. coli* é 37 °C, sendo próximo da temperatura do experimento, o que poderia explicar este comportamento.

O TSS do suco de abóbora (100%) foi em torno de 10%. Os principais componentes nestes sólidos são carboidratos de variadas massas moleculares, os quais podem ter um efeito protetor na bactéria a 40 °C. Esta temperatura não é alta, mas isto pode ter contribuído para a evolução das células de *E. coli* neste processo (Figura 32).

O valor  $D$  (segundos ou minutos), ou tempo de redução decimal, reflete a resistência do micro-organismo a uma determinada temperatura. Quanto maior é o  $D$ , mais resistente é o micro-organismo e mais tempo é necessário para sua eliminação. A Tabela 11 ilustra os valores de  $D$  para os tratamentos em CEP realizado com força de campo de 30000 V/cm e os  $D$  obtidos nas demais condições encontram-se no Apêndice I. Estes dados correspondem aos dados expostos nas Figuras 27 – 32.

**Tabela 12** - Tempo de redução decimal  $D$  (s) para a força de campo de 30000 V/cm.

$W_{\text{específico calculado}}$ (J/g)	$D_{20\text{ °C}}$	$D_{20\text{ °C}}$	$D_{20\text{ °C}}$	$D_{20\text{ °C}}$	$D_{20\text{ °C}}$	$D_{40\text{ °C}}$
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
80	3,18	3,64	3,32	3,46	3,5	4,04
100	3,8	4,92	4,79	4,45	4,24	4,86
120	4,59	5,78	5,73	5,17	5,12	5,88

\* Exp. 1: experimento 1; Exp. 2: experimento 2; Exp. 3: experimento 3; Exp. 4: experimento 4; Exp. 5: experimento 5; Exp. 6: experimento 6.

Muitos estudos têm sido conduzidos com aplicação de CEP para redução da carga microbiana e carga térmica em matrizes de alimentos líquidos a baixas temperaturas. O CEP e o tratamento pelo calor levam vantagens de efeitos sinérgicos de ambos mecanismos de inativação para reduzir a carga térmica e o consumo de energia específica. Quando a temperatura e a força de campo aumentam, o consumo de energia pode ser diminuído. Com o uso de menores temperaturas, uma maior força de campo produz uma redução expressiva em consumo de energia, enquanto que a altas temperaturas o efeito da força de campo é levemente diminuído, devido à sobreposição com a inativação térmica (HEINZ et al., 2003).

Um aumento na temperatura pode reduzir fortemente a estabilidade da membrana em relação à ruptura dielétrica induzida pelo campo elétrico externo. Isto é devido primeiramente à transição de um estado cristalino para um estado amorfo, que permite uma maior taxa de oscilação de imperfeições internas da membrana, afetando a estabilidade da membrana celular (HEINZ et al., 2003; MITTAL et al., 2005; TOEPFL et al., 2007; TIMMERMANS et al., 2014). Timmermans et al. (2014) avaliaram a inativação de micro-organismos em suco de frutas por CEP e relataram que, além da temperatura de entrada, a inativação depende do pH e do tipo/espécie do micro-organismo.

O efeito da temperatura inicial de tratamento, força de campo elétrico e energia específica aplicada para a inativação de *E. coli* foi investigada por Toepfl et al. (2007). Os autores encontraram uma relação significativa entre a contagem de sobreviventes e a energia específica de aplicação em um processo contínuo. Ao aumentarem a temperatura inicial ou a força do campo elétrico, verificaram uma melhoria na eficiência do tratamento. A força de campo elétrico neste caso foi de 15000 V/cm. Heinz et al. (2003) fizeram uma modelagem da influência da força de campo baseada na cinética de inativação de *E. coli* em suco de maçã e relataram que forças de campo elétrico acima de 15000 V/cm melhoram a eficiência do tratamento. Quando a força de campo elétrico aumenta de 16000 para 20000 V/cm a 35 °C, a inativação microbiana aumenta de 2 para 3,3 ciclos log em energia específica aplicada de 80 J/g (TOEPFL et al., 2007).

Em um estudo conduzido por Gurtler et al. (2011) para inativar *E. coli* em purê de morango por CEP, os autores relataram que a população de *E. coli* reduziu mais de 7 ciclos log em tratamento a 52,5 °C e 24,0 kV/cm de campo de força, mostrando que o aumento da temperatura tem significativo efeito na inativação, também demonstrada por Geveke et al. (2005) que ao inativarem *E. coli* em água peptonada (AP) a 55 °C e 28 – 33,6 kV/cm de força de campo e 57,5 °C e força de campo entre 30 e 33,6 kV/cm, na menor temperatura reduziram entre 2,65 e 3,35 ciclos log, enquanto que na temperatura mais alta, a inativação atingiu mais de 6,55 ciclos log. Inativação de *E. coli* por Gurtler et al. (2011) foi testada com força de campo de 18,6 kV/cm a 45, 50 e 55 °C, obtendo 2,86, 3,12 e 3,79 ciclos log de redução, respectivamente.

Moody et al. (2014) investigaram a inativação de *E. coli* em suco de maçã e verificaram que, a 20 °C, a inativação foi maior quando testada em menor pico de voltagem (23,7 kV/cm), comportamento semelhante ao deste trabalho. Ao usarem uma temperatura maior de tratamento (40 °C), as reduções foram semelhantes às obtidas em 20 °C, tanto com 23,7 kV/cm quanto 30,76 kV/cm (maior pico de voltagem testado pelos autores).

Um tratamento de CEP com alta energia de entrada a baixas temperaturas resulta em altos custos de operação. A combinação do tratamento de CEP e aplicação de calor pode reduzir o consumo de energia e a temperatura máxima de tratamento. Em comparação com o uso de apenas tratamento térmico, um dado nível de inativação pode ser obtido a baixas temperaturas, resultando em uma menor carga térmica e isto poderia resultar em uma grande conservação de qualidade e de frescor característico do suco. A inativação microbiana poderia ser melhorada

por maiores diluições do suco, no intuito de reduzir sua condutividade elétrica, o que não foi suficiente no caso da abóbora. Pode ser também enfatizado que há diferenças em sistemas de batelada, como apresentado neste trabalho, com o modo de sistema contínuo, como relatado na maioria das referências deste trabalho, principalmente pelas condições isotérmicas que o sistema de batelada pode manter, ao contrário do sistema contínuo (HEINZ et al., 2003).

Espera-se que o sistema comercial possa reduzir mais micro-organismos do que o sistema de bancada porque o sistema comercial de CEP não possui longos tempos de tratamento, devido ao formato da câmara (grande zona de tratamento), enquanto que a força do campo, frequência do pulso e amplitude são limitadas pelo sistema em batelada. A transferência dos resultados em escala laboratorial para a escala industrial requer considerações de todos os parâmetros envolvidos. Quando ocorre garantia na segurança de alimentos e estabilidade dos parâmetros com o nível desejado de inativação microbiana, verifica-se a intensidade do tratamento com certa precisão para outros processos e condições de produção.

Desta forma, em uma escala comercial é possível atingir uma maior redução comparada à atingida por este trabalho. Uma avaliação da estabilidade microbiológica, compostos bioativos, propriedades físico-químicas e aceitação do consumidor de suco de abóbora processado por um sistema CEP em uma escala comercial pode ser realizada em futuros estudos de ampliação de escala. Trabalhos em escala piloto são necessários para confirmar que os parâmetros estimados do processo em estudos laboratoriais são consistentes com os resultados obtidos na planta. Este estudo pode providenciar informações valiosas para pesquisadores de CEP e indústrias de sucos, para entender estes parâmetros visando a uma futura ampliação de escala para aplicação industrial da tecnologia CEP.

### 5.3 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO DO PURÊ DE ABÓBORA UTILIZANDO APDC

#### 5.3.1 Efeito da APDC sobre as características físico-químicas do purê de abóbora

As amostras de abóbora *in natura*, purê de abóbora, purê de abóbora esterilizado, purê de abóbora não esterilizado e esterilizado submetidos ao tratamento com APDC, foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas (Tabela 12).



**Tabela 13** - Caracterização da matéria prima e dos purês de abóbora quanto ao pH, teor de sólidos solúveis totais (TSS), acidez titulável (AT), açúcares redutores totais (ART), carotenoides totais e umidade.

Amostras	pH	TSS (°Brix)	AT (% NaOH 1mol L <sup>-1</sup> )	ART (g 100g <sup>-1</sup> )	Carotenoides totais (µg g <sup>-1</sup> )	Umidade (g 100g <sup>-1</sup> )
<i>In natura</i>	6,50 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,07 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,510 ± 0,004 <sup>c</sup>	1,21 ± 0,010 <sup>d</sup>	63,21 ± 1,65 <sup>c</sup>	92,48 ± 0,16 <sup>a</sup>
Purê	6,35 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,20 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,710 ± 0,002 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,003 <sup>c</sup>	59,97 ± 0,62 <sup>c</sup>	92,50 ± 0,11 <sup>a</sup>
Purê estéril	5,75 ± 0,07 <sup>c</sup>	6,20 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,240 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,020 <sup>b</sup>	60,82 ± 0,54 <sup>c</sup>	92,07 ± 0,07 <sup>b</sup>
APDC no purê	6,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,27 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,750 ± 0,001 <sup>c</sup>	1,81 ± 0,003 <sup>bc</sup>	82,59 ± 0,29 <sup>a</sup>	91,61 ± 0,01 <sup>c</sup>
APDC no purê estéril	5,65 ± 0,03 <sup>c</sup>	6,93 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,040 ± 0,010 <sup>b</sup>	1,91 ± 0,010 <sup>a</sup>	76,82 ± 1,06 <sup>b</sup>	91,99 ± 0,01 <sup>b</sup>

\*Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas possuem diferenças significativas (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey.

Como pode ser observado pela Tabela 12, os purês de abóbora esterilizados possuem o menor pH, e mesmo depois de submetidos ao processo de APDC, não apresentam diferença significativa entre eles, o que indica que o maior efeito sobre o pH foi da esterilização e não do tratamento APDC. Os purês não esterilizados tiveram o mesmo comportamento entre eles, não apresentando diferença significativa mesmo após APDC. A exceção foi a fruta *in natura*, que tem maior pH e se diferencia estatisticamente de todas as outras amostras ( $p < 0,05$ ).

Garcia-Gonzalez et al. (2009) argumentaram que o principal fator que determina a suscetibilidade bacteriana ao tratamento por APDC pode estar relacionado à resistência ao ácido dos micro-organismos, porque um fator chave no mecanismo de inativação parece ser a concentração de  $\text{CO}_2$  (e, conseqüentemente, o pH extracelular) na fase líquida do alimento. A acidificação do meio pode ser explicada por reações que acontecem quando  $\text{CO}_2$  se dissolve no alimento para atingir o equilíbrio. O  $\text{CO}_2$  é hidratado, formando o ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), processo no qual há liberação de íons hidrogênio e diminuição do pH extracelular. O  $\text{CO}_2$  dissolvido pode facilmente difundir na célula bacteriana devido ao aumento da permeabilidade da membrana e acumular no citoplasma, diminuindo o pH interno. Estes autores enfatizam também que a APDC com acidificação aumenta a eficácia bactericida dos tratamentos. No entanto, deve ser levado em conta que diferentes constituintes no meio suspenso podem também influenciar a inativação (HAAS et al., 1989; BALESTRA et al. 1996; KIM et al., 2007; LIU et al., 2012).

Spilimbergo et al. (2013), trabalhando em APDC com cortes frescos de cenoura, relataram o aumento da acidez nas amostras após APDC de  $6,1 \pm 0,1$  nas amostras não tratadas para  $5,6 \pm 0,1$  em amostras tratadas a 120 bar, 40 °C e 15 minutos, um comportamento similar ao do presente trabalho. Zhou et al. (2014), quando analisaram abóboras (*Cucurbita maxima* Duch.) antes (pH =  $5,48 \pm 0,02$ ) e depois de alta pressão hidrostática (pH = 5,47), não apresentaram diferença no pH após tratamento em alta pressão (450 MPa/15 min e 550 MPa/10 min) e estes valores permaneceram constantes durante todo o período de estocagem (60 dias).

O pH em suco de melancia após APDC (10, 20 e 30 MPa por 15, 30, 45 e 60 min) a 50 °C diminuiu significativamente de 5,83 para 5,46 – 5,65 ( $p < 0,05$ ), fato que está de acordo com o encontrado nas investigações para suco de cenoura e maçã (LIU et al., 2012). Em purê de goiaba (goiaba serrana) do tipo *feijoa*, o pH de todas as amostras tratadas em diferentes pressões aumentou significativamente ( $p < 0,05$ )

comparado às amostras controle, mas nenhum efeito significativo da pressão no pH final foi atingido (ORTUÑO et al., 2013; DUONG et al., 2014). Em purê de cenoura estudado por Wang et al. (2011), o pH inicial foi  $6,21 \pm 0,02$ . Fabroni et al. (2010) não encontraram diferença significativa no pH (3,39 – 3,56) em suco de laranja tratado e não tratado por APDC (130 e 230 bar a 36 °C). Ferrentino et al. (2009) relataram mudanças significativas ( $p < 0,05$ ) no pH de suco de maçã em amostras não tratadas, tratadas termicamente e tratadas via APDC.

A Tabela 12 também ilustra os teores de sólidos solúveis totais (TSS) antes e após APDC. A única amostra que diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) foi a estéril após APDC (APDC no purê estéril), que teve o maior valor de TSS ( $6,93 \pm 0,12$  °Brix). Este comportamento pode estar relacionado ao efeito da alta pressão e do CO<sub>2</sub>, formando novos sólidos solúveis no purê após o tratamento.

Zhou et al. (2014) não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em TSS antes ( $8,9 \pm 0,01$  °Brix) e depois de alta pressão hidrostática ( $8,9 \pm 0,06$  °Brix) em abóbora (*Cucurbita maxima* Duch.) com 550 MPa/10 min de tratamento e durante estocagem o valor permaneceu constante. Liu et al. (2012), observando o efeito do APDC no TSS, apresentaram oscilações desde o valor inicial de 9,55 °Brix, mas não mudaram significativamente ( $p < 0,05$ ), comportamento similar apresentado por Zhou et al. (2009) em suco de cenoura e ao estudado por Ferrentino et al. (2009) em suco de maçã. No purê de cenoura, Wang et al. (2011) encontraram  $8,63 \pm 0,17$  °Brix de TSS. Em suco de laranja, o TSS não mudou com APDC em comparação com a amostra não tratada e este comportamento inclui também a estocagem até 30 dias a 4 °C (FABRONI et al., 2010). Duong et al. (2014) mostraram que o TSS em purê de goiaba serrana (*feijoa*) de  $9,08 \pm 0,04$  °Brix não se modificou após APDC.

Para os resultados de AT (Tabela 12), todas as amostras apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre elas e o maior valor deste parâmetro foi no purê estéril ( $1,240 \pm 0,001$  % NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>). O purê estéril após APDC apresentou o segundo maior valor de AT, indicando que o processo de esterilização pode influenciar os resultados deste parâmetro, assim como no pH.

Liu et al. (2012), analisando o efeito da APDC na AT de suco de melancia, relataram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 0,69 mg L<sup>-1</sup> para 0,80 – 1,05 mg L<sup>-1</sup>. Estes autores também relatam que o ácido carbônico derivado da dissolução do CO<sub>2</sub> no suco induziu o aumento da AT, e também atribuíram a dissolução do CO<sub>2</sub> no suco como uma relevante solubilidade do CO<sub>2</sub> em suco de melancia, apesar do suco

tratado termicamente a 95 °C por 1 minuto não ter mudado significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação à amostra controle.

Em suco de laranja, não houve diferença significativa estatisticamente entre as amostras tratadas por APDC e amostras controle, onde o valor de AT, mesmo em estocagem de 30 d a 4 °C foi de 1,09 – 1,12 % ácido cítrico (FABRONI et al., 2010). Spilimbergo et al. (2013) apresentaram, em amostras de cortes frescos de cenoura, após tratamento via APDC, um valor de  $0,2 \pm 0,0$  (mg ácido cítrico mL<sup>-1</sup>) de AT, enquanto que amostras não tratadas tiveram  $0,1 \pm 0,0$  (mg ácido cítrico mL<sup>-1</sup>), não variando durante o tempo de estocagem. Tendências semelhantes para AT foram frequentemente relatados para alimentos líquidos e sólidos tratados por APDC, devido à solubilização do CO<sub>2</sub> na fase líquida e formação de ácido carbonico (FERRENTINO et al., 2011).

A APDC e a esterilização afetaram o teor de açúcares redutores totais nas amostras e os resultados variaram entre  $1,781 \pm 0,03$  (g 100g<sup>-1</sup>) em purê e  $1,906 \pm 0,010$  (g 100g<sup>-1</sup>) em purê estéril após APDC, enquanto que a amostra referência (*in natura*), os ART foram de  $1,214 \pm 0,010$  (g 100g<sup>-1</sup>), indicando que este processo aumenta a concentração de açúcares redutores nas amostras estudadas. Este aumento em ART pode estar relacionado com a degradação do amido e subsequente conversão em açúcar, conforme pode ser observado na microscopia ótica, apresentada na seção 5.3.3, em relação aos efeitos destes tratamentos sobre a estrutura da matriz da abóbora e dos purês.

Como pode ser observado na Tabela 12, uma leve mas significativa ( $p < 0,05$ ) variação nos carotenoides totais após APDC foi observada. O purê de abóbora (não esterilizado) após APDC apresentou o maior teor de carotenoides totais ( $82,58 \pm 0,29$  µg g<sup>-1</sup>). Estes resultados são particularmente interessantes, uma vez que carotenoides têm efeitos positivos na saúde humana e sua presença oferece uma importante contribuição para a aceitação geral do purê de abóbora tratado por APDC, que mostrou não ter efeitos em detrimento aos níveis de carotenoides.

Barba et al. (2015) relataram que o tratamento em alta pressão pode melhorar quantidades de carotenoides extraíveis em produtos vegetais. Alguns autores explicam que o aumento na extração de carotenoides de suco de laranja e purê de caqui via alta pressão e o rendimento de licopeno do purê de tomate podem ser atribuídos a vários fatores, tais como permeabilização da membrana plasmática da célula e desnaturação da proteína ligada ao carotenoide induzida pela alta pressão (KREBBERS et al., 2003; SANCHEZ-MORENO et al., 2004; SANCHEZ-MORENO et al., 2005; QIU et al., 2006). Patras et al.

(2009) investigaram os efeitos da alta pressão na recuperação de carotenoides de purê de cenoura e observaram um aumento significativo (de 3%) no teor de carotenoides após tratamento em alta pressão (600 MPa/15 min).

Por outro lado Spilimbergo et al. (2013), em seus estudos com cortes frescos de cenoura, não verificaram reduções significativas em conteúdos de carotenoides após APDC e durante a estocagem (a 4 °C). Shi et al. (2010), quando analisaram carotenoides extraídos de abóbora fresca (*Cucurbita moschata*) por APDC, confirmaram que os principais carotenoides presentes foram  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e ésteres de luteína. Eles também observaram que o aumento na temperatura resultou em aumento na isomerização dos compostos biologicamente ativos, especialmente  $\beta$ -caroteno.

Em geral, os autores que avaliaram a viabilidade do tratamento em alta pressão para aumentar a quantidade de carotenoides extratíveis em bebidas baseadas em vegetais e frutas obtiveram bons resultados. Eles observaram que a extratibilidade de carotenoides em amostras foi claramente influenciada pelas condições de tratamento em alta pressão, mas futuras investigações são necessárias para estabelecer a viabilidade da extração de carotenoides (SANCHEZ-MORENO et al., 2005; PLAZA et al., 2006).

De Ancos et al. (2000) obtiveram um aumento no conteúdo de carotenoides totais em purê de caqui após tratamento a APH (400 MPa/25 °C/1 min). Kebede et al. (2013, 2014a, 2014b) relataram que a degradação de carotenoides e ácidos graxos insaturados podem estar ligadas às reações oxidativas, que parecem ser mais favoráveis em alta pressão. Esta linha segue com relatos de que a reação química oxidativa foi melhorada com o aumento da pressão. Patras et al. (2009) trabalhando com APH observaram que uma leve mas significativa diminuição no conteúdo de carotenoides ocorreu em amostras de purê de tomate processado a 400 MPa. A 600 MPa, um aumento significativo (aproximadamente 172%) na extração de carotenoides ocorreu em comparação às amostras não processadas. Em purê de cenoura, estes mesmos autores observaram um aumento de 58% no conteúdo de carotenoides totais a 600 MPa, sugerindo que a homogeneização e o tratamento térmico romperam as membranas celulares e o complexo proteína-carotenoide, fazendo com que os carotenoides estivessem mais acessíveis para extração. Eles concluíram que o processamento a alta pressão em moderadas temperaturas refletiram em melhor retenção de carotenoides, podendo manter a qualidade nutricional dos purês e

poderia ser uma alternativa ao processamento térmico na produção de alimentos com alto valor nutritivo.

A Tabela 12, por fim, ilustra os valores de umidade, que decresceram quando o purê foi esterilizado e submetido à APDC. Uma diferença significativa entre todas as amostras foi para o purê não esterilizado após APDC (APDC no purê), porém observa-se que este parâmetro não sofre influência do processo. Os resultados sugerem que a APDC pode induzir a perda de umidade especialmente na etapa de despressurização.

### 5.3.2 Efeito da APDC na inativação de *E. coli* em purê de abóbora

Um procedimento de seleção foi inicialmente realizado para determinar que variáveis e níveis destas variáveis resultariam em uma melhor condição experimental para inativação de *E. coli* em purê de abóbora, como apresentado na Tabela 4 (seção 4.5), que apresenta os resultados em função da pressão e da proporção de volume entre purê de abóbora e solvente através de um delineamento  $2^2$  com triplicata no ponto central. Nesta mesma Tabela 4 (seção 4.5), os resultados mostram uma tendência de maior redução no número de micro-organismos conforme a pressão aumenta, em acordo com o relatado também por Erkmen (2001a) e Silva et al. (2013), que ressaltaram a importância de taxas de ciclos de pressão e despressurização na inativação de *E. coli*. Ainda na Tabela 5 da seção 4.5, pode ser observada a mesma tendência quando o volume de proporção entre soluto e solvente são equivalentes.

A melhor condição experimental escolhida para realizar a cinética é a de 275 bar e razão 1:1 (m/m), que obtiveram uma redução de 2,04 ciclos log em purê de abóbora. Soares et al. (2013) relataram que um aumento da proporção de CO<sub>2</sub> no sistema favorece a inativação de micro-organismos. Estes autores citam Erkmen (2001a, 2001b, 2001c), que explica que o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> permite uma melhor difusão através das membranas celulares, facilitando o rompimento das células durante a despressurização, quando a expansão do CO<sub>2</sub> ocorre, levando à melhoria da eficiência da inativação. Em concordância, Yuk et al. (2010) verificaram que o efeito da APDC de modo contínuo (vazão de amostra de 1 L min<sup>-1</sup>) na inativação de *E. coli* K12 em sidra foi determinada como uma função da concentração do CO<sub>2</sub> e temperatura, ou seja, o grau de inativação microbiana aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> em cada temperatura de aquecimento na saída.

Na Tabela 13 e na Figura 33, pode ser observada uma tendência de maior redução microbiana à medida que o tempo de processo

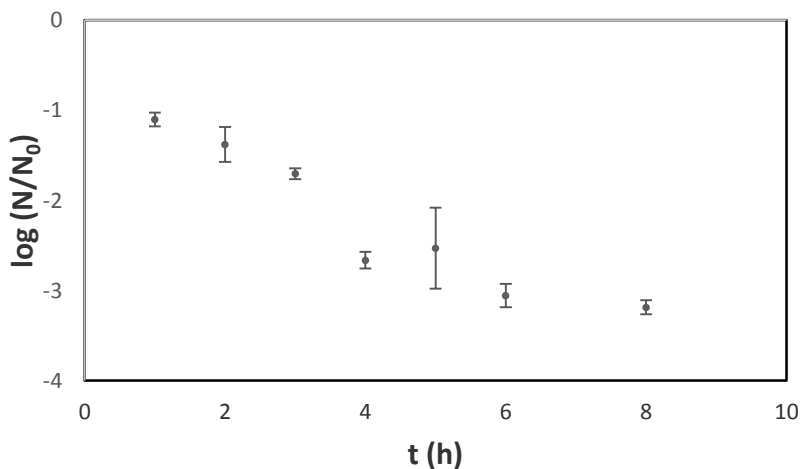
aumenta. Cada ponto do processo esteve sob as mesmas condições de pressão e temperatura durante todo o processamento via APDC.

**Tabela 14** - Efeito do tratamento via APDC sobre *E. coli* em purê de abóbora a 275 bar de pressão e razão ( $m_{CO_2} / m_{\text{purê de abóbora}}$ ) 1:1 em função do tempo de tratamento (t). Resultados são médias baseadas em dados de três experimentos a 32 °C e desvios padrão são apresentados com o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Experimento	t (h)	$-\log(N/N_0)$
1	1	$1,101 \pm 0,077^c$
2	2	$1,377 \pm 0,194^c$
3	3	$1,701 \pm 0,060^c$
4	4	$2,663 \pm 0,093^b$
5	5	$2,529 \pm 0,450^b$
6	6	$3,054 \pm 0,130^{ab}$
7	8	$3,186 \pm 0,077^a$

\* Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas possuem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey

**Figura 33** - Efeito do tratamento por APDC sobre a inativação de *E. coli* em purê de abóbora sob pressão de 275 bar, 32 °C e razão ( $v_{CO_2} / v_{\text{purê de abóbora}}$ ) 1:1 em função do tempo.



A Figura 33 ilustra os dados experimentais e preditos pelo modelo de primeira ordem para 275 bar. Pode-se observar que a inativação da *E. coli* com dióxido de carbono supercrítico segue uma

cinética de primeira ordem, confirmada pelo bom ajuste dos dados experimentais. Como proposto por Silva et al. (2013), o efeito da pressão na inativação de *E. coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico é dado pela Equação 16.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad (16)$$

onde  $\frac{dN}{dt}$  é a contagem microbiana ( $N$  e  $N_0$ ) obtidas no tempo inicial ( $t_0$ ) e no tempo final ( $t$ ) e  $k$  é uma constante de inativação, dada pela linearização da Equação 16. O valor da constante da inativação ( $k$ ) depende do tipo de micro-organismo, do meio, da pressão e da temperatura.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,90 nesta etapa, semelhante ao obtido por Silva et al. (2013). Estes autores relataram que a constante de inativação aumenta com a pressão, indicando que altas pressões aceleram a taxa de inativação enquanto o tempo de redução decimal ( $D$ ) diminui com o aumento de pressão, o que é esperado.

Nesta etapa com purê de abóbora,  $k$  a 275 bar foi de 0,018 min<sup>-1</sup> e  $D$  foi de 125,53 min. O valor de  $k$  foi menor e, conseqüentemente, o  $D$  foi maior do que o encontrado por Silva et al. (2013). Estes valores podem ser explicados pela diferença entre as matrizes usadas para APDC. Pela complexidade química do purê de abóbora, talvez somente pressões elevadas não sejam suficientes para atingir uma alta taxa de inativação e assim, é necessário um estudo da variação de outros parâmetros. Como ilustrado na Figura 33 e na Tabela 13, a redução máxima atingida pela APDC no purê de abóbora foi de  $3,19 \pm 0,08$  ciclos log após 8 h de processo.

A contagem de *E. coli* diminui quando o tempo de exposição ao processo aumenta, mas não atinge total inativação. Este comportamento está em acordo com diversas publicações (KARAMAN et al., 2001; SPILIMBERGO et al., 2003; LIAO et al., 2007; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2013). Ballestra et al. (1996) relataram que um pouco mais de 3 ciclos log de redução de *E. coli* em caldo TSB (soja tripticaseína) foram obtidos após 60 minutos a 120 bar e 45 °C. Os fatores envolvidos na inativação por APDC de acordo com Ortuño et al. (2012) são: nível de pressurização, acidificação, extração de substâncias da célula e disfunções na permeabilidade da membrana.



De acordo com estes resultados, pode ser deduzido que o abaixamento do pH é uma das causas da inativação microbiana por APDC (BALLESTRA et al., 1996; ERKMEN, 2001a, 2001b, 2001c; KIM et al., 2007; ORTUÑO et al., 2012). A dissolução do CO<sub>2</sub> na suspensão, que resulta em formação de ácido carbônico, pode causar uma mudança no equilíbrio em direção a geração de mais íon hidretos, uma vez que o ácido carbônico é dissociado (KIM et al., 2007; ORTUÑO et al., 2012). Também tem sido sugerido por Lin et al. (1994), Ballestra et al. (1996) e Erkmen (2001a, 2001b, 2001c) que CO<sub>2</sub> em altas pressões pode extrair constituintes vitais, incluindo fosfolipídeos e componentes hidrofóbicos das membranas celulares, o que causaria a inativação microbiana com a ruptura das paredes celulares. Garcia-González et al. (2010) concluíram que o papel do decréscimo do pH no meio suspenso em inativação por APDC não deve ser negligenciado devido à sua contribuição para causar mudanças conformacionais no DNA.

A penetração do CO<sub>2</sub> através da célula microbiana pode ser o passo controlador na inativação e a extração dos conteúdos extracelulares é um possível mecanismo de inativação. A desnaturação de proteína, inativação enzimática e mudanças nas fases lipídicas podem perturbar a morfologia celular, mecanismos genéticos e reações bioquímicas (HAAS et al., 1989; LIN et al., 1992a, 1992b; BALLESTRA et al., 1996; ERKMEN 2001a, 2001b, 2001c; KARAMAN et al., 2001; LIAO et al., 2007; GARCIA-GONZÁLEZ et al., 2007).

Além do efeito da pressão e da concentração do CO<sub>2</sub>, diversos estudos sugerem que a elevação de temperatura também melhora o efeito letal do CO<sub>2</sub> sobre os micro-organismos (LIN et al., 1992a, 1992b; BALLESTRA et al., 1996; ERKMEN, 2001a, 2001b, 2001c; SPILIMBERGO et al., 2003; YUK et al., 2010). Hong et al. (1997) concluíram que altas temperaturas podem aumentar a difusividade e poderiam facilitar que o CO<sub>2</sub> penetre na membrana da bactéria pelo aumento na fluidez.

Kim et al. (2007) relataram que um período de 20 minutos foi suficiente para inativar completamente 108 UFC mL<sup>-1</sup> de *E. coli* em caldo via APDC com pressões variando entre 80 a 150 bar a 40 °C. A 35 °C, 120 bar foram suficientes para obter completa inativação. Com o aumento da temperatura de 35 para 40 °C e de 40 para 45 °C, o tempo para completa inativação diminuiu de 30 para 20 minutos e de 20 para 15 minutos, respectivamente, sendo estimado pela modelagem dos dados experimentais.

Erkmen (2001a) mostrou que os efeitos da inativação do CO<sub>2</sub> foram melhorados com o aumento da temperatura de 20 para 40 °C, demonstrando que a temperatura tem uma relação próxima com as características de transferência de massa do CO<sub>2</sub> estimulando a fluidez da membrana celular para facilitar a sua penetração, também em concordância com o que relatou Hong et al. (1997). Em suco de cenoura com pH de 6,80, a maior inativação atingida via APDC foi de 7,37 ciclos log em 60 min a 37 °C e 30 minutos a 45 °C, todos em 5 MPa (BI et al., 2011).

García-Gonzalez et al. (2010) afirmam que o aumento da temperatura e da pressão causam altos níveis de inativação de micro-organismos, como aconteceu em seu trabalho com *E. coli*. Yuk et al. (2010) mostraram que uma elevação significativa da temperatura ( $p < 0,05$ ) melhorou o efeito bactericida via APDC em modo contínuo sobre a *E. coli* K12 em constantes níveis de CO<sub>2</sub>.

Ferrentino et al. (2009), quando avaliaram a inativação da microbiota natural microbiana em suco de maçã, observaram que era necessário aumentar a temperatura até 60 °C por 40 minutos para atingir 5 ciclos log de inativação microbiana via APDC. Um aumento na pressão de 70 para 160 bar a 35 °C não apresentou uma grande melhoria na redução microbiana (2,5 ciclos log em 140 min). Estes autores concluíram que a temperatura de 35 °C não foi capaz de produzir uma redução log relevante embora em pressões de 160 bar, que foi a maior pressão testada no referido trabalho.

A insuficiente redução microbiana pode também estar relacionada ao aumento de TSS e ART. Os dados indicam que existe uma alta disponibilidade de nutrientes para a *E. coli*. É observado que as mudanças físico-químicas podem ser correlacionadas melhor com a resistência/sensibilidade dos micro-organismos em que pH e acidez ajudam na redução da contagem, mas não o suficiente pela disponibilidade de nutrientes que o processo acarreta. Adicionalmente, a natureza dos sólidos solúveis e suspensos nesta matriz pode ter exercido efeito físico protetor sobre os micro-organismos.

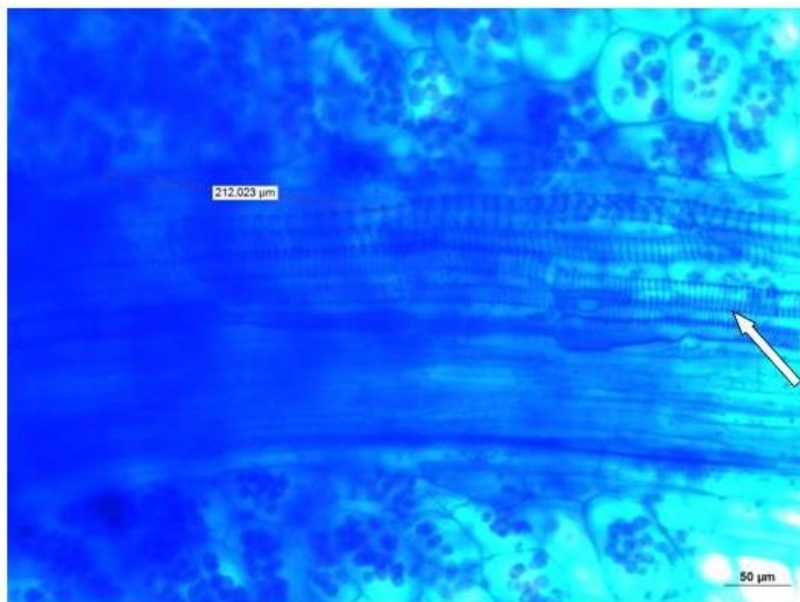
A contagem inicial de *E. coli* pode também afetar os resultados. Quando o número inicial de micro-organismos é alto, isto pode ser atribuído a aglutinação (clumping) de células como um resultado do aumento da hidrofobicidade durante o processo. A taxa de formação de aglutinações (clumps) é proporcional ao número inicial. A aglutinação de micro-organismos dificulta a inativação porque a aglutinação forma uma barreira protetora (FURUKAWA, 2002; LIAO et al., 2007). Além disso, alguns estudos têm mostrado que a *E. coli* é capaz de liberar

algumas substâncias protetoras quando estão em alta densidade através do quórum-sensing, o que talvez possa ter ocorrido neste trabalho (SWIFT et al., 2001; PILLAI et al., 2006; AMMOR et al., 2008; SCHERTZE et al., 2009; BAI et al., 2011).

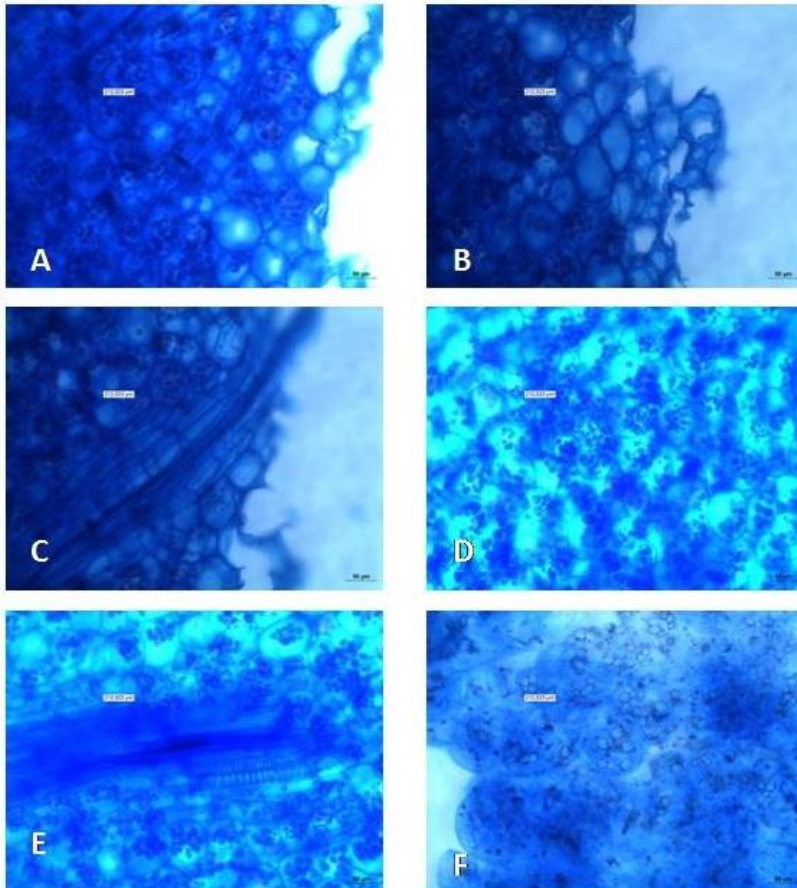
### 5.3.3 Microscopia ótica

A observação dos efeitos do tratamento do purê de abóbora por APDC sobre a microestrutura desta matriz podem contribuir para o conhecimento deste processo. As Figuras 34 – 38 ilustram as imagens obtidas em microscopia ótica com 400 vezes de aumento (400 ×) da abóbora como matéria prima, com detalhes dos elementos de vaso (xilema) (Figura 34); células de parênquima com amiloplastos intactos na matéria prima (Figura 35); purê de abóbora pressurizado (Figura 36); pequenas deformações nas paredes (A) e ruptura dos grânulos de amido (B); purê de abóbora imediatamente após cozimento (Figura 37) onde a seta em (C) destaca o tubo crivado por onde passa a seiva (floema); e o purê de abóbora estéril (Figura 38).

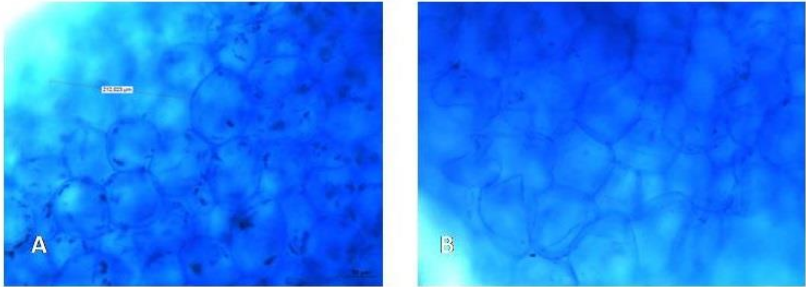
**Figura 34** - Células do parênquima com amiloplastos intactos na matéria prima íntegra (abóbora *in natura*) aumentada 400 ×. Seta: elementos de vasos (xilema).



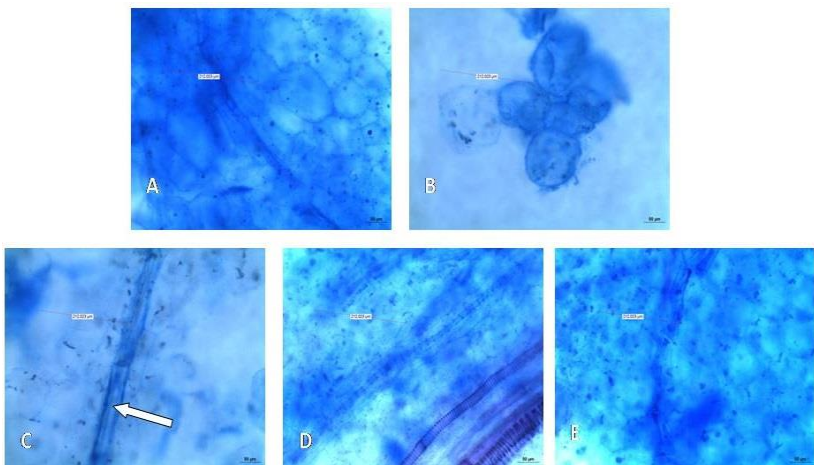
**Figura 35** - (A), (B), (C), (D), (E) e (F): Células do parênquima com amiloplastos intactos na matéria prima íntegra (abóbora in natura) aumentada 400 ×.



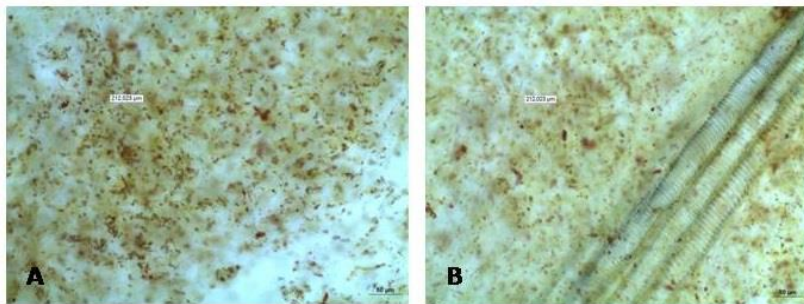
**Figura 36** - Purê de abóbora após processo de APDC aumentado 400 ×: pequenas deformações nas paredes (A) e ruptura dos grânulos de amido (B).



**Figura 37** - (A), (B), (C), (D) e (E): purê de abóbora imediatamente após cozimento, aumentado 400 ×. Seta em (C): elemento de tubo crivado (floema).



**Figura 38** - (A) e (B): purê de abóbora esterilizado aumentado 400 ×.



Poucas mudanças histológicas significativas nas células da abóbora foram observadas. Comparando os tratamentos à abóbora *in natura*, parece que o tratamento preservou a estrutura celular e a integridade da parede celular. O processamento só danificou o amido, o que era esperado porque o produto é decorrente de um cozimento, primeiramente. As amostras sujeitas à alta pressão apresentaram algumas poucas descontinuidades nas paredes celulares, mas rompimentos não foram observados. Não há dados na literatura apresentando as mudanças de um purê em geral, através de um tratamento por alta pressão. A maioria das análises microscópicas tem por objetivo observar os danos nas células dos micro-organismos e não no ambiente em que eles estão inseridos. Estes resultados levam a crer que o processamento via APDC dentro de uma segurança microbiológica alvo preserva mais a integridade do produto que está sendo submetido a tal processo.

#### 5.4 TRATAMENTO NÃO TÉRMICO DO PURÊ DE ABÓBORA UTILIZANDO PLASMA FRIO

##### 5.4.1 Efeito do plasma frio nas características físico-químicas do purê de abóbora

Este é o primeiro trabalho, até o presente momento, investigando os efeitos do tratamento do purê de abóbora com plasma frio. As Tabelas 14 e 15 ilustram as características físico-químicas, e a avaliação de cor, respectivamente, da abóbora *in natura*, purê esterilizado, e do tratamento em plasma frio por 5, 10, 15 e 20 minutos dos purês de abóbora em estudo.

**Tabela 15** - Efeito do tratamento em plasma frio sobre o pH, acidez titulável (AT), teor de sólidos solúveis (TSS) e carotenoides totais das amostras de abóbora *in natura*, purê de abóbora esterilizado e do purê de abóbora esterilizado após processo de plasma frio por 5 (Plasma 5), 10 (Plasma 10), 15 (Plasma 15) e 20 minutos (Plasma 20).

Amostras	pH	AT (% NaOH 1 mol L <sup>-1</sup> )	TSS (°Brix)	Carotenoides totais (µg g <sup>-1</sup> )
Abóbora <i>in natura</i>	6,66 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,526 ± 0,002 <sup>f</sup>	6,13 ± 0,06 <sup>ab</sup>	73,67 ± 1,94 <sup>a</sup>
Purê esterilizado	5,78 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,981 ± 0,001 <sup>a</sup>	6,33 ± 0,15 <sup>a</sup>	72,74 ± 0,04 <sup>a</sup>
Plasma 5	5,73 ± 0,15 <sup>c</sup>	1,578 ± 0,002 <sup>b</sup>	5,23 ± 0,06 <sup>c</sup>	43,67 ± 5,63 <sup>b</sup>
Plasma 10	5,82 ± 0,12 <sup>c</sup>	1,045 ± 0,002 <sup>d</sup>	5,37 ± 0,15 <sup>c</sup>	41,89 ± 3,63 <sup>b</sup>
Plasma 15	5,77 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,270 ± 0,001 <sup>c</sup>	5,93 ± 0,21 <sup>b</sup>	42,71 ± 0,73 <sup>b</sup>
Plasma 20	6,12 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,943 ± 0,001 <sup>e</sup>	5,93 ± 0,12 <sup>b</sup>	65,48 ± 1,58 <sup>a</sup>

\* Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas possuem diferença significativa (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey.

**Tabela 16** - Parâmetros de cor CIELab das amostras de abóbora *in natura*, purê de abóbora esterilizado e purê de abóbora esterilizado após processo de plasma frio por 5 (Plasma 5), 10 (Plasma 10), 15 (Plasma 15) e 20 minutos (Plasma 20). O valor foi calculado com base na média de 5 leituras de cada parâmetro.

Amostras	L*	a*	b*
Abóbora <i>in natura</i>	57,80 ± 1,19 <sup>a</sup>	26,02 ± 3,32 <sup>a</sup>	42,25 ± 2,70 <sup>ab</sup>
Purê esterilizado	46,40 ± 0,79 <sup>d</sup>	15,69 ± 1,17 <sup>b</sup>	41,39 ± 1,10 <sup>b</sup>
Plasma 5	51,16 ± 2,55 <sup>b</sup>	11,65 ± 0,85 <sup>c</sup>	47,72 ± 3,37 <sup>a</sup>
Plasma 10	50,52 ± 2,85 <sup>bc</sup>	10,65 ± 0,44 <sup>c</sup>	46,09 ± 3,69 <sup>ab</sup>
Plasma 15	47,44 ± 1,47 <sup>cd</sup>	12,23 ± 0,45 <sup>c</sup>	42,25 ± 2,44 <sup>b</sup>
Plasma 20	50,20 ± 1,27 <sup>bc</sup>	12,44 ± 0,06 <sup>c</sup>	47,97 ± 1,71 <sup>a</sup>

\* Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas possuem diferença significativa (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey.

O pH das amostras de purê de abóbora após ser processado por plasma frio descarga corona com argônio se manteve constante até 15 minutos. No entanto, em 20 minutos de processo, houve um leve aumento no pH apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as demais condições, bem como na forma *in natura*.

Misra et al. (2014a) relataram um aumento no pH de tomates cereja após tratamento com plasma frio durante estocagem, mas atribuíram estas alterações às mudanças metabólicas e à perda de água das amostras. Resultados onde não houve mudanças no pH são mais comuns em plasma utilizando argônio. Ma et al. (2015) analisaram mudanças no pH em morangos tratados por jatos de plasma frio e verificaram que o processamento não alterou significativamente ( $p < 0,05$ ) este parâmetro após ser processado e mesmo após ser estocado por 4 dias.

Almeida et al. (2015) mostraram que o tratamento com plasma reduz o pH de suco de laranja prebiótico, mas dentro do esperado para um suco cítrico (aproximadamente 0,40 – 0,50 a menos da amostra controle de pH = 4,43). O comportamento deste parâmetro no presente trabalho foi semelhante ao relatado por Gurol et al. (2012), que embora tenham utilizado plasma a frio com descarga corona para inativação de *E. coli* em leite integral, o pH das amostras não variou em intervalos de tempo de 0 a 20 minutos de aplicação, indicando que o tratamento não causa acidez ou alcalinidade.

Kim et al. (2011) testando plasma em bacon também relatam que o processo não influenciou no pH, assim como Surowsky et al. (2013) ao utilizar um modelo de alimento para testar enzimas com plasma frio, reportaram a manutenção constante do pH durante toda a atividade. Yong et al. (2015) ao testarem plasma DBD em fatias de queijo cheddar, relataram que por mais de 5 minutos, o pH declinou significativamente ( $p < 0,05$ ). O pH também decresceu para água destilada e suco de laranja tratados por plasma (KORACHI et al., 2011; SHI et al., 2011).

Tang et al. (2008) sugerem que reações formadoras de ácidos com moléculas acidogênicas (como o  $\text{NO}_x$ ) explicam a indução do plasma em diminuir o pH, hipótese de acordo também com Fröhling et al. (2012). Korachi et al. (2011) e Pal et al. (2016) sugerem que o aumento em  $\text{H}^+$ , que é dissociado das moléculas bacterianas ou  $\text{H}_2\text{O}$ , também contribuem para a redução do pH, observado em seguida ao tratamento de plasma. A flutuação do pH é conhecida como um fator de estresse na bactéria e pode causar a sua morte, desempenhando assim, um importante papel na inativação de patógenos.



A acidez titulável (AT) apresentou diferença significativa entre todas as amostras, tendo o menor valor, entre os processados, para a condição de 20 minutos e o teor de sólidos solúveis (TSS), diminuiu, sendo esse decréscimo mais acentuado nos tempos iniciais.

Tappi et al. (2016) analisaram AT e TSS em cortes de melão após processamento por plasma do tipo DBD por 15 (15 + 15) e 30 (30 + 30) minutos. Os autores verificaram pequenas diferenças significativas entre a amostra controle e as tratadas por plasma. A AT foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que as amostras controle após estocagem por 2 dias nos dois tempos de tratamento. Apenas após 2 e 4 dias de estocagem o TSS decaiu significativamente ( $p < 0,05$ ).

Ramazzina et al. (2015) verificaram TSS e AT em kiwi após tratar com plasma do tipo DBD e observaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de TSS com o tempo de estocagem (4 dias) provavelmente devido à conversão do amido em açúcares, mas que isto não foi afetado pelo processo, embora significante efeito interativo entre tempo de tratamento de 20 minutos (20 + 20) e tempo de estocagem apresentaram um aumento relevante. Já a AT foi significativamente ( $p < 0,05$ ) afetada pelo tempo de estocagem, tempo de tratamento e suas interações, principalmente após 4 dias de estocagem com tempo de tratamento 10 minutos (10 + 10).

O processamento em plasma frio parece afetar o teor de carotenoides totais. Embora a 20 minutos não tenha apresentado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras referências (*in natura* e purê esterilizado), houve um decréscimo no teor de carotenoides em todas as amostras processadas por plasma frio.

Ramazzina et al. (2015) trabalhando com plasma em kiwi verificaram que o teor de carotenoides diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) com o tempo de estocagem (até 4 dias) mas as amostras tratadas por plasma apresentaram uma perda de pigmentos mais limitada ao longo do tempo de estocagem do que as amostras controle.

O impacto do plasma na cor, principalmente na superfície dos alimentos é provavelmente o parâmetro mais amplamente estudado em plasma, talvez por ser um indicador de frescor e qualidade além de influenciar o poder de decisão de compra do consumidor. Em purê de abóbora, o parâmetro  $L^*$  (luminosidade) apresentou um leve declínio após sofrer tratamento, sendo mais acentuado ao ser esterilizado. Entre as amostras tratadas com plasma, houve pouca variação, embora a estatística mostre que houve diferença significativa entre os tempos de 5 e 15 minutos com os demais. O parâmetro  $a^*$  (vermelho/verde) foi o mais afetado, apresentando grande perda em relação à amostra *in*

*natura*, sendo esta perda acentuada após tratamento com plasma, não apresentando diferença significativa entre todos os tempos expostos ao tratamento ( $p < 0,05$ ).

O parâmetro  $b^*$  (amarelo/azul) foi levemente superior após exposição ao plasma, exceto no tempo 15 minutos em que o valor foi próximo do purê estéril e da abóbora *in natura*. Significativas mudanças na cor devido ao uso de plasma foram observadas para o pimentão vermelho em pó, independente do tempo de tratamento. O valor de  $a^*$  diminuiu enquanto o  $L^*$  e o  $b^*$  aumentaram, resultando em uma cor mais clara e tendendo ao amarelo. No pimentão em pó, o conteúdo de carotenoides é responsável pela característica avermelhada, porém é concebível que RNS, como  $\text{HNO}_2$ , dentro da amostra interage com os carotenoides e provavelmente provoque oxidação, resultando nesta perda de cor (HERTWIG et al., 2015).

Rød et al. (2012) conduziram um estudo com produto cárneo “pronto para comer” (*ready-to-eat*) e verificaram 40 % de perda do parâmetro  $a^*$  que ficou mais evidente após 14 dias de estocagem, sugerindo uma possível reação química dos pigmentos vermelhos da carne com espécies do plasma. Lacombe et al. (2015) verificaram alterações em mirtilo expostos a plasma frio por até 120 segundos, tendo impacto significativo ( $p < 0,05$ ) após 45 s ( $b^*$ ) e 120 s ( $L^*$  e  $a^*$ ).

Almeida et al. (2015) analisaram em suco de laranja prebiótico após uso de jatos de plasma frio que o parâmetro  $L^*$  teve um leve aumento (3 unidades) em relação a amostra controle em tempos entre 15 – 60 minutos. Bermúdez-Aguirre et al. (2013) observaram um leve aumento no parâmetro  $a^*$  em tomates após plasma frio descarga corona, porém sem diferença significativa em relação ao controle ( $p > 0,05$ ). Já em cenouras, nenhuma mudança nos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) foi encontrada. Ma et al. (2015) avaliando plasma ativado em água para inativação de bactérias deteriorantes em morangos, verificaram que o processo induziu a um pequeno aumento de  $a^*$  e  $b^*$  em 4 dias de estocagem.

Algumas publicações relatam que nenhuma mudança significativa ocorre nos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  após processo de plasma frio. Nenhuma mudança nos parâmetros de cor foi observada em alga comestível estudada por Kim et al. (2015), em suco de romã analisado por Kovacevic et al. (2016), mesmo em diferentes volumes e tempos de tratamentos, em kiwi analisado por Ramazzina et al. (2015) que só apresentaram um leve decréscimo durante a estocagem (4 dias), em amostras de carne com argônio como gás de arraste relatadas por Ulbin-Figlewicz et al. (2015), em maçãs submetidas a inativação

microbiana por Niemira et al. (2008) onde nenhuma alteração sensorial foi detectada e em tomates cereja de acordo com Misra et al. (2014a). De acordo com Critzer et al. (2007), a principal limitação do uso do plasma na indústria de alimentos é o tratamento dos produtos com alto conteúdo lipídico e antioxidantes devido à possível oxidação gerada pelas espécies reativas do plasma (ROS e RNS). Enquanto o plasma na inativação de micro-organismos em alimentos já está sendo bastante difundido em publicações, principalmente nos anos mais recentes, existe uma carência muito grande de estudos de impacto do plasma nos atributos de qualidade dos alimentos processados. Todavia, o conhecimento sobre as mudanças na qualidade é de grande importância, visto que há limitações entre os alimentos sólidos e líquidos tratados por esta tecnologia, sendo suscetíveis a reações de degradação.

### 5.4.2 Efeito do plasma frio na inativação de *E. coli* em purê de abóbora

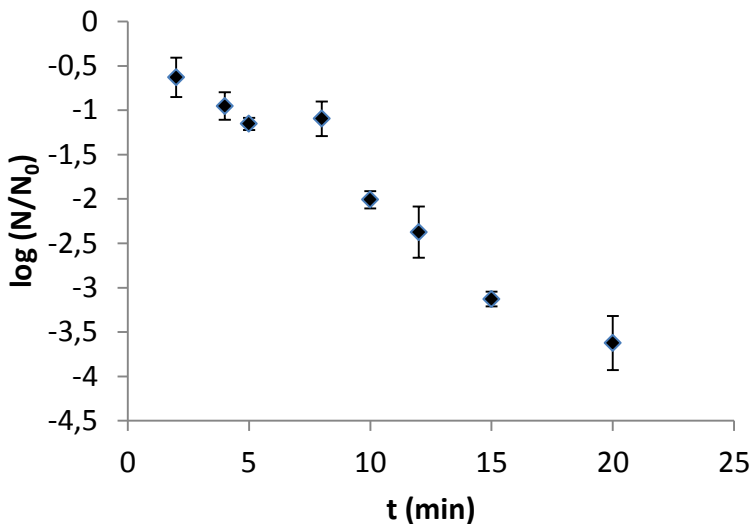
Os efeitos do tratamento em plasma frio sobre a inativação de *E. coli*, em purê de abóbora foram acompanhados por 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15 e 20 minutos de tratamento. A Tabela 16 e a Figura 39 ilustram os valores de inativação de *E. coli* em purê de abóbora em descarga corona sob pressão atmosférica e temperatura ambiente em função do tempo de tratamento (t). Observa-se uma tendência de maior inativação microbiana à medida que o tempo passa, visto que a regressão linear (Figura 39) obteve bom ajuste aos dados experimentais.

**Tabela 17** - Efeito do plasma frio sobre a inativação de *E. coli* em purê de abóbora, com descarga corona em pressão atmosférica em função do tempo de tratamento (t). Resultados são médias baseadas em dados de três experimentos à temperatura ambiente (25 °C) e desvios são apresentados com o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Experimento	t (min)	- log (N/N0)
1	2	0,630 ± 0,223c
2	4	0,953 ± 0,155c
3	5	1,154 ± 0,069c
4	8	1,096 ± 0,194c
5	10	2,009 ± 0,098b
6	12	2,374 ± 0,289b
7	15	3,128 ± 0,084a
8	20	3,624 ± 0,304a

\* Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas possuem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

**Figura 39** - Efeito do plasma frio sobre a contagem de *E. coli* com descarga corona em função do tempo de tratamento em purê de abóbora. Resultados são médias baseadas nos dados de três experimentos em temperatura ambiente (25 °C) e pressão atmosférica e os desvios são representados pelas barras de erros.



Estudos observando a descontaminação de produtos pastosos, como o purê de abóbora por aplicações de plasma frio são escassos. As interações complexas entre plasma frio e os micro-organismos tratados se tornam difíceis de comparar pelos resultados obtidos por várias configurações de plasmas, pois há diferença em fatores, como o uso de gás ou mistura gasosa do processo, o gerador de plasma, o tipo de aplicação (modo direto ou indireto), os micro-organismos investigados (bactérias vegetativas, endosporos ou bolores) e o produto a ser tratado são todos de grande importância para avaliar a eficiência de um tratamento por plasma (SCHLÜTER et al., 2013).

Muitos trabalhos reportaram os mecanismos de inativação microbiana, que ainda não estão bem esclarecidos e são objetivos de estudos mais recentes (BAIER et al., 2013; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; FERNANDEZ et al., 2013; NI et al., 2013; MISRA et al., 2014a; 2014b). A maioria relaciona a inativação celular por plasma com o dano na membrana celular, em um mecanismo similar ao da tecnologia de campo elétrico pulsado (CEP), tal como geração de poros

e acúmulo transmembrânico de cargas (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013).

Laroussi et al. (2004) relatam que radicais OH são capazes de oxidar ácidos graxos que são importantes componentes das paredes celulares de diversos micro-organismos, rompendo assim ligações peptídicas e oxidando cadeias de aminoácidos. Da mesma forma, Surowsky et al. (2014) relataram que os efeitos letais na inativação por plasma são supostamente baseados nos danos nas membranas celulares e na geração de radicais peróxidos, que iniciam reações de oxidação.

Ziuzina et al. (2014) expuseram tomates cerejas em plasma frio para inativar *E. coli* e atingiram uma redução de 6,3 ciclos log em tempo de tratamento de 60 segundos. Quando colocaram morangos expostos às mesmas condições, o tempo de tratamento de 300 s (em função da superfície do morango) foi necessário para atingir 3,5 ciclos log de redução. Song et al. (2015) avaliando a inativação de *E. coli* O157:H7 obtiveram aproximadamente 5,5 ciclos log de inativação em 10 minutos de tratamento via plasma frio. Prieto-Calvo et al. (2016) comparando a eficácia de plasma frio com UV na inativação de bactérias *E. coli* VTEC verificaram que o plasma foi menos eficaz, em geral, com reduções < 3 ciclos log, após tratamentos de até 3 minutos em equipamento de escala laboratorial.

Kim et al. (2015) ao avaliarem a inativação microbiana em alga marinha comestível exposta em jatos de plasma observaram uma redução de até 99 % de contaminantes, mostrando-se eficiente neste tipo de superfície. Surowsky et al. (2014) ao verificarem a inativação de *C. freundii* em suco de maçã por jatos de plasma, observaram que a membrana do micro-organismo não foi completamente rompida pela exposição do plasma e que as espécies reativas podem continuar agindo mesmo após a exposição do plasma (8 minutos), resultando num aumento na permeabilização da membrana durante o tempo de estocagem (de até 24 h). No caso de plaqueamento imediato, baixa taxa de inativação (de cerca de 1 ciclo log) foi observada. Em comparação com plaqueamento após 3 h, uma redução de 4,4 ciclos log foi observada e após 24 horas, a redução foi em torno de 5,1 ciclos log. Através de análises de fluxo citométrico, os autores concluíram que espécies reativas do plasma permaneceram ativas no suco de maçã após ser submetida ao processo. Pasquali et al. (2016) relataram que o tratamento de plasma DBD é capaz de reduções significativas em *E. coli* em chicória vermelha, mas não o suficiente para eliminar todos os patógenos em 15 ou 30 minutos. Fernandez et al. (2013) avaliaram a eficácia de plasma frio para descontaminação de superfícies de alfaces,

morangos e cortes de batatas inoculados com *Salmonella Typhimurium*. Eles sugeriram que a diferença na eficiência do plasma nestes alimentos frescos é consequência das características das suas superfícies.

Algumas publicações têm mostrado que a concentração inicial de bactérias, duração do tratamento e a estrutura do meio de suporte desempenham um fundamental papel na eficácia antimicrobiana de aplicações de plasma frio (LAROUSSEI et al., 2004; OHKAWA et al., 2006; SEN et al., 2013; BAIER et al., 2015). Bermúdez-Aguirre et al. (2013) em concordância com várias publicações relataram que a contagem inicial no produto é um importante fator a ser considerado durante a inativação porque quando uma alta concentração de micro-organismos é utilizada, diversas camadas ou aglomerações (*clumps*) de bactérias são formadas e as células se protegem contra a radiação do plasma. No entanto, quando o número inicial de células é abaixo de  $10^5$  UFC/mL, uma monocamada de células tem sido observada, expondo todos os micro-organismos diretamente à radiação plasma e melhorando a inativação. Bermúdez-Aguirre et al. (2013) também relataram que superfícies altamente porosas podem ser responsáveis pela baixa taxa de inativação bacteriana pois a bactéria pode migrar e se proteger da ação do plasma, como aconteceu com testes em cenoura, fatias de presunto e queijo. Em teste com plasma frio descarga corona destes mesmos autores em tomate e alface para inativar *E. coli*, usando uma voltagem de 11,45 kV, obtiveram reduções ( $< 1$  ciclo log em 10 minutos). Quando a voltagem variou e o tempo foi fixo (10 minutos), conseguiram atingir um nível maior de inativação (aproximadamente 1,7 ciclos log a 12,83 kV).

O tomate obteve um nível de inativação um pouco maior do que a alface, devido à variação da superfície entre os vegetais, sendo o tomate mais homogêneo e com superfície mais suave que não oferece proteção aos micro-organismos contra agentes de desinfecção, enquanto que a estrutura da alface permite a migração interna dos micro-organismos, o que está de acordo também com o que sugeriram Huang et al. (2007). Os autores relataram que o efeito de espécies carregadas da descarga com argônio não foi suficiente para inativar altas cargas de micro-organismos. Oxigênio e nitrogênio são muito efetivos na inativação de bactérias, vírus e até esporos, mas o argônio previne alguma possível reação nos vegetais, visto que espécies letais como  $O\bullet$ ,  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $OH\bullet$ ,  $NO\bullet$  e  $NO_2$  são advindas de oxigênio e nitrogênio. O oxigênio pode afetar a membrana lipídica dos micro-organismos devido à formação de peróxidos. A oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos tem importante efeito de letalidade nos micro-organismos (SONG et al.,

2009; LACKMANN et al., 2014; SUROWSKY et al., 2014). Tappi et al. (2016) apresentaram resultados imediatos de redução de viabilidade celular em bactérias deteriorantes em cortes de melão, com o aumento do tempo. Em tempo de 30 minutos (30 + 30), as reduções chegaram entre 2 e 3,4 ciclos log para bactérias mesofílicas e ácido lácticas, respectivamente, mas a cerca de 1 ciclo log para bactérias psicotróficas. Estes autores atribuem esses resultados de inativação às ROS e RNS durante a descarga. Lacombe et al. (2015) avaliaram a eficiência de plasma frio na microbiota nativa de mirtilo e observaram uma redução de 0,8 – 1,6 ciclos log (entre 15 e 120 segundos de tratamento) que persistiu ao longo do período de estocagem (a 4 °C) por até 7 dias, onde todas as amostras apresentaram em torno de 1,5 ciclos log de redução em comparação com as amostras controle. Dobrynin et al. (2009) concluíram que a presença de água é requerida para atingir uma rápida inativação e esta inativação é altamente dependente da quantidade de água, após testes com tratamento a seco, úmido e molhado. Guo et al. (2015) dizem que tudo indica que a umidade ou quantidade de água desempenha uma importante função no processo de inativação e não pode ser negligenciada, porém o exato mecanismo fundamental da interação de diferentes agentes de plasma com água e micro-organismos ainda permanece sem esclarecimentos, o que é atribuído às variações de diferentes configurações de experimentos construídos por diversos pesquisadores. A bactéria gram-negativa como *E. coli* é menos resistente ao plasma devido à falta de uma parede celular rígida que as gram-positivas possuem, porém, em alguns estudos, *E. coli* O157:H7 apresentou diferente resistência ao plasma frio de acordo com pH, temperatura e outros fatores em relação às bactérias gram-positivas. As células são menos resistentes ao plasma quando o pH é menor, sendo preferido em relação ao pH neutro. Da mesma forma, amostras que são incubadas a temperaturas baixas (10 °C) são preferíveis em relação às mais quentes (35 °C). Quando há determinadas combinações destes parâmetros, as células apresentam certa resistência ao plasma frio (KAYES et al., 2007; OTTO et al., 2011; BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013).



Baier et al. (2015) relataram que sob mesmas condições, bactérias do gênero *E. coli* patogênicas ou não patogênicas apresentaram desempenhos similares em relação à inativação por jatos de plasma. Em descarga corona fosforescente para inativação de bactérias deteriorantes comuns em alimentos proposto por Mok et al. (2015), a *E. coli*, dentre seis tipos de bactérias testadas, foi a que apresentou maior suscetibilidade de inativação perante o processo. Lu et al. (2013) relataram que a resistência da *E. coli* é baseada na conversão de L-glutamina em L-glutamato liberando prótons de amônia que leva a altos valores de pH intracelular.

Shimizu et al. (2008) relatam que a radiação UV desempenha um papel dominante como agente no processo de inativação microbiana quando argônio é usado como gás de arraste e a descarga é do tipo micro-ondas a 2,45 Hz, sendo ainda maior quando usado argônio em combinação com  $N_2/O_2$  neste mesmo tipo de descarga.

Timoshkin et al. (2012) concluíram que ROS e RNS apresentaram efeito bactericida e a existência de uma correlação entre a geração de ozônio e os efeitos bactericidas induzidos pelo tratamento indireto por descarga corona. Uhm et al. (2007) demonstraram experimentalmente que a relação entre argônio e  $O_2$  em jatos de plasma é muito efetiva em inativar esporos de *Bacillus* e atribuíram este fato ao radical oxigênio como fator dominante.

Detalhadas discussões dos mecanismos além do escopo deste trabalho podem ser encontrados em recentes publicações, onde uma relativa contribuição de compostos produzidos por plasma não térmico em pressão atmosférica é analisada e muitas reações bioquímicas intracelulares e vias bioquímicas, em que as reações com nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS) desempenham um importante papel negativo ou positivo (GRAVES, 2012; LACKMANN et al., 2014; YOUSFI et al., 2014; SUROWSKY et al., 2015).

## Capítulo 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

### 6.1 CONCLUSÕES

- O tempo ideal para produzir um purê de abóbora por cozimento em vapor evitando máxima perda de compostos foi 20 minutos.
- A esterilização em autoclave a 121 °C continua sendo o método mais eficiente para eliminação total da carga microbiana, visto que as tecnologias emergentes não térmicas não conseguiram inativação total da *E. coli* nos processos estudados neste trabalho.
- O processamento em autoclave acarreta em alterações significativas nas características físico-químicas do purê de abóbora, principalmente na acidificação do meio, mas não a ponto de considerar o produto como alimento ácido (pH < 4,6).
- Foram identificados majoritariamente no *headspace* do purê de abóbora, esterilizado em embalagens *pouch stand up*, grupos funcionais alcenos, aldeídos, álcoois, cetonas e ésteres. Muitos compostos destes grupos estão envolvidos na caracterização do perfil aromático do purê de abóbora, bem como em componentes da degradação de carotenoides e acidificação do meio.
- A tecnologia de CEP atingiu inativação considerada moderada (entre 1 e 3 ciclos log) sendo necessário mais estudos sobre outros parâmetros que possam potencializar a taxa de morte microbiana, dada a diversidade de parâmetros envolvidos neste processo. A condutividade elétrica da matriz não foi suficiente para aumentar a taxa de inativação da *E. coli* via CEP.
- A APDC se apresentou limitada em relação à segurança microbiológica do purê de abóbora, visto que a máxima redução de *E. coli* foi de 3,17 ciclos log em 8 h de processo a 275 bar e 32 °C, necessitando estudos futuros variando outros parâmetros do processamento e não negligenciando a complexidade da matriz alimentar tratada. A APDC induz a acidificação e concentração de TSS, ART e carotenoides totais no purê de abóbora. A microscopia ótica confirmou que a APDC nas condições estudadas preserva a integridade microestrutural do produto.
- O plasma frio com descarga corona obteve uma redução de

3,624 ciclos log em 20 minutos de processo, sendo, dentro do proposto, insuficiente mas promissora para garantir a segurança microbiológica do produto. Há a necessidade de aprofundamento das variáveis envolvidas no processo para que haja esclarecimento de mecanismos de inativação no purê de abóbora, visto que são escassos dados com este propósito. O plasma frio induz a acidificação e concentração de sólidos no purê de abóbora, porém reduz significativamente os níveis de carotenoides totais e o parâmetro  $a^*$  e  $L^*$ , o que pode não ser sensorialmente desejável.

- A tecnologia de plasma frio mostrou ser mais promissora dentre as tecnologias emergentes não térmicas por apresentar maior inativação microbiana, com relativa rapidez de tratamento e baixo consumo de energia no processo.

## 6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da vida útil do purê de abóbora em embalagens flexíveis do tipo *pouch* processado por autoclave em contra-pressão, analisando as alterações físico-químicas durante a estocagem.
- Quantificação dos compostos voláteis no *headspace* das embalagens *pouch* por cromatografia.
- Estudo do processamento do purê de abóbora via CEP em modo contínuo, analisando a influência de cada parâmetro no processo e as alterações físico-químicas, sensoriais e microbiológicas;
- Estudo do processamento do purê de abóbora por APDC variando outros parâmetros do processo como pressurização em ciclos e diferentes temperaturas visando à redução da carga microbiana e alterações físico-químicas e sensoriais, bem como em modo contínuo.
- Estudo do processamento do purê de abóbora por plasma frio com outros gases de processo e por tempos mais longos, analisando as alterações físico-químicas e sensoriais ocorridas durante o processamento.
- Estudo de métodos combinados não térmicos com tratamento térmico, utilizando temperaturas mais elevadas.

## Capítulo 7 – REFERÊNCIAS

---

AHMED, J.; AL-FOUDARI, M.; AL-SALMAN, F.; ALMUSALLAM, A. S. Effect of particle size and temperature on rheological, thermal, and structural properties of pumpkin flour dispersion. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 43 – 53, 2014.

ALEKSANDROV, N. L.; BAZELYAN, E. M.; NOVITSKII, D. A. Influence of moisture on the properties of long streams in air. **Technical Physics Letters**, v. 24, n. 5, p. 367 – 368, 1998.

ALIBAS, I. Microwave, air and combined microwave-air-drying parameters of pumpkin slices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 1445 – 1451, 2007.

ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, A. N. F.; RODRIGUES, S. Effect of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 127 – 135, 2015.

ALONSO, A. A.; ARIAS-MÉNDEZ, A.; BALSACANTO, E.; GARCIA, M. R.; MOLINA, J. I.; VILAS, C.; VILLAFÍN, M. Real time optimization for quality control of batch thermal sterilization of prepackaged foods. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 392 – 403, 2013.

ALVAREZ, I.; RASO, J.; PALOP, A.; SALA, F. J. Influence of factors on the inactivation of *Salmonella Senftenberg* by pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1 – 3, p. 143 – 146, 2000.

ALVAREZ, I.; PAGAN, R.; CODON, S.; RASO, J. The influence of process parameters for inactivation of *L. monocytogenes* by pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1 – 2, p. 87 – 95, 2003.

AMARIZ, A.; LIMA, M. A. C.; BORGES, R. M. E.; BELÉM, S. F.; PASSOS, M. C. L. M. S.; TRINDADE, D. C. G.; RIBEIRO, T. P. Caracterização da qualidade comercial e teor de carotenoides em

- acessos de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, S541 - S547, 2009.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of *quorum sensing* in food spoilage. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1510 – 1525, 2008.
- AMORIM-CARRILHO, K. T.; CEPEDA, A.; GENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49 – 73, 2014.
- ANGERSBACH, A.; HEINZ, V.; KNORR, D. Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 135 – 149, 2000.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B. & REUCK, M. K. International thermodynamic tables of the fluid state: carbon dioxide. Oxford: Pergamon Press, 340 p., 1976.
- ARIAS-MENDEZ, A.; VILAS, C.; ALONSO, A. A.; BALSACANTO, E. Time-temperature integrators as predictive temperature sensors. **Food Control**, v. 44, p. 258 – 266, 2014.
- ARIMA, H. K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from northeastern Brazil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 40, n. 2, p. 282 – 292, 1990.
- ARONSSON, K.; RÖNNER, U.; BORCH, E. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 19 – 32, 2005.

ASSOUS, M. T. M.; SAAD, E. M. S.; DYAB, A. S. Enhancement of quality attributes of canned pumpkin and pineapple. **Annals of Agricultural Science**, v. 59, n. 1, p. 9 – 15, 2014.

AYVAZ, H.; SCHIRMER, S.; PARULEKAR, Y.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; SOMERVILLE, J. A.; DARYAEI, H. Influence of selected packaging materials on some quality aspects of pressure-assisted thermally processed carrots during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 437 – 447, 2012.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 6, p. 584 – 602, 2007.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 8, p. 845 – 855, 2005.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 4027 – 4033, 2007.

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial *Quorum Sensing* and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183 – 193, 2011.

BAIER, M.; FOERSTER, J.; SCHNABEL, U.; KNORR, D.; EHLBECK, J.; HERPPICH, W. B.; SCHLÜTER, O. Direct non-thermal plasma treatment for the sanitation of fresh corn salad leaves: evaluation of physical and physiological effects and antimicrobial efficacy. **Postharvest Biological Technology**, v. 84, p. 81 – 87, 2013.

BAIER, M.; GÖRGEN, M.; EHLBECK, J.; KNORR, D.; HERPPICH, W. B.; SCHLÜTER, O. Non-thermal atmospheric pressure plasma: Screening for gentle process conditions and antibacterial efficiency on perishable fresh produce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 147 – 157, 2014.

BAIER, M.; JANSSEN, T.; WIELER, L. H.; EHLBECK, J.; KNORR, D.; SCHLÜTER, O. Inactivation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 using cold atmospheric pressure plasma. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 3, p. 275 – 279, 2015.

BALLESTRA, P.; SILVA, A. A. D.; CUQ, J. L. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 829 – 836, 1996.

BARBA, F. J.; JÄGER, H.; MENESES, N.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A.; KNORR, D. Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 14, p. 18 – 24, 2012.

BARBOSA-CANOVAS, G. V.; GONGORA-NIETO, M. M.; POTHAKAMURY, U. R.; SWANSON, B. G. **Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields**, Academic Press, San Diego, CA., 1999.

BATMAZ, E.; SANDEEP, K. P. Integration of ResonantAcoustic ® mixing into thermal processing of foods: A comparison study against other in-container sterilization technologies. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 124 – 132, 2015.

BENDICHO, S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; MARTIN, O. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 6 – 7, p. 195 – 204, 2002.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; WEMLINGER, E.; PEDROW, P.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; GARCIA-PEREZ, M. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 149 – 157, 2013.

BI, X.; WU, J.; ZHANG, Y.; XU, Z.; LIAO, X. High pressure carbon dioxide treatment for fresh-cut carrot slices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 298 – 304, 2011.

BI, X.; WANG, Y.; ZHAO, F.; ZHANG, Y.; RAO, L.; LIAO, X.; HU, X.; SUN, Z. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure carbon dioxide combined with nisin in physiological saline, phosphate-



buffered saline and carrot juice. **Food Control**, v. 41, p. 139 – 146, 2014.

BIAN, X.; WANG, L.; MACALPINE, J. M. K.; GUAN, Z.; HUI, J.; CHEN, Y. Positive corona inception voltages and corona currents for air at various pressures and humidities. **IEEE Transactions Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 17, n. 1, p. 63 – 70, 2010.

BIESIADA, A.; NAWIRSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKOL-LETOWSKA, A. The effect of nitrogen fertilization methods on yield and chemical composition of pumpkin (*Cucurbita maxima*) fruits before and after storage. **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 70, p. 202 – 211, 2009.

BOULAABA, A.; EGEN, N.; KLEIN, G. Effect of pulsed electric fields on microbial inactivation and physic-chemical properties of whole porcine blood. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 3, p. 215 – 225, 2013.

BOULAABA, A.; KIESSLING, M.; TOPFL, S.; HEINZ, V.; KLEIN, G. Effect of pulsed electric fields on microbial inactivation and gelling properties of porcine blood plasma. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 23, p. 87 – 93, 2014.

BRISSET, J. L.; LELIEVRE, J.; DOUBLA, A.; AMOUROUX, J. Interactions with aqueous solutions of the air corona products. **Revue de Physique Appliquée**, v. 25, n. 6, p. 535 – 543, 1990.

BRUGGEMAN, P.; LEYS, C. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n.5, 2009.

BUCKHOLZ JR., L. L. The role of Maillard technology in flavoring food products. **Cereal Foods World**, v.33, n.7, p. 547 – 551, 1988.

BUSHNELL, A. H.; CLARK, R. W.; DUNN, J. E.; LLOYD, S. W. Process for reducing levels of microorganisms in pumpable food products using a high pulsed voltage system. US Patent, 5514391 A, 1996.

BYUN, Y.; BAE, H. J.; COOKSEY, K.; WHITESIDE, S. Comparison of the quality and storage stability of salmon packaged in various retort

pouches. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 551 – 555, 2010a.

BYUN, Y.; HONG, S. I.; MANGALASSARY, S.; BAE, J. H.; COOKSEY, K.; PARK, H. J.; WHITESIDE, S. The performance of organic and inorganic coated retort pouch materials on the shelf life of ready-to-eat rice products. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 862 – 866, 2010b.

CAILI, F.; HAIJUN, T.; TONGYI, C.; YI, L.; QUANHONG, L. Some properties of an acidic protein-bound polysaccharide from the fruit of pumpkin. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 944 – 947, 2007.

CALBO, A. G. Abóbora (*Cucurbita moschata*) e moranga (*Cucurbita maxima*). In: Luengo, R. F. A., Calbo, A. G. (Eds.). Armazenamento de hortaliças. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, p. 111 – 121, 2001.

CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 397 – 404, 2006.

CARVALHO, P. G. B.; PEIXOTO, A. A. P.; FERREIRA, M. A. J. F. Caracterização de abóboras quanto aos teores de carotenoides totais, alfa e beta caroteno. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, nº 78. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Hortaliças. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 1677-2229, 2011.

CASAROLI, D. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de abóbora variedade menina brasileira. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2005.

CHEN, C. R.; RAMASWAMY, H. S. Multiple ramp-variable retort temperature control for optimal thermal processing. **Food and Bioproducts Processing**, v. 82, n. 1, p. 78 – 88, 2004.

CHEN, J.; WANG, P. Effect of relative humidity on electron distribution and ozone production by DC coronas in air. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 33, n. 2, p. 808 – 812, 2005.

CHENG, X.; IMAI, T.; TEEKA, J.; HIROSE, M.; HIGUCHI, T.; SEKINE, M. Inactivation of bacteriophages by high levels of dissolved CO<sub>2</sub>. **Environmental Technology**, v. 34, n. 1 – 4, p. 539 – 544, 2013.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças. 2<sup>a</sup> ed. Lavras: UFLA, 785 p., 2005.

CHOI, Y. M.; RYU, Y. C.; LEE, S. H.; GO, G. W.; SHIN, H. G.; KIM, K. H. Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine *Longissimus dorsi* muscle. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 317 – 322, 2008.

CLARK, P. Pulsed electric field processing. **Food Technology**, n. 60, p. 66 – 67, 2006.

CONTI, S.; VILLARI, G.; AMICO, E.; CARUSO, G. Effects of production system and transplanting time on yield, quality and antioxidante contente of organic winter squash (*Cucurbita moschata* Duch.). **Scientia Horticulturae**, v. 183, n. 12, p. 136 – 143, 2015.

COOPER, A. Polymer synthesis and processing using supercritical carbono dioxide. **Journal Materials Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 207 – 234, 2000.

CORRIGAN, V. K.; HURST, P. L.; POTTER, J. F. Winter squash (*Cucurbita moschata*) texture: sensory, chemical, and physical measures. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 29, n. 2, p. 111 – 124, 2001.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3<sup>o</sup> vol. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 1032 p., 1982.

CRAVO, A.; RIBEIRO, J.; RIBEIRO, L.; RODRIGUES, C.; SOUSA, J. Pulsos elétricos. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Coimbra, 2009.

CRITZER, F. J.; KELLY-WINTENBERG, K.; SOUTH, S. L.; GOLDEN, D. A. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, n.10, p. 2290 – 2296, 2007.

CROUZET, J.; KANASAWUD, P. Formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids. Carotenoids, Part A. Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation. In L. Packer, **Methods in Enzymology**, San Diego: Academic Press, v. 213, Inc. 1997.

CUBAS, A. L. V.; MACHADO, M. M.; PINTO, C. R. S. C.; MOECKE, E. H. S.; DUTRA, A. R. A. Biodiesel production using fatty acids from food industry waster using corona discharge plasma technology. **Waste Management**, v. 47, Part A, p. 149 – 154, 2016.

DAMAR, S.; BALABAN, M. O. Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. R1 - R11, 2006.

DAMIANI, C.; BOAS, E. V. B. V.; FERRI, P. H.; PINTO, D. M.; RODRIGUES, L. J. Volatile compounds profile of fresh-cut peki fruit stored under different temperatures. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 29, n. 2, p. 435 – 439, 2009.

DARYAEI, H.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; YOUSEF, A. E.; LEGAN, J. D.; TAY, A. Lethality enhancement of pressure-assisted thermal processing against *Bacillus amyloliquefaciens* spores in low-acid media using antimicrobial compounds. **Food Control**, 59, p. 234 – 242, 2016.

DE ANCOS, B.; GONZALEZ, E.; CANO, M. P. Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3542 – 3548, 2000.

DE HAAN, S. W. H.; WILLCOCK, P. R. Comparison of the energy performance of pulse generation circuits for PEF. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 4, p. 349 – 356, 2002.

DELGADO, F. J.; GONZÁLES-CRESPO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, n. 129, n. 3, p. 1156 – 1163, 2011.

DENG, X.; SHI, J.; KONG, M. G. Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 34, n. 4, p. 1310 – 1326, 2006.

DENG, S.; RUAN, R.; MOK, C. K.; HUANG, G.; LIN, X.; CHEN, P. Inactivation of *Escherichia coli* on almonds using nonthermal plasma. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. M62 – M66, 2007a.

DENG, X. T.; SHI, J. J.; KONG, M. G. Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: capability and mechanisms. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 7, 2007b.

DILLOW, A. K.; DEGHANI, F.; HRKACK, J. S.; FOSTER, N. R.; LANGER, R. Bacterial inactivation by using near – and supercritical carbon dioxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 18, p. 10344 – 10348, 1999.

DOBRYNIN, D.; FRIDMAN, G.; FRIEDMAN, G.; FRIDMAN, A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. **New Journal of Physics**, v. 11, p. 26, 2009.

DOEVENSPECK, H. Elektroimpulsverfahren und Vorrichtung zur Behandlung von Stoffen. Patent N° DE 0148380A3, Germany, 1984.

DUNN, J. E.; PEARLMAN, J. S. Methods and apparatus for extending the shelf life of fluid food products. Patent N° US 4695472, USA, 1987.

DUONG, T.; BALABAN, M. Optimisation of the process parameters of combined high hydrostatic pressure and dense phase carbon dioxide on enzyme inactivation in feijoa (*Acca sellowiana*) puree using response surface methodology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 93 – 101, 2014.

DURANCE, T. D. Improving canned food quality with variable retort temperature processes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 4, p. 113 – 118, 1997.

DUTTA, D.; DUTTA, A.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-

carotene in pumpkin puree. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 4, p. 538 – 546, 2006.

EL-ADAWY, T. A.; TAHA, K. M. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1253 – 1259, 2001.

EHLBECK, J.; SCHNABEL, U.; POLAK, M.; WINTER, J.; VON WOEDTKE, T.; BRANDENBURG, R.; HAGEN, T. V. D.; WELTMANN, K. D. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 1, 2011.

ENOMOTO, A.; NAKAMURA, K.; HAKODA, M. & AMAYA, N. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 305 – 307, 1997.

ERKMEN, O. Antimicrobial effects of pressurised carbon dioxide on *Brochothrix thermosphacta* in broth and foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 9, p. 1365 – 1370, 2000.

ERKMEN, O. Kinetic analysis of *Listeria monocytogenes* inactivation by high pressure carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 47, n. 1, p. 7 – 10, 2001a.

ERKMEN, O. Mathematical modelling of *Escherichia coli* inactivation under high pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 39 -43, 2001b.

ERKMEN, O. Effects of high-pressure carbon dioxide on *Escherichia coli* in nutrient broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1 – 2, p. 131 – 135, 2001c.

EVELYN, E.; SILVA, F. V. M. Inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, n. 2, p. 129 – 136, 2015.

EVELYN, E.; KIM, H. J.; SILVA, F. V. M. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. **Food Control**, v. 59, p. 530 – 537, 2016.

FABRONI, S.; AMENTA, M.; TIMPANARO, N.; RAPISARDA, P. Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 477 –484, 2010.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics division. Disponível em: [www.faostat3.fao.org](http://www.faostat3.fao.org). Acesso em: 25-mai-2016.

FDA. U. S. Food and Drug Administration. Disponível em: [www.fda.gov/](http://www.fda.gov/) Acesso em: 22-fev-2013.

FEICHTINGER, J.; SCHULZ, A.; WALKER, M.; SCHUMACHER, U. Sterilisation with low pressure microwave plasmas. **Surface and Coating Technology**, v. 174 - 175, p. 564 – 569, 2003.

FERNÁNDEZ, A.; NORIEGA, E.; THOMPSON, A. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. **Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24 – 29, 2013.

FERRENTINO, G.; BRUNO, M.; FERRARI, G.; POLETTI, M.; BALABAN, M. O. Microbial inactivation and shelf life of apple juice treated with high pressure carbon dioxide. **Journal of Biological Engineering**, v. 3, n. 3, 2009.

FERRENTINO, G.; SPILIMBERGO, S. High pressure carbon dioxide pressurization of solid foods: Current knowledge and future outlooks. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 427 – 441, 2011.

FIALA, A.; WOUTERS, P. C.; VAN DEN BOSCH, E.; CREYGHTON, Y. L. M. Coupled electrical-fluid model of pulsed electric field treatment in a model food system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, n. 4, p. 229 – 238, 2001.

FINCAN, M.; DEVITO, F.; DEJMEK, P. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. **Journal of Food Engineering**, v. 64, n. 3, p. 381 – 388, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

FRASER D. Bursting bacteria by release of gas pressure. **Nature**, v. 167, p. 33 – 34, 1951.

FROELICH, Â.; VILLAVINCENCIO, A. L. C. H. & VANETTI, M. C. D. Potencial do uso da radiação ionizante e CO<sub>2</sub> supercrítico para inativação de *Bacillus cereus* em pimenta-do-reino. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 04, p. 303 – 308, 2009.

FRÖHLING, A.; DUREK, J.; SCHNABEL, U.; EHLBECK, J.; BOLLING, J.; SCHLÜTER, O. Indirect plasma treatment of fresh pork: Decontamination efficiency and effects on quality attributes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 381 – 390, 2012.

FU, C.; SHI, H.; LI, Q. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 73 – 80, 2006.

FURUKAWA, S.; SHIMODA, N. M.; HAYAKAWA, I. Effects of initial concentration of bacterial suspensions on their inactivation by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 5, p. 573 – 577, 2002.

FURUKAWA, S.; WATANABE, T.; KOYAMA, T.; HIRATA, J.; NARISAWA, N.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M. Inactivation of food poisoning bacteria and *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 53 – 55, 2009.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 2, p. 68 – 87, 2012.



GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of brazilian valencia orange juice. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1686 – 1690, 2007.

GARCIA, C. C.; MAURO, M. A.; KIMURA, M. Kinetics of osmotic dehydration and air-drying of pumpkins (*Cucurbita moschata*). **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 284 – 291, 2007.

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

GARCIA-GONZALES, L.; GEERAERD, A. H.; ELST, K.; VAN GINNEKEN, L.; VAN IMPE, J. F.; DEVLIEGHERE, F. Influence of type of microorganism, food ingredients and food properties on high-pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 253 – 263, 2009.

GARCIA-GONZALEZ, L.; GEERAERD, A. H.; MAST, J.; BRIERS, Y.; ELST, K.; VAN GINNEKEN, L.; VAN IMPE, J. F.; DEVLIEGHERE, F. Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 541 – 549, 2010.

GAROFULIC, I. E.; JAMBRAK, A. R.; MILOSEVIC, S.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; ZORIC, Z.; HERCEG, Z. The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 894 – 906, 2015.

GASKOVA, D.; SIEGLER, K.; JANDEROVA, B.; PLASEK, J. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 39, n. 2, p. 195 – 202.

- GAUDREAU, M. P. J.; HAWKEY, T.; PETRY, J.; KEMPKES, M. A. A solid state pulsed power system for food processing. 24<sup>th</sup> Pulses Power Plasma Science Conference, Las Vegas, USA, 2001.
- GEORGESCU, N.; LUNGU, C. P.; LUPU, A. Chemical activation of the high voltage pulsed cold atmospheric plasma jets. **Romanian Reports in Physics**, v. 62, n. 1, p. 142 – 151, 2010.
- GERLACH, D.; ALLEBORN, N.; BAARS, A.; DELGADO, A.; MORITZ, J. KNORR, D. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 408-417, 2008.
- GEVEKE, D. J. Non-thermal processing by radio frequency electric fields. **Emerging Technologies for Food Processing**, p. 307-322, 2005.
- GHANI, A. G. A.; FARID, M. M.; CHEN, X. D. RICHARDS, P. Thermal sterilization of canned food in a 3-D pouch using computational fluid dynamics. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 147 – 156, 2001.
- GHANI, A. G. A.; FARID, M. M.; CHEN, X. D. Theoretical and experimental investigation of the thermal destruction of Vitamin C in food pouches. **Computers and Electronics in Agriculture**, n. 34, p. 129 – 143, 2002.
- GLIEMMO, M. F.; LATORRE, M. E.; GERSCHENSON, L. N.; CAMPOS, C. A. Color stability of pumpkin (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) puree during storage at room temperature: Effect of pH, potassium sorbate, ascorbic acid and packaging material. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 196 – 201, 2009.
- GLIEMMO, M. F.; LATORRE, M. E.; NARVAIZ, P.; CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N. Effect of gamma irradiation and storage time on microbial growth and physicochemical characteristics of pumpkin (*Cucurbita Moschata* Duchesne ex Poiret) puree. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 1, p. 71 – 80, 2014.
- GOFF, H. D.; HILL, A. R. Chemistry and physics. In: Hui YH (ed) Dairy science and Technology Handbook. VHC Publisher, New York, p. 1 – 82, 1993.

GÓNGORA-NIETO, M. M.; PEDROW, P. D.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Use of circuit analysis simulations in pulsed electric fields food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 3, p. 413-420, 2004.

GONZÁLEZ, E.; MONTENEGRO, M. A.; NAZARENO, M. A. Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 4, p. 395 – 399, 2001.

GRANADO, F., OLMEDILLA, B. B. I.; BLANCO, I.; ROJAS-RIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2135 – 2140, 1992.

GRAVES, D. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. **Jorunal of Physic Application Physics**, p. 45, 2012.

GRZEGORZEWSKI, F.; SCHLÜTER, O.; EHLBECK, J.; WELTMANN, K. D.; GEYER, M.; KROH, L. W.; ROHN, S. Plasma-oxidative degradation of polyphenolics – influence of non-thermal gas discharges with respect to fresh produce processing. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. S35 – S39, 2009.

GRZEGORZEWSKI, F.; ROHN, S.; QUADE, A.; SCHRÖDER, K.; EHLBECK, J.; SCHLÜTER, O.; KROH, L. W. Reaction chemistry of 1,4-benzopyrone derivates in non-equilibrium low-temperature plasmas. **Plasma Processes Polymers** v. 7, n. 6, p. 466 – 473, 2010.

GRZEGORZEWSKI, F.; EHLBECK, J.; SCHLÜTER, O.; KROH, L. W.; ROHN, S. Treating lamb's lettuce with a cold plasma e influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2285 – 2289, 2011.

GUDERJAN, M.; TOEPFL, S.; ANGERSBACH, A.; KNORR, D. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of

plant oils. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 281 – 287, 2005.

GUNES, G.; BLUM, L. K.; HOTCHKISS, J. H. Inactivation of yeasts in grape juice using a continuous dense phase carbon dioxide processing system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2362 – 2368, 2005.

GUROL, C.; EKINCI, F. Y.; ASLAN, N.; KORACHI, M. Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 1 – 5, 2012.

GURTLER, J. B.; BAILEY, R. B.; GEVEKE, D. J.; ZHANG, H. Q. Pulsed electric field inactivation of *E. coli* O157:H7 and non-pathogenic surrogate *E. coli* in strawberry juice as influenced by sodium benzoate, potassium sorbate, and citric acid. **Food Control**, v. 22, n. 10, p. 1689 – 1694, 2011.

GUO, J.; HUANG, K.; WANG, J. Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: a review. **Food Control**, v. 50, p. 482 – 490, 2015.

HAAS, G. J.; PRESCOTT, H. E.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE, L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 253 – 265, 1989.

HATA, C.; KUMAGAI, H. & NAKAMURA, K. Rate analysis of the sterilization of microbial cells in high pressure. **Journal of Science Technology**, v. 2, n. 4, p. 229-233, 1996.

HAZRA, P.; MANDAL, A. K.; DUTTA, A. K.; RAM, H. H. Breeding pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir.) for fruit yield and other characters. **International Journal of Plant Breeding**, v. 1, n. 1, p. 51 – 64, 2007.

HEINZ, V.; PHILLIPS, S. T.; ZENKER, M.; KNORR, D. Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. **Food Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 155-168, 1999.

HEINZ, V.; ALVAREZ, I.; ANGERSBACH, A.; KNORR, D. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, n. 3 – 4, p. 103 – 111, 2002.

HEINZ, V.; TOEPFL, S.; KNORR, D. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 167 – 175, 2003.

HENSELOVÁ, M.; SLOVAKOVA, L.; MARTINKA, M.; ZAHORANOVA, A. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. **Biologia**, v. 67, n. 3, p. 490 – 497, 2012.

HERTWIG, C.; REINEKE, K.; EHLBECK, J.; ERDOGDU, B.; RAUH, C.; SCHLÜTER, O. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices. **Journal of Food Engineering**, v. 147, Part A, p. 12 – 17, 2015.

HODGINS, S.; MITTAL, G. S. High voltage pulsed electrical field for liquid food pasteurization. **Food Reviews International**, v. 16, n. 4, p. 395 – 434, 2000.

HODGINS, A. M.; MITTAL, G. S.; GRIFFITHS, M. W. Pasteurization of Fresh orange juice using low-energy pulsed electrical field. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2294 – 2299, 2002.

HONG, S. J.; PARK, W. S.; PYUN, Y. R. Inactivation of *Lactobacillus* sp. from Kimchi by high pressure carbon dioxide. **Lebensmittel – Wissenschaftund-Technologie**, v. 30, n. 7, p. 681 – 685, 1997.

HONG, S. I.; PYUN, Y. R. Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p. 728 – 733, 1999.

HOOVER, M. V. A. Process for producing dehydrated pumpkin flakes. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 3, p. 96 – 98, 1973.

HUANG, C.; YU, Q.; HSIEH, F.; DUAN, Y. Bacterial deactivation using a low temperature argon atmospheric plasma brush with oxygen addition. **Plasma Processes and Polymers**, v. 4, n. 1, p. 77 – 87, 2007.

HUANG, K.; WANG, J. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 227 – 239, 2009.

HÜLSHEGER, H.; POTEL, J.; NIEMANN, E. G. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 20, n. 1, p. 53 – 65, 1981.

IBGE, Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA (2008). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, acesso em: 10 – mai – 2016.

IKAWA, S.; KITANO, K.; HAMAGUCHI, S. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. **Plasma Processes Polymers**, v. 7, n. 1, p. 33 – 42, 2010.

JACOB, H. E.; FÖRSTER, W.; BERG, H. Microbiological implications of electric field effects. Inactivation of yeast cells and repair of their envelope. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, v. 21, n. 3, p. 225 – 233, 1981.

JACOBO-VALENZUELA, N.; MARÓSTICA-JUNIOR, M. R.; ZAZUETA-MORALES, J. J.; GALLEGOS-INFANTE, J. A. Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs Cehualca: A review. **Food Research International**, p. 2587 – 2593, 2011.

JAEGER, H.; MENESES, N.; MORITZ, J.; KNORR, D. Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 1, p. 109 – 118, 2010.

JAHID, I. K.; HAN, N.; HA, S. D. Inactivation kinetics of cold oxygen plasma depend on incubation conditions of *Aeromonas hydrophila* biofilm on lettuce. **Food Research International**, v. 55, p. 181 – 189, 2014.

JANOSITZ, A.; NOACK, A. K.; KNORR, D. Pulsed electric fields and their impact on the diffusion characteristics of potato slices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1939 – 1945, 2011.

JANSEN, A. Pioneering with pulsed electric field. **Holland Food Innovations**, v. 1, p. 6 – 9, 2015.

JAY, James M. Microbiologia de Alimentos. 6ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAYARAM, S.; CASTLE, G. S.; MAGARITIS, A. The effect of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 117 – 122, 1993.

JIAO, J.; LI, Z.; GAI, Q.; LI, X.; WEI, F.; FU, Y.; MA, W. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 147, n. 15, p. 17 – 24, 2014.

JIN, H.; ZHANG, Y.; JIANG, J.; ZHU, L.; CHEN, P.; LI, J.; YAO, H. Studies on the extraction of pumpkin components and their biological effects on blood glucose of diabetic mice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, n. 2, p. 184 – 189, 2013.

JIN, T. Z.; GUO, M.; ZHANG, H. Q. Upscaling from benchtop processing to industrial scale production: More factors to be considered for pulsed electric field food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 72 – 80, 2015.

JOANNES, C.; SIPAUT, C. S.; DAYOU, J.; YASIR, S. M. D.; MANSA, R. F. The potential of using pulsed electric field (PEF) technology as the cell disruption method to extract lipid from microalgae for biodiesel production. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 5, n. 2, p. 598 – 621, 2015.

JOSHI, S. P.; TOMA, R. B.; MEDORA, N.; O'CONNOR, K. Detection of aluminium residue in sauces packaged in aluminium pouches. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 383 – 386, 2003.

JOSHI, R. P.; KOLB, J. F.; XIAO, S.; SCHOENBACH, K. H. Aspects of plasma in water: streamer physics and applications. **Plasma Processes Polymers**, v. 6, n. 11, p. 763 – 777, 2009.

KAMGANG-YOUBI, G.; HENRY, J. M.; MEYLHEUC, T.; BRISSET, J. L.; BELLON-FONTAINE, M. N.; DOUBLA, A.; NAITALI, M. Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13 – 18, 2009.

KAMIHIRA, M.; TANIGUSHI, M; KOBAYASHI, T. Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. **Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry**, v. 2, n. 51, p. 407 – 412, 1987.

KANAZAWA, S.; KAWANO, H.; WATANABE, S.; FURUKI, T.; AKAMINE, S.; ICHIKI, R.; OHKUBO, T.; KOCIK, M.; MIZERACZYK, J. Observation of OH radicals produced by pulsed discharges on the surface of a liquid. **Plasma Sources Science and Technologies**, v. 20, n. 3, 2011.

KARAMAN, H.; ERKMEN, O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. **Food Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 11 – 16, 2001.

KAYES, M. M.; CRITZER, F. J.; KELLY-WINTENBERG, K.; ROTH, J. R.; MONTIE, T. C.; GOLDEN, D. A. Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4 n. 1, p. 50 – 59, 2007.

KEBEDE, B. T.; GRAUWET, T.; TABILO-MUNIZAGA, G.; PALMERS, S.; VERVOORT, L.; HENDRICKX, M. Headspace components that discriminate between thermal and high pressure high temperature treated green vegetables: Identification and linkage to possible process induced chemical changes. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1603 – 1613, 2013.



KEBEDE, B. T.; GRAUWET, T.; MUTSOKOTI, L.; PALMERS, S.; VERVOORT, L.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. Comparing the impact of high pressure high temperature and thermal sterilization on the volatile fingerprint of onion, potato, pumpkin and red beet. **Food Research International**, v. 56, p. 218 – 225, 2014a.

KEBEDE, B. T.; GRAUWET, T.; PALMERS, S.; VERVOORT, L.; CARLE, R.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. Effect of high pressure high temperature processing on the volatile fraction of differently coloured carrots. **Food Chemistry**, v. 153, n. 15, p. 340 – 352, 2014b.

KEMPKES, M.; REINHARDT, N.; ROTH, I. Enhancing Industrial Processes by Pulsed Electric Fields. Proceedings of the Bio and Food Electrotechnologies Conference. Salerno, Italy, 2012.

KHACHIK, F., GOLI, M., BEECHER, G. R., HOLDEN, J., LUSBY, W. R., TENORIO, M. D., BARRERA, M. R. Effect of food preparation on qualitative and constituents of tomatoes and several green vegetables. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 390 – 398, 1992.

KIM, S. R.; RHEE, M. S.; KIM, B. C.; KIM, K. H. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and generic *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 52 – 61, 2007.

KIM, B.; YUN, H.; JUNG, Y.; JUNG, H.; CHOE, W.; JO, C. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 9 – 13, 2011.

KIM, H. J.; YONG, H. I.; PARK, S.; CHOE, W.; JO, C. Effects of dielectric barrier discharge plasma on pathogen inactivation and the physicochemical and sensory characteristics of pork loin. **Current Applied Physics**, v. 13, n. 7, p. 1420 – 1425, 2013a.

KIM, H. J.; CHO, Y. I.; HWANG, I. H.; LEE, D. H.; CHO, D. J.; RABINOVICH, A.; FRIDMAN, A. Use of plasma gliding arc

- discharges on the inactivation of *E. coli* in water. **Separation and Purification Technologies**, v. 120, p. 423 – 428, 2013b.
- KIM, J. E.; LEE, D. U.; MIN, S. K. Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. **Food Microbiology**, v. 38, p. 128 – 136, 2014.
- KIM, J.; PULIGUNDLA, P.; MOK, C. Microbial decontamination of dried laver using corona discharge plasma jet (CDPJ). **Journal of Food Engineering**, v. 161, p. 24 -32, 2015.
- KLÄMPFL, T. G.; ISBARY, G.; SHIMIZU, T.; LI, Y. F.; ZIMMERMANN, J. L.; STOLZ, W. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Applied Environmental Microbiology*, v. 78, p. 5077 – 5082, 2012.
- KLOCKOW, P. A.; KEENER, K. M. Quality and safety assessment of packaged spinach treated with a novel atmospheric, non-equilibrium plasma system. ASABE meeting presentation, p. 1 – 10, 2008.
- KNOCKAERT, G.; LEMMENS, L.; BUGGENHOUT, S. V.; HENDRICKX, M. LOEY, A. N. Changes in  $\beta$ -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 60 – 67, 2012a.
- KNOCKAERT, G.; PULISSERY, S.; COLLE, I.; BUGGENHOUT, S. V.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Lycopene degradation, isomerization and *in vitro* bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1290 – 1297, 2012.
- KNORR, D.; GEULEN, M.; GRAHL, T.; SITZMANN, W. Food application of high electric field pulses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 5, p. 71 – 75, 1994.
- KNORR, D.; ANGERSBACH, A. Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 185 – 191, 1998.

KNORR, D.; ANGERSBACH, A.; ESHTIAGHI, M.; HEINZ, V.; LEE, D. U. Processing concepts based on high intensity electric field pulses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, n. 3 – 4, p. 129 – 135, 2001.

KOBAYASHI, F.; ODAKE, S. Quality evaluation of Unfiltered beer as affected by inactivated yeast using two-stage system of low pressure carbon dioxide microbubbles. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 8, p. 1690 – 1698, 2015.

KOLB, J. F.; JOSHI, R. P.; XIAO, S.; SCHOENBACH, K. H. Streamers in water and other dielectric liquids. **Journal of Physics Application Physical**, v. 41, n. 23, 2008.

KORACHI, M.; ASLAN, N. The effect of atmospheric pressure plasma corona discharge on pH, lipid content and DNA of bacterial cells. **Plasma Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 99, 2011.

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

KOTNIK, T.; PUCIHAR, G.; REBERSEK, M.; MIKLAVCIC, D.; MIR, L. M. Role of pulse shape in cell membrane electropermeabilization. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1614, n. 2, p. 193 – 200, 2003.

KREBBERS, B.; MATSER, A. M.; HOOGERWERF, S. W.; MOEZELAAR, R.; TOMASSEN, M. M. M.; VAN DEN BERG, R. W. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: Evaluation of microbial inactivation and quality parameters. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, n. 4, p. 377 – 385, 2003.

KRINSKY, N. I. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 443 – 447, 1998.

KUMAR, Y.; PATEL, K. K.; KUMAR, V. Pulsed electric field processing in Food Technology. **International Journal of Engineering Studies and Technical Approach** v. 1, p. 6 – 17, 2015.

LABHUT Education Center. Disponível em:  
<http://www.labhut.com/education-centre/headspace-gas-chromatography/basic-principles-of-headspace-analysis.html>, Acesso em 20-jun-2013.

LACKMANN, J.; BANDOW, J. E. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, n. 14, p. 6205 – 6213, 2014.

LACOMBE, A.; NIEMIRA, B. A.; GURTLER, J. B.; FAN, X.; SITES, J.; BOYD, G.; CHEN, H. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. **Food Microbiology**, v. 46, p. 479 – 484, 2015.

LADO, B. H.; YOUSEF, E. Y. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2223 – 2229, 2003.

LAROUSSE, M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. **IEEE Transactions on Plasma Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1188 – 1191, 1996.

LAROUSSE, M.; LEOPOLD, F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 283, n. 1 – 3, p. 83 – 88, 2004.

LAU, W. L.; REIZES, J.; TIMCHENKO, V.; KARA, S.; KORNFELD, B. Heat and mass transfer model to predict the operational performance of a steam sterilisation autoclave including products. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 90, p. 800 – 811, 2015.

LEADLEY, C.; TUCKER, G.; FRYER, P. A comparative study of high pressure sterilization and conventional thermal sterilization: Quality effects in green beans. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 70 – 79, 2008.

- LEBOVKA, N. I.; PRAPORSCIC, I.; VOROBIEV, E. Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 5, n. 1, p. 9 – 16, 2004.
- LEE, H. J.; JUNG, S.; JUNG, H.; PARK, S.; CHOE, W.; HAM, J. S.; JO, C. Evaluation of a dielectric barrier discharge plasma system for inactivating pathogens on cheese slices. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 191 – 198, 2012.
- LEE, K.; PAEK, K. H.; JU, W. T.; LEE, Y. Sterilisation of bacteria, yeast and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. **Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 269 – 275, 2006.
- LESPINARD, A. R.; ARBALLO, J. R.; TAUS, F. J.; MASCHERONI, R. H. Multi-objective optimization of the pasteurization process of pumpkin cubes packaged in glass jars. **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 5, p. 679 – 689, 2015.
- LESSIN, W., J., CATIGANI, G., L., SCHWARTZ, S., J. Quantification of *cis-trans* isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3728 – 3732, 1997.
- LEWIS, T. J. Breackdown initiating mechanisms at electrode interfaces in liquids. **IEEE Trans Dielectrical Electrons Insulate**, v. 10, n. 6, p. 948 – 955, 2008.
- LI, H.; ZHAO, L.; WU, J.; ZHANG, Y.; LIAO, X. Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 139 – 145, 2012.
- LI, S. Q.; ZHANG, Q. H.; TONY, Z. J.; TUREK, E. J.; LAU, M. H. Elimination of *Lactobacillus plantarum* and achievement of shelf stable model salad dressing by pilot scale pulsed electric fields combined with mild heat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 2, p. 125 – 133, 2005

- LI, X.; FARID, M. A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. **Journal of Food Engineering**, v. 182, p. 33 – 45, 2016.
- LIAO, H.; HU, X.; LIAO, X.; CHEN, F.; WU, J. Inactivation of *Escherichia coli* inoculated into cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 126 – 131, 2007.
- LIDEBJER, C.; LEANDERSON, P.; ERNERUDH, J.; JONASSON, L. Low plasma levels of oxygenated carotenoids in patients with coronary artery disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 6, p. 448 – 456, 2007.
- LIN, H.; YANG, Z.; CHEN, L. F. An improved method for disruption of microbial cells with pressurized carbon dioxide. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 2, p. 165 – 166, 1992a.
- LIN, H.; YANG, Z.; CHEN, L. F. Inactivation of *saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 2, p. 165 – 166, 1992b.
- LIN, H.; YANG, Z.; CHEN, L. F. Inactivation of leuconostoc pressure with carbon dioxide under. **The Chemical Engineering Journal**, v. 52, n. 1, p. B29 – B34, 1993.
- LIN, H.; CAO, N.; CHEN, L. F. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 657-659, 1994.
- LIN, C. H.; CHEN, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during processing. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 3 - 4, p. 274–280, 2005a.
- LIN, C. H.; CHEN, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 837 – 846, 2005b.
- LIU, F.; SUN, P.; BAI, N.; TIAN, Y.; ZHOU, H.; WEI, S.; ZHOU, Y.; ZHANG, J.; ZHU, W.; BECKER, K.; FANG, J. Inactivation of bacteria in an aqueous environment by a direct-current, cold-atmospheric

pressure air plasma microjet. **Plasma Processes and Polymers**, v. 7, n. 3 – 4, p. 231 – 236, 2010.

LIU, Y.; HU, X.; ZHAO, X.; SONG, H. Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 112 – 199, 2012.

LOCKE, B. R.; SATO, M.; SUNKA, P.; HOFFMANN, M. R.; CHANG, J. S. Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 3, p. 882 – 905, 2006.

LU, P.; MA, D.; CHEN, Y.; GUO, Y.; CHEN, G. Q.; DENG, H.; SHI, Y. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. **Cell Resistance**, v. 23, p. 635 – 644, 2013.

LUCIA, C. M. D., CAMPOS, F. M., MATA, G. M. S. C. & SANTANA, H. M. P. Controle de perdas de carotenoides em hortaliças preparadas em unidades de alimentação e nutrição hospitalar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n.5, p. 1627-1636, 2008.

MA, R.; WANG, G.; TIAN, Y.; WANG, K.; ZHANG, J.; FANG, J. Non-thermal plasma activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 643 – 651, 2015.

MAÁ CZ, G. L & VÁ GÁS, E. A new method for staining of cellulose and lignified cells-walls. **Mikroskopie**, v. 16, p. 40 – 43, 1961.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: a preliminary investigation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 1, p. 103 – 113, 2002.

MANAS P.; BARSOTTI, L.; CHEFTEL, J. C. Microbial Inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters and food constituents. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 2, n. 4, p. 239 – 249, 2001.

- MAÑAS, P.; PAGÁN, R. A review: Microbial Inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1387 – 1399, 2005.
- MARAN, J. P.; MEKALA, V.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 2018 – 2026, 2013.
- MARTENDAL, E.; SILVEIRA, C. D. S.; NARDINI, G. S.; CARASEK, E. Use of different sample temperatures in a single extraction procedure for the screening of the aroma profile of plant matrices by headspace solid-phase microextraction. **Journal Chromatography A**, v. 1218, n. 24, p. 3731 – 3736, 2011.
- MARTÍN-BELLOSO, O.; VEGA-MERCADO, H.; QIN, B. L.; CHANG, F. J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 21, n. 3, p. 193 – 203, 1997.
- MARTY, C.; BERSIT, C. Degradation products of *trans*  $\beta$ -carotene produced during extrusion cooking. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 6, p. 1880 – 1886, 1988.
- MARX, M.; STUPARIC, M.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of  $\beta$ -carotene in carrot juices and carotene containing preparations. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 609 – 617, 2003.
- MASKAN, M. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. **Journal of Food Engineering**, v. 48, n. 2, p. 169 – 175, 2001.
- MESÍAS, M.; WAGNER, M.; GEORGE, S.; MORALES, F. J. Impact of conventional sterilization and ohmic heating on the amino acid profile in vegetable baby foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 24 – 28, 2016.
- MIKROPOULOS, P. N.; STASSINOPOULOS, C. A.; SARIGIANNIDOU, B. C. Positive streamer propagation and



breakdown in air: the influence of humidity. **IEEE Transactions on Dielectrics Electrical Insulation**, v. 15, n. 2, p. 416 – 425, 2008.

MISRA, N. N.; TIWARI, B. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; CULLEN, P. J. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 3 – 4, p. 159 – 170, 2011.

MISRA, N. N.; KEENER, K. M.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 177 – 182, 2014a.

MISRA, N. N.; PATIL, S.; MOISEEV, T.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; KEENER, K. M.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 131 – 138, 2014b.

MISRA, N. N.; KAUR, S.; TIWARI, B. K.; KAUR, A.; SINGH, N.; CULLEN, P. J. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 115 – 121, 2015.

MITTAL, G. S.; GRIFFITHS, M. W. Pulsed electric field processing of liquid foods and beverages. **In Emerging technologies for food processing**, ed. D. W. Sun, Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, p. 99 – 139, 2005.

MOHAN, N.; UNDELAND, T. N.; ROBBINS, W. P. Power electronics; converters and Design. New York, Wiley, 1995.

MOK, C.; LEE, T.; PULIGUNDLA, P. Afterglow corona discharge air plasma (ACDAP) for inactivation of common food-borne pathogens. **Food Research International**, v. 69, p. 418 – 423, 2015.

MONTENEGRO, J.; RUAN, R.; MA, H.; CHEN, P. Inactivation of *E. coli* O157:H7 using a pulsed nonthermal plasma system. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 646 – 648, 2002.

MOODY, A.; MARX, G.; SWANSON, B. G.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic

pressure, pulsed electric fields and ultrasound. **Food Control**, v. 37, p. 305 – 314, 2014.

MORREN, J.; ROODENBURG, B.; DE HAAN, S. W. H. Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 3, p. 285 – 295, 2003.

MOSQUEDA-MELGAR, J.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 192 – 200, 2007.

MUKHOPADHYAY, S.; RAMASWAMY, R. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 666 – 677, 2012.

MURKOVIC, M.; MÜLLEDER, U.; NEUNTEUFL, H. Carotenoid content in different varieties of pumpkins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 633 – 638, 2002.

NACMF. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture. Disponível em: . Acesso em: 17-fev-2013.

NAGATSU, M.; TERASHITA, F.; NONAKA, H.; XU, L.; NAGATA, T.; KOIDE, Y. Effects of oxygen radicals in low-pressure surface-wave plasma on sterilization. **Application Physical Letters**, v. 86, n. 21, 2005.

NAJAFPOUR, G. D. Biochemical Engineering and Biotechnology, Elsevier, Oxford. p. 342 – 350, 2007.

NASCIMENTO, P. Avaliação da retenção de carotenoides de abóbora, mandioca e batata doce. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual Paulista (UNESP). São José do Rio Preto, 67 p., 2006.

NAWIRSKA-OLSZANSKA, A.; BIESIADA, A.; SOKOL-LETOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z. Characteristics of organic acids in the fruit of different pumpkin species. **Food Chemistry**, v. 148, p. 415 – 419, 2014.

NI, W.; JI, L.; NIU, J.; FAN, H.; SONG, Y.; ZHANG, Q. Plasma inactivation of *Escherichia coli* cells by atmospheric pressure air brush-shape plasma. **Surface & Coatings Technology**, v. 234, p. 120 – 125, 2013.

NIEMIRA, B. A.; SITES, J. Cold plasma inactivates *Salmonella Stanley* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on golden delicious apples. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1357 – 1365, 2008.

NORIEGA, E.; SHAMA, G.; LACA, A.; DÍAZ, M.; KONG, M. G. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1293 – 1300, 2011.

NORTON, T.; SUN, D. W. Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 2 – 34, 2008.

OH, Y. A.; ROH, S. H.; MIN, S. C. Cold plasma treatments for improvement of the applicability of defatted soybean meal-based edible film in food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 150 – 159, 2016.

OHKAWA, H.; AKITSU, T.; TSUJI, M.; KIMURA, H.; KOGOMA, M.; FUKUSHIMA, K.; Pulse modulate, high-frequency plasma sterilization at atmospheric-pressure. **Surface and Coatings Technology**, v. 200, n. 20 – 21, p. 5829 – 5835, 2006.

OLIVEIRA, A. M. de; PEREIRA, N. R.; MARSAIOLI JR., A.; AUGUSTO, F. Studies on the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal Chromatography A.**, v. 1025, n. 1, p. 115 – 124, 2004.

ORTUÑO, C.; MARTÍNEZ-PASTOR, M. T.; MULET, A.; BENEDITO, J. Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 8 – 15, 2012.

- ORTUÑO, C.; DUONG, T.; BALABAN, M.; BENEDITO, J. Combined high hydrostatic pressure and carbon dioxide inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase and peroxidase in feijoa puree. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 82, p. 56 – 62, 2013.
- OTTO, C.; ZAHN, S.; ROST, F.; ZAHN, P.; JAROS, D.; ROHM, H. Physical methods for cleaning and disinfection of surfaces. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 3, p. 171 – 188, 2011.
- PAL, P.; KAUR, P.; SINGH, N.; KAUR, A.; MISRA, N. N.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; VIRDI, A. S. Effect of nonthermal plasma on physico-chemical, amino acid composition, pasting and protein characteristics of short and long grain rice flour. **Food Research International**, v. 81, p. 50 – 57, 2016.
- PALMERS, S.; GRAUWET, T.; CELUS, M.; KEBEDE, B. T.; HENDRICKX, M. E.; LOEY, A. V. Furan formation as a function of pressure, temperature and time conditions in spinach purée. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 565 – 570, 2015.
- PALGAN, I.; CAMINITI, I. M.; MUÑOZ, A.; NOCI, F.; WHYTE, P.; MORGAN, D. J.; CRONIN, D. A.; LYING, J. G. Combined effect of selected non-thermal technologies on *Escherichia coli* and *Pichia fermentans* inactivation in an apple and cranberry juice blend and on product shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 1 – 6, 2011.
- PARK, S. J.; LEE, J. L.; PARK, J. Effects of a combined process of high pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1827 – 1834, 2002.
- PASQUALI, F.; STRATAKOS, A. C.; KOIDIS, A.; BERARDINELLI, A.; CEVOLI, C.; RAGNI, L.; MACUSI, R.; MANFREDA, G.; TREVISANI, M. Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). **Food Control**, v. 60, p. 552 – 559, 2016.
- PATARO, G.; FERRENTINO, G.; RICCIARDI, C.; FERRARI, G. Pulsed electric fields assisted microbial inactivation of *s. cerevisiae* cells

by high pressure carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 120 – 128, 2010.

PATRAS, A.; BRUNTON, N.; DA PIEVE, S.; BUTLER, F.; DOWNEY, G. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 16 – 22, 2009.

PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, Toronto, Canadá, 1997.

PEKÁREK, S. DC corona discharge ozone production enhanced by magnetic field. **European Physical Journal**, v. 56, n. 1, p. 91 – 98, 2010.

PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International**, v. 43, p. 1936 – 1943, 2010.

PERNI, S.; LIU, D. W.; SHAMA, G.; KONG, M. G. Cold atmospheric plasma decontamination of the pericarps of fruit. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 2, p. 302 – 308, 2008.

PETTIT, B.; RITZ, M.; FEDERIGHI, M. Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments: revue bibliographique. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 53, p. 547 – 556, 2002.

PEYROUS, R.; PIGNOLET, P.; HELD, B. Kinetic simulation of gaseous species created by an electrical discharge in dry or humid oxygen. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 22, n. 11, 1989.

PILLAI, S. D.; JERUDHASAN, P. R. *Quroum sensing*: how bacteria communicate. **Food Technology**, v. 60, n. 4, p. 42 – 50, 2006.

PIRES, W. M.; VIDAL, V. M.; SCHWERZ, T.; PINA, O. C. F.; DUARTE, R. P.; TEIXEIRA, M. B. Efeito de doses de nitrogênio em características vegetativas e reprodutivas de abóbora menina brasileira (*Cucurbita moschata duch.*) no município de Rio Verde – GO. I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde do IFG.

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. Rio Verde/GO. Nov-2012.

PLAZA, L.; SANCHEZ-MORENO, C.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. Carotenoid content and antioxidant capacity of Mediterranean vegetable soup (gaspacho) treated by high-pressure/temperature during refrigerated storage. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 210 – 215, 2006.

POTTER, K. M.; TUNG, M. A.; KITSON, J. A. Quality of Processed Peach Slices Stored in Flexible Pouches. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**. v. 15, n. 2, p. 96-100, 1982.

PRIETO-CALVO, M. A.; LÓPEZ, M.; PRIETO, M.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. Variability in resistance to Cold Atmospheric Plasma (CAP) and Ultraviolet light (UV) and multiple stress resistance analysis of pathogenic verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Food Research International**, v. 79, p. 88 – 94, 2016.

PROVESI, J. G. Estabilidade e efeitos do processamento e estocagem sobre os carotenoides em purês de abóbora. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 125 p., 2010.

PROVESI, J. G.; DIAS, C. O.; AMANTE, E. R. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 195 – 202, 2011.

PROVESI, J. G.; DIAS, C. O.; AMBONI, R. D. M. C.; AMANTE, E. R. Characterisation and stability of quality indices on storage of pumpkin (*Cucurbita moschata* and *Cucurbita maxima*) purees. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 1, p. 67 – 74, 2012.

PTITCHKINA, N. M.; NOVOKRESCHONOVA, L. V.; PISKUNOVA, G. V.; MORRIS, E. R. Large enhancements in loaf volume and organoleptic acceptability of wheat bread by small additions of pumpkin powder: possible role of acetylated pectin in stabilizing gas-cell structure. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 333 – 337, 1998.

PUC, M.; COROVIC, S.; FLISAR, K.; PETKOVSEK, M.; NASTRAN, J.; MIKLAVCIC, D. Techniques of signal generation for

electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices.

**Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 2, p. 113 – 124, 2004.

QIU, W.; JIANG, H.; WANG, H.; GAO, Y. Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 516 – 523, 2006.

RAGNI, L.; BERARDINELLI, A.; VANNINI, L.; MONTANARI, C.; SIRRI, F.; GUERZONI, M. E.; GUARNIERI, A. Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 1, p. 125 – 132, 2010.

RAIZER, Y. P.; ALLEN, J. E. Gas discharge physics, vol. 1, Springer, Berlin, 1991.

RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F.; TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI, G.; ROCCULI, P. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biology and Technologic**, v. 107, p. 55 – 65, 2015.

RAMOS, A. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P.; GOMES, J. C. Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 425 – 438, 2006.

RAMOS, R.R.S., QUEIROZ, A.M. de, CASALI, D.W.V.; CRUZ, D.C. Recursos genéticos de *Cucurbita moschata*: caracterização morfológica de populações locais coletadas no Nordeste brasileiro. In: Queiroz, A.M. de, Goedert, C.O., Ramos, R.R.S. (Org.) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro (on line). Petrolina: Embrapa, 1999. Disponível em: [http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/index.php?op=public\\_eletronica&mn=5](http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/index.php?op=public_eletronica&mn=5). Acesso em: jun-2013.

RASO, J.; CALDERÓN, M. L.; GÓNGORA, M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulse electric fields. **Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie**, v. 31, p. 668 – 672, 1998.

RATTAN, N. S.; RAMASWAMY, H. S. Quality optimization of canned potatoes during rotary autoclaving. **Journal of Food Quality**, v. 37, n. 3, p. 168 – 176, 2014.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. **The properties of gases and liquids**. 4<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Book Company, 1988.

REITLER, W. Conductive heating of foods. Technical University of Munich, Munich, Germany, 1990.

RØD, S. K.; HANSEN, F.; LEIPOLD, F.; KNØCHEL, S. Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 233 – 238, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin american food sources of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 49, n. 3, p. 74S-84S, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: International Life Sciences Institute (ILSI). 63 p., 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Food carotenoids: analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. *Forum Nutrition*, n. 56, p. 35 – 37, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Enhancing the carotenoid levels of foods through agricultura and food technology. Internet Paper for Food. Nutrition and Health, Food Africa, Internet Forum 31., 2008a.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 99 p. 2008b.

SALE, A. J.; HAMILTON, W. A. Effect of high electric fields on microorganism III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 163, n. 1, p. 37 – 43, 1967.



SALGADO, J. M.; TAKASHIMA, M. K. Chemical and biological characterization of meal and protein isolates from pumpkin seed (*Cucurbita moschata*). **Archivos Latinoamericanos de Nutritión**, v. 4, p. 443-50, 1992.

SANCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; DE ANCOS, B., PLAZA, L.; OLMEDILLA, B.; GRANADO, F. Consumption of high-pressurized vegetable soup increases plasma vitamin C and decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in healthy humans. **Journal of Nutritión**, v. 134, n. 11, p. 3021 – 3025, 2004.

SANCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; ELEZ-MARTINEZ, P.; DE ANCOS, B.; MARTIN-BELLOSO, O.; CANO, M. P. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4403 – 4409, 2005.

SANDLER, S. I. **Chemical and engineering thermodynamics**. 2<sup>a</sup> ed. [S.1]: John Wiley & Sons Ltda. 622 p., 1989.

SASAKI, F. F.; AGUILA, J. S.; GALLO, C. R.; ORTEGA, E. M. M.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Alterações fisiológicas, qualitativas e microbiológicas durante o armazenamento de abóbora minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 170 – 174, 2006.

SATOH, K.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G.; WOOLSEY, G. A.; FOURACRE, R. A. Pulsed-plasma disinfection of water containing *Escherichia coli*. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 46, part 1, p. 1137 – 1141, 2007.

SCHERTZE, J. W.; BOULETTE, M. L.; WHITELEY, M. More than a signal: nonsignaling properties of quorum sensing molecules. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 189 – 195, 2009.

SCHILLING, S.; ALBER, T.; TOEPFL, S.; NEIDHART, S.; KNORR, D.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 127 – 134, 2007.

SCHIEBER, A.; CARLE, R. Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: technological, analytical and nutritional implications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, p. 416 – 422, 2005.

SCHNABEL, U.; NIQUET, R.; KROHMANN, U.; WINTER, J.; SCHLÜTER, O.; WELTMANN, K. D.; EHLBECK, J. Decontamination of microbiologically contaminated specimen by direct and indirect plasma treatment. **Plasma Processes Polymers**, v. 9, n. 6, p. 569 – 575, 2012.

SCHRAM, D. C. Plasma processing and chemistry. **Pure Application Chemical**, v. 74, n. 3, p. 369 – 380, 2002.

SCHUTEN, H.; GULFO-VAN BEUSEKOM, K.; POL, I.; MASTWIJK, H.; BARTELS, P. Enzymatic stability of PEF processed orange juice. Safe consortium seminar: Novel Preservation technologies In relation to food safety, Brussels, Belgium, 2004.

SEE, E. F.; WAN NADIAH, W. A.; NOOR AZIAH, A. A. Physico-chemical and sensory evaluation of breads supplemented with pumpkin flour. **ASEAN Food Journal**, v. 14, p. 123 – 130, 2007.

SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 1232 p., 2012.

SEN, Y.; MUTLU, M. Sterilization of Food Contacting surface via non-thermal plasma treatment: a model study with *Escherichia-coli*-contaminated stainless steel and polyethylene surfaces. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3295 – 3304, 2013.

SEO, J. S.; BURRI, B. J.; QUAN, Z. J.; NEIDLINGER, T. R. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1 – 2, p. 371 – 375, 2005.

SERVILI, M., SELVAGGINI, R., TATICHI, M., BEGLIOMINI, A. L., MONTEDORO, G., Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice:

optimization of the blanching parameters. **Food Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 407 – 415, 2000.

SEVENICH, R.; BARK, F.; KLEINSTUECK, E.; CREWS, C.; PYE, C.; HRADECKY, J.; REINEKE, K.; LAVILLA, M.; MARTINEZ-DE-MARANON, I.; BRIAND, J. C.; KNORR, D. The impact of high pressure thermal sterilization on the microbiological stability and formation of food processing contaminants in selected fish systems and baby food puree at pilot scale. **Food Control**, v. 50, p. 539 – 547, 2015.

SHAKILA BANU, M.; SASIKALA, P.; DHANAPAL, A.; KAVITHA, V.; YAZHINI, G.; RAJAMANI, L. Cold plasma as a novel food processing technology. **International Journal of Emerging trends in Engineering and Development**, v. 4, n. 2, p. 803 – 818, 2012.

SHAMSI, K.; SHERKAT, F. Application of pulsed electric field in non-thermal processing of milk. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 2, n. 3, p. 216 – 244, 2009.

SHARMA, A.; COLLINS, G.; PRUDEN, A. Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1440 – 1449, 2009.

SHI, J.; YI, C.; YE, X.; XUE, S.; JIANG, Y.; MA, Y.; LIU, D. Effects of supercritical CO<sub>2</sub> fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 39 – 44, 2010.

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

SHIBESHI, K.; FARID, M. M. Scale-up unit of a unique moderately high pressure unit to enhance microbial inactivation. **Journal of Food Engineering**, v.105, n. 3, p. 522 – 529, 2011.

SHIMIZU, T.; STEFFES, B.; POMPL, R.; JAMITZKY, F.; BUNK, W.; RAMRATH, K. Characterization of microwave plasma torch for decontamination. **Plasma Process and Polymers**, v. 5, n. 6, p. 577 – 582, 2008.

SHIMODA, M.; COCUNUBO-CASTELLANOS, J.; KAGO, H.; MIYAKE, M.; OSAJIMA, Y. & HAYAKAWA, I. The influence of dissolved co2 concentration on the death kinetics of *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 306 – 311, 2001.

SIEGMUND, B.; MURKOVIC, M. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (part 2: volatile compounds). **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 367 – 374, 2004.

SIGMA-ALDRICH Co. LLC, Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html>. Acesso em jun-2013.

SILVA, C. L. M.; OLIVEIRA, F. A. R.; HENDRICKX, M. Modelling optimum processing conditions for the sterilization of prepackaged foods. **Food Control**, v. 4, n. 2, p. 67 – 78, 1993.

SILVA, A.V.C.; OLIVEIRA, D. S. N.; YAGUIU, P.; CAMELOSSI, M. A. G.; MUNIZ, E. M.; NARAIN, N. Temperature and packaging of minimally processed pumpkin (*Curcubita moschata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29(2), p. 391-394, 2009.

SILVA, J. M.; RIGO, A. A.; DALMOLIN, I. A.; DEBIEN, I.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. Effect of pressure, depressurization rate and pressure cycling on the inactivation of *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. **Food Control**, v. 29, p. 76 – 81, 2013.

- SIMPSON, R. Engineering aspects of thermal food processing. Contemporary Food Engineering Series. CRC Press, 513 p., 2009.
- SIMPSON, R.; ALMONACID, S.; MITCHELL, M. Mathematical model development, experimental validation and process optimization: retortable pouches packed with seafood in cone frustum shape. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 2, p. 153 – 162, 2004.
- SINGH, A.; SINGH, A. P.; RAMASWAMY, H. S. Effect of processing conditions on quality of green beans subjected to reciprocating agitation thermal processing. **Food Research International**, v. 78, p. 424 – 432, 2015a.
- SINGH, A.; SINGH, A. P.; RAMASWAMY, H. S. Computational techniques used in heat transfer studies on canned liquid-particulate mixtures. **Trends in Food Science & Technology**, v. 43, n. 1, p. 83 – 103, 2015b.
- SITZMANN, W.; MÜNCH, E. W. Das ELCRACK Verfahren: Ein neues Verfahren zur Verarbeitung tierischer Rohstoffe. **Die Fleischmehlindustrie**, v. 40, p. 22 – 28, 1988.
- SOARES, D.; LERIN, L. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M. A. Inactivation of *Listeria monocytogenes* using supercritical carbon dioxide in a high-pressure variable-volume reactor. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 514 – 518, 2013.
- SOJAK, M.; GLOWACKI, S. Analysis of giant pumpkin (*Cucurbita maxima*) drying kinetics in various technologies of convective drying. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 3, p. 323 – 329, 2010.
- SOLIVA-FORTUNY, R.; BALASA, A.; KNORR, D.; MARTÍN-BELOSO, O. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. **Trends in Food Science & Technology** v. 20, n. 11 – 12, p. 544 – 556, 2009.
- SOLOSHENKO, I. A.; TSIOLKO, V. V.; POGULAY, S. S.; KALYUZHNEYA, A. G.; BAZHENOV, V. Y.; SHCHEDRIN, A. I. Effect of water adding on kinetics of barrier discharge in air. **Plasma Sources Science Technologies**, v. 18, n. 4, 2009.

SONG, H. P.; KIM, B.; CHOE, J. H.; JUNG, S.; MOON, S. Y.; CHOE, W. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 432 – 436, 2013.

SONG, A. Y.; OH, Y. J.; KIM, J. E.; SONG, K. B.; OH, D. H.; MIN, S. C. Cold plasma treatment for microbial safety and preservation of fresh lettuce. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1717 – 1724, 2015.

SOUZA GALVÃO, M.; NARAIN, N.; SANTOS, M. S. P.; NUNES, M. L. Volatile compounds and descriptive odor attributes in umbu (*Spondias tuberosa*) fruits during maturation. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1919 – 1926, 2011.

SPEEK, A. J.; SPEEK-SAICHUA, S.; SCHREURS, W. H. P. Total carotenoid and beta carotene contents of Thai vegetables and the effect of processing. **Food Chemistry**, v. 27, p. 245 – 257, 1988.

SPILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A. Microbial inactivation by high-pressure. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 55 – 63, 2002.

SPILIMBERGO, S.; DEGHANI, F.; BERTUCCO, A.; FOSTER, N. Inactivation of bacteria spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 1, p. 118 – 125, 2003.

SPILIMBERGO S.; BERTUCCO, A. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 627 – 638, 2013.

STANLEI, D. W. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. F. M. Clydesdale. New York, CRC Press, v. 30, n. 5, p. 487 – 553, 1991.

STAPULIONIS, R. Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 48, n. 1, p. 249 – 254, 1999.

STOFFELS, E.; GONZALVO, Y. A.; WHITMORE, T. D.; SEYMOUR, D. L.; REES, J. A. A plasma needle generates nitric oxide. **Plasma Sources Science and Technologies**, v. 15, n. 3, 501 p., 2006.

STOICA, M.; ALEXE, P.; MIHALCEA, L. Atmospheric cold plasma as new strategy for foods processing – an overview. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 15, p. 1 – 8, 2014.

STUMBO, C. R. Thermobacteriology in Food Processing. Academic press inc. 2<sup>a</sup> ed. New York, p. 51 – 55, 1968.

STRATAKOS, A. C.; DELGADO-PANDO, G.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; KOIDIS, A. Industrial scale microwave processing of tomato juice using a novel continuous microwave system. **Food Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 622 – 628, 2016.

SULTANA, B., ANWAR, F. & IWBAL, S. Effect of diferent cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal Food Science. Technology**, v. 43, n. 3, p. 560 – 567, 2006.

SUPELCO Inc.; Chromatographic Products (catálogo); Supelco, Bellefonte, PA, p. 373, 1996.

SUNKA, P. Pulse electrical discharges in water and their applications. **Physical Plasmas**, 8, 2001.

SUROWSKY, B.; FISCHER, A.; SCHLÜETER, O.; KNORR, D. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. **Innovative of Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 146 – 152, 2013.

SUROWSKY, B.; FRÖHLING, A.; GOTTSCHALK, N.; SCHLÜETER, O.; KNORR, D. Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: inactivation kinetics and mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 63 – 71, 2014.

SUROWSKY, B.; SCHLÜETER, O.; KNORR, D. Interactions of non-thermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 2, p. 82 – 108, 2015.

- SWIFT, S.; DOWNIE, J. A.; WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SALMOND, G. P. C.; WILLIAMS, P. *Quorum sensing* as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. **Advances in Microbial Physiology**, v. 45, p. 199 – 270, 2001.
- TANG, Y.; NING, H.; LIU, H.; YAN, H. Exploitation and composition of pumpkin-powder. **Food Science and Technology**, v. 6, p. 299 – 301, 2006.
- TANG, Y. Z.; LU, X. P.; LAROUSSE, M.; DOBBS, F. C. Sublethal and killing effects of atmospheric-pressure, nonthermal plasma on eukaryotic microalgae in aqueous media. **Plasma Process and Polymers**, v. 5, n. 6, p. 552 – 558, 2008.
- TAPPI, S.; BERARDINELLI, A.; RAGNI, L.; DALLA ROSA, M.; GUARNIERI, A.; ROCCULI, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 21, p. 114 – 122, 2013.
- TAPPI, S.; GOZZI, G.; VANNINI, L.; BERARDINELLI, A.; ROMANI, S.; RAGNI, L.; ROCCULI, P. Cold plasma treatment for fresh-cut melon stabilization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 225 – 233, 2016.
- TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 98 – 105, 2006.
- TEIXEIRA, A. A. Thermal Processing for Food Sterilization and Preservation. Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery, Myer Kutz (ed.), William Andrew, Inc., University of Florida, Gainesville, FL, USA, p. 415 – 448, 2007.
- TEREFE, N. S.; TEPPER, P.; ULLMAN, A.; KNOERZER, K.; JULIANO, P. High pressure thermal processing of pears: Effect on endogenous enzyme activity and related quality attributes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 33, p. 56 – 66, 2016.
- TERRIER, O.; ESSERE, B.; YVER, M.; BARTHÉLÉMY, M.; BOUSCAMBERT-DUCHAMP, M.; KURTZ, P. Cold oxygen plasma



technology efficiency against different airborne respiratory viruses.

**Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 2, p. 199 – 124, 2009.

THAGARD, S. M.; TAKASHIMA, K. MIZUNO, A. Chemistry of the positive and negative electrical discharges formed in liquid water and above a gas-liquid surface. **Plasma Chemistry Plasma Process**, v. 29, n. 6, p. 455 – 473, 2009.

TIMMERMANS, R. A. H.; GROOT, M. N. N.; NEDERHOFF, A. L.; BOEKEL, M. A. J. S.; MATSER, A. M.; MASTWIJK, H. C. Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 105 – 111, 2014.

TIMOSHKIN, I. V.; MACLEAN, M.; WILSON, M. P.; GIVEN, M. J.; MACGREGOR, S. J.; WANG, T. Bactericidal effect of corona discharges in atmospheric air. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 40, n. 10, p. 2322 – 2333, 2012.

TOEPFL, S.; HEINZ, V.; KNORR, D. Optimization of Pulsed Electric Field application for liquid food decontamination. IFT Workshop on Nonthermal Food Preservation, Wageningen, Netherlands, 2004.

TOEPFL, S. Pulsed electric fields (PEF) for permeabilization of cell membranes in food and bioprocessing – Applications, process and equipment design and cost analysis. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2006.

TOEPFL, S.; HEINZ, V.; KNORR, D. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 6, p. 537 – 546, 2007.

TROY, D. J.; OJHA, K. S.; KERRY, J. P.; TIWARI, B. K. Sustainable and consumer-friendly emerging technologies for application within the meat industry: An overview. **Meat Science**, v. 120, p. 2 – 9, 2016.

TSUKAMOTO, J. Efeito esterilizante da aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem em suco de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 9, n. 1. Campina Grande, p. 45 – 52, 2007.

UHM, H. S.; HONG, Y. C.; SHIN, D. H. A microwave plasma torch and its applications. **Plasma Sources Science and Technologies**, v. 15, n. 2, p. 26 – 34, 2006.

UHM, H. S.; LIM, J.P.; LI, S. Z. Sterilization of bacterial endospores by an atmospheric-pressure argon plasma jet. **Applied Physics Letters**, v. 90, n. 26, 2007.

ULBIN-FIGLEWICZ, N.; BRYCHEY, E.; JARMOLUK, A. Effect of low-pressure cold plasma on surface microflora of meat and quality attributes. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 2, p. 1228 – 1232, 2015.

ULMER, H. M.; HEINZ, V.; GAENZLE, M. G.; KNORR, D.; VOGEL, R. F. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 326 – 335, 2002.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523 – 530, 2000.

VAN HET HOF, K. H., WEST, C. E., WEASTRATE, J. A., HAUTVAST, J. G. A. J. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**. v.130, n. 3, p. 503-506, 2000.

VAN LOEY, A.; VERACHTERT, B.; HENDRICKX, M. Effects of high electrical fields pulses on enzymes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, n. 3 – 4, p. 94 – 102, 2001.

VANNINI, L.; MONTANARI, C. L.; BERARDINELLI, A.; RAGNI, L.; SIRRI, F.; GUERZONI, M. E. Assessment of the efficacy of a low-temperature gas plasma prototype for superficial decontamination of table eggs. In World poultry science association, proceedings of the 19<sup>th</sup> European Symposium on quality of poultry meat, 13<sup>th</sup> European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Turku, Finland. World's Poultry Association (WPSA), p. 1 – 8, 2009.

VEGA-MERCADO, H.; POTHAKAMURY, U. R.; CHANG, F. J.; BARBOSA-CANOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric

fields hurdles. **Food Research International**, v. 29, n. 2, p. 117 – 121, 1996.

VILAS BOAS, B. M.; NUNES, E. E.; VILAS BOA, E. V. B.; XISTO, A. L. R. P. Influência do tipo de corte na qualidade de abobrinha menina brasileira minimamente processada. In: **Congresso Brasileiro de Olericultura**, 46. Resumos. Goiânia:ABH. 2006.

VLEUGELS, M.; SHAMA, G.; DENG, X. T.; GREENACRE, E.; BROCKLEHURST, T.; KONG, M. G. Atmospheric plasma inactivation of biofilm forming bacteria for food safety control. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 33, n. 2, p. 824 – 828, 2005.

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

WANG, Y.; YANG, C.; LI, S.; YANG, L.; WANG, Y.; ZHAO, J.; JIANG, Q. Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP–SPME with GC–MS. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 356 – 364, 2009.

WANG, X.; SUN, X.; LIU, H.; LI, M.; MA, Z. Barrier and mechanical properties of carrot puree films. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 2, p. 149 – 156, 2011.

WATTS, R. J.; BOTTENBERG, B. C.; HESS, T. F.; JENSEN, M. D.; TEEL, A. L. Role of reductants in the enhanced desorption and transformation of chloroaliphatic compounds by modified Fenton's reactions. **Environmental Science Technologies**, v. 33, n. 19, p. 3432 – 3437, 1999.

WELTMANN, K. D.; BRANDENBURG, R.; VON WOEDTKE, T.; EHLBECK, J.; FOEST, R.; STIEBER, M.; KINDEL, E. Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs). **Journal of Physical Application Physics**, v. 41, n. 19, 2008.

WILLIAMS, P. F. Plasma processing of semiconductors. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 336, 1997.

WILSON, D. R.; DABROWSKI, L.; STRINGER, S.; MOEZELAAR, R.; BROCKLEHURST, T. F. High pressure in combination with elevated temperature as a method for the sterilization of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 6, p. 289 – 299, 2008.

XIONG, Z.; DU, T.; LU, X.; CAO, Y.; PAN, Y. How deep can plasma penetrate into a biofilm? **Application of Physical Letters**, v. 98, n. 22, 2011.

XU, Z.; ZHANG, L.; WANG, Y.; BI, X.; BUCKOW, R.; LIAO, X. Effect of high pressure CO<sub>2</sub> treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of apple juice. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 577 – 584, 2011.

YANG, R. J.; LI, S. Q.; ZHANG, Q. H. Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 4, p. 241 – 248, 2004.

YONG, H. I.; KIM, H.; PARK, S.; KIM, K.; CHOE, W.; YOO, S. J.; JO, C. Pathogen inactivation and quality changes in sliced cheddar cheese treated using flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma. **Food Research International**, v. 69, p. 57 – 63, 2015.

YORDANOV, D. G.; ANGELOVA, G. V. High Pressure Processing for Foods Preserving. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 3, p. 1940 – 1945, 2010.

YOUSFI, M.; MERBAHI, N.; PATHAK, A.; EICHWALD, O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. **Fundamentals Clinical Pharmacological**, v. 28, n. 2, p. 123 – 135, 2014.

YUK, H.; GEVEKE, D. J.; ZHANG, H. Q. Efficacy of supercritical carbon dioxide for non-thermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple cider. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1 – 2, p. 91 – 99, 2010.

ZEPKA, L. Q.; MERCADANTE, A. Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. **Food Chemistry**, v.117, n. 1, p.28-34, 2009.

ZHANG, Q.; MONSALVE-GONZÁLEZ, A.; QIN, B. L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by square-wave and exponential-decay pulsed electric fields. **Journal of Food Process Engineering**, v. 17, n. 4, p. 469 – 478, 1994.

ZHANG, Q.; QIN, B. L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Inactivation of *Escherichia coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 19, n. 2, p. 103 – 118, 1995.

ZHANG, Y.; SHEN, X.; ZHU, L. The recent research development of natural hypoglycemic food-pumpkin. **Food Science and Technology**, v. 6, p. 68 – 70, 2002.

ZHANG, J.; DAVIS, T. A.; MATTHEWS, M. A.; DREWS, M. J.; LABERGE, M.; AN, Y. H. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 3, p. 354 – 372, 2006.

ZHONG K., HU, X.; ZHAO, G. FANG-CHEN, X. Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p 473 – 479, 2005.

ZHOU, L.; WANG, Y.; HU, X.; WU, J.; LIAO, X. Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 3, p. 321 – 327, 2009.

ZHOU, C.; LIU, W.; ZHAO, J.; YUAN, C.; SONG, Y.; CHEN, D.; NI, Y.; LI, Q. The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical-chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during refrigerated storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 21, p. 24 – 34, 2014.

ZHU, Z.; HE, J.; LIU, G.; BARBA, F. J.; KOUBAA, M.; DING, L.; BALS, O.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional

extraction technologies: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 1 – 9, 2016.

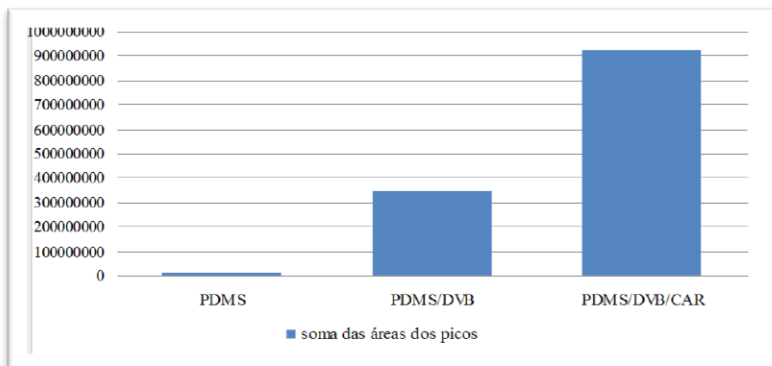
ZIMMERMANN, U.; PILWAT, G.; RIEMANN, F. Dielectric breakdown in cell membranes. **Biophysical Journal**, v. 14, p. 881 – 899, 1974.

ZIMMERMANN, U. The effect of high intensity electric field pulses on eucaryotic cell membranes: fundamentals and applications. Electromanipulation of cells. U. Zimmermann and G. A. Neil. Boca Raton, CRC Press: p. 1 – 106, 1996.

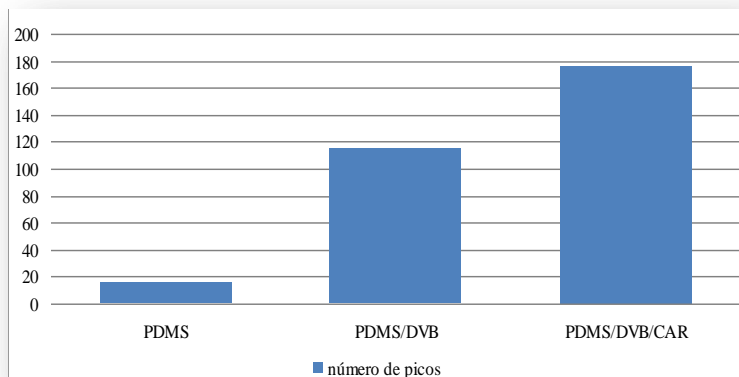
ZIUZINA, D.; PATIL, S.; CULLEN, P. J.; KEENER, K. M.; BOURKE, P. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. **Food Microbiology**, v. 42, p. 109 – 116, 2014.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Soma das áreas dos picos cromatográficos analisados no headspace da embalagem por SPME de purê de abóbora esterilizado (PE) utilizando as fibras PDMS, PDMS/DVB e PDMS/DVB/CAR.



**APÊNDICE B.** Número de picos cromatográficos analisados no headspace da embalagem por SPME de purê de abóbora esterilizado (PE) utilizando as fibras PDMS, PDMS/DVB e PDMS/DVB/CAR.



**APÊNDICE C.** Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de PNE de abóbora (*Cucurbita moschata*).

Nome	Intensidade absoluta do pico	%
<i>Álcoois</i>		1,25
4-metil-1-hexanol	96013	0,02
2-etil-1-pentanol	738423	0,15
2-etil-1-butanol	181446	0,04
<i>Aldeídos</i>		0,05
$\alpha$ -metilbutanal	159936	0,03
Pentanal	97096	0,02
<i>Alcenos</i>		27,59
Tolueno	38836968	7,69
1,3,5-cicloheptatrieno	23123393	4,58
2,4-dimetil-1-hepteno	58233467	11,53
1,3-ciclopentadieno	2447157	0,48
1-octeno	1640474	0,32
o-xylene	467338	0,09
<i>Cetonas</i>		1,25
2-pentanona	1107115	0,21
4-metil-2-heptanona	311166	0,06
4-(1,1-dimetil-etil)-ciclohexanona	3030671	0,06
<i>Ésteres</i>		0,18
Ácido oxálico	912510	0,18
<i>Terpenos</i>		0,63
$\alpha$ -pineno	1140741	0,22
2-careno	2060218	0,40



**APÊNDICE D.** Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de PE-10 de abóbora (*Cucurbita moschata*).

Nome	Intensidade absoluta do pico	%
<i>Álcoois</i>		7,12
4,8-dimetil-1-nonanol	2513413	1,50
Citronella	1923574	1,14
2-propil-heptanol	233829	0,14
1-octanol	122216	0,07
Isotridecanol	3142295	1,87
1-decanol	1794672	1,25
2-isopropil-5-metil-1-heptanol	1180488	1,01
<i>Aldeídos</i>		6,39
$\alpha$ -metilpropionaldeído	1615488	0,96
$\beta$ -metilbutanal	2230628	1,33
<i>Alcenos</i>		2,03
Tolueno	3144333	1,87
1,3-ciclopentadieno	261160	0,16
<i>Cetonas</i>		2,24
4,4-dimetil-2-pentanona	132247	0,08
1-(2,2-dimetilciclopentil)-etanona	468165	0,28
$\alpha$ -Ionona	927947	0,55
<i>Ésteres</i>		1,63
Ácido oxálico	224721	0,13
Ácido sulfúrico	132737	0,06

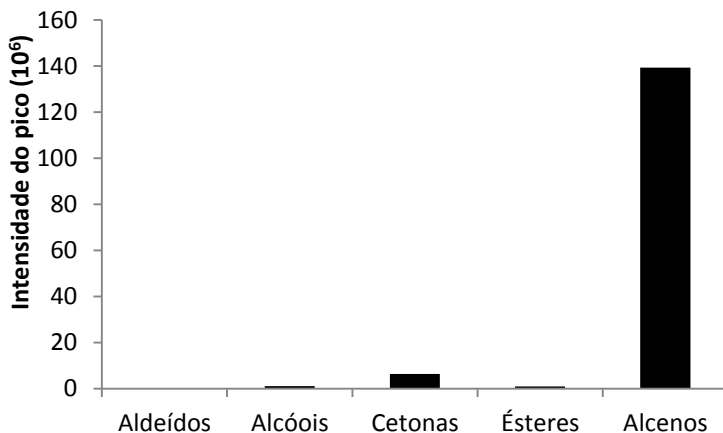
**APÊNDICE E.** Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de PE-20 de abóbora (*Cucurbita moschata*).

Nome	Intensidade absoluta do pico	%
<i>Álcoois</i>		4,00
Isotridecanol	826612	2,02
3,7-dimetil-1-octanol	632049	1,54
2-isopropil-5-metil-1-heptanol	182321	0,44
<i>Aldeídos</i>		6,74
$\beta$ -metilbutanal	1183111	2,89
$\alpha$ -metilbutanal	1486577	3,63
<i>Alcenos</i>		24,43
Tolueno	8201013	20,01
2,4-dimetil-1-hepteno	1379894	3,37
1,3-ciclopentadieno	255845	0,62
Ciclohexeno	174286	0,43
<i>Cetonas</i>		0,88
2,2,6-trimetil-ciclohexanona	245447	0,60
3-metil-4-heptanona	61323	0,15
3,5-dimetil-4-octanona	51819	0,13
<i>Ésteres</i>		1,65
Ácido oxálico	161574	0,39
Ácido sulfúrico	158854	0,39

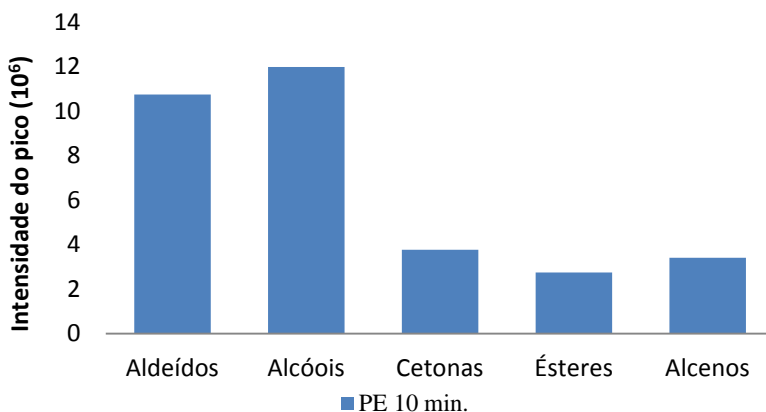
**APÊNDICE F.** Principais compostos voláteis identificados por análise de *headspace*/SPME para as amostras de PE-30 de abóbora (*Cucurbita moschata*).

Nome	Intensidade absoluta do pico	%
<i>Álcoois</i>		6,04
2-etil-1-butanol	57469	0,01
2-isopropil-5-metil-1-hexanol	388436	0,04
2-etil-1-hexanol	1507002	0,14
Dihidro-citronellol	18525821	1,72
2-isopropil-5-metil-1-heptanol	1214338	0,11
2-etil-1-decanol	2151980	0,20
2-hexil-1-decanol	4333529	0,40
<i>Aldeídos</i>		14,26
$\beta$ -metil-butanal	13271208	1,23
2-metil-2-butenal	1084106	0,10
n-heptanal	590655	0,05
$\beta$ -ciclocitral	7554277	0,70
<i>Alcenos</i>		9,05
Tolueno	23441423	2,18
5-metil-1-hepteno	50014370	4,65
Safranal	1188666	0,11
<i>Cetonas</i>		1,56
$\alpha$ -Ionona	2210375	0,21
2,2,6-ciclohexanona	10210265	0,95
4-metil-2-heptanone	1205156	0,11
<i>Ésteres</i>		0,32
Ácido sulfúrico	1504275	0,14
Ácido oxálico	1276831	0,12
<i>Éteres</i>		0,19
Hexil-octil-eter	2031345	0,19
<i>Terpenos</i>		0,08
$\alpha$ -pineno	845124	0,08

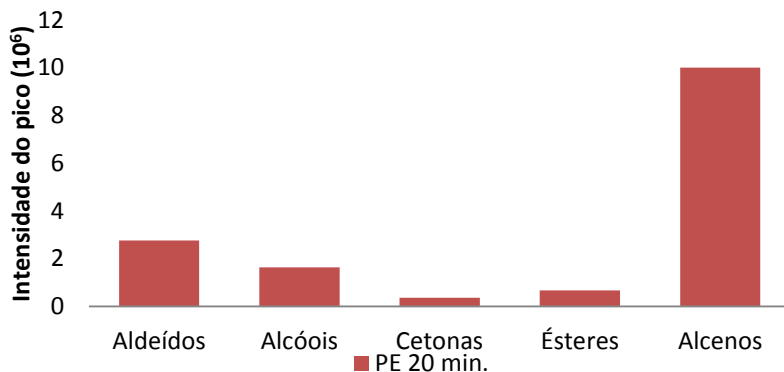
**APÊNDICE G.** Gráfico da soma das áreas da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de *headspace*/SPME, para as amostras de purê de abóbora não esterilizado (PNE).



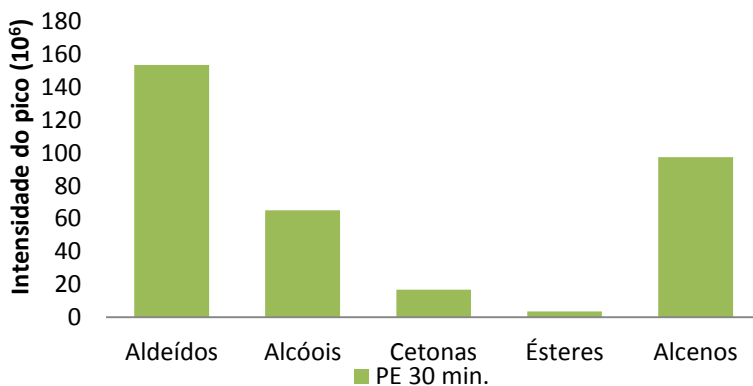
**APÊNDICE H.** Gráfico da soma das áreas da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de *headspace*/SPME, para as amostras de purê de abóbora esterilizado por 10 minutos (PE-10).



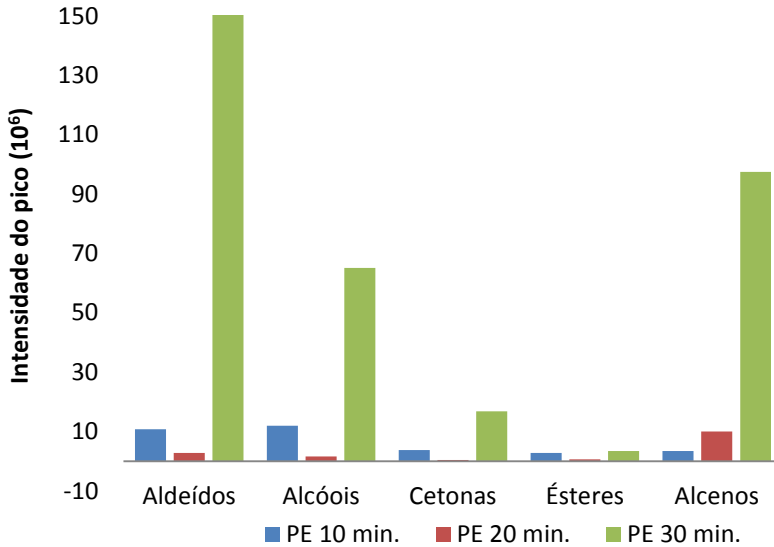
**APÊNDICE I.** Gráfico da soma das áreas da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de *headspace*/SPME, para as amostras de purê de abóbora esterilizado por 20 minutos (PE-20).



**APÊNDICE J.** Gráfico da soma das áreas da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de *headspace*/SPME, para as amostras de purê de abóbora esterilizado por 30 minutos (PE-30).



**APÊNDICE K.** Gráfico comparativo da intensidade absoluta dos picos cromatográficos, separados por grupo funcional, em análise de *headspace*/SPME, dos três diferentes PE's de abóbora.



**APÊNDICE L.** Tempo de redução decimal D (s) para todos os experimentos realizados.

Força do campo (V/cm)	W <sub>específico</sub> calculado (J/g)	D <sub>20 °C</sub>	D <sub>20 °C</sub>	D <sub>20 °C</sub>	D <sub>20 °C</sub>	D <sub>20 °C</sub>	D <sub>40 °C</sub>
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
13000	80	-	19,78	-	-	-	-
	100	-	24,88	-	-	-	-
	120	-	29,21	-	-	-	-
14000	80	16,44	-	20,15	20,25	18,8	22,24
	100	20,84	-	25,17	25,61	23,03	27,15
	120	24,92	-	26,63	26,04	28,39	33,63
18000	80	9,87	11,95	-	-	-	-
	100	11,66	14,94	-	-	-	-
	120	14,45	17,65	-	-	-	-
18500	80	-	-	11,02	11,94	10,54	12,42
	100	-	-	14,55	14,89	12,99	15,27
	120	-	-	16,62	17,66	15,47	18,16
22000	80	6,52	-	-	-	-	-
	100	7,66	-	-	-	-	-
	120	8,32	-	-	-	-	-
22500	80	-	-	7,49	7,93	6,65	7,74
	100	-	-	9,62	9,83	8,22	9,55
	120	-	-	8,76	9,18	9,41	10,85
23500	80	-	7,66	-	-	-	-
	100	-	9,9	-	-	-	-
	120	-	10,95	-	-	-	-
26000	80	4,2	-	4,39	4,69	4,35	4,96
	100	5,12	-	5,50	5,95	6,04	6,99
	120	6,14	-	7,69	7,08	6,75	7,73
27000	80	-	5,3	-	-	-	-
	100	-	6,49	-	-	-	-
	120	-	7,46	-	-	-	-

---

30000	80	3,18	3,64	3,32	3,46	3,5	4,04
	100	3,8	4,92	4,79	4,45	4,24	4,86
	120	4,59	5,78	5,73	5,17	5,12	5,88
<hr/>							
34000	80	-	-	3,03	-	-	-
	100	-	-	3,24	-	-	-
	120	-	-	4,40	-	-	-

---