

Revisão

APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE ALTA INTENSIDADE NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Afonso Mota Ramos¹
Luciano José Quintão Teixeira²
Paulo César Stringheta³
José Benício Paes Chaves⁴
José Carlos Gomes⁵

RESUMO

Nas últimas décadas, os tratamentos não térmicos dos alimentos vêm ganhando grande destaque por conseguir estabilizar os produtos processados via estes métodos, sem o emprego de calor e ainda preservar suas características sensoriais e nutritivas. A aplicação de campos elétricos pulsados (CEP) se destaca como uma promissora tecnologia para substituir o tratamento térmico convencional. Este trabalho discorre sobre a aplicação dos CEP na indústria de alimentos. Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o tema abordando, desde aspectos históricos, equipamentos utilizados, efeito dos CEP nos microorganismos, efeito dos CEP na inativação enzimática, efeito dos CEP nas características sensoriais dos alimentos, emprego de métodos combinados até aspectos como as eventuais dificuldades e limitações deste método. Conclui-se que este é um método promissor, pois para alguns produtos, principalmente os líquidos, ele pode minimizar ou até substituir completamente o emprego de tratamento térmico. Embora já exista um grande número de patentes e trabalhos nesta área, ainda é necessário mais pesquisas para elucidar e estabelecer os parâmetros de tratamento para cada produto, bem como estabelecer normas de legislação específicas para permitir o uso desta tecnologia em escala industrial.

Palavras-chave: pulsos elétricos, tratamento não térmico, equipamentos.

ABSTRACT

HIGH INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY

In the last decades, non thermal food processing is becoming increasingly prominent for promoting stabilization of the processed products without heating, therefore preserving their flavor, aroma, texture, appearance and nutrient content. The application of pulsed electric field (PEF) technology represents a promising alternative to traditional thermal processing. This review deals with the application of pulsed electric field (PEF) in the food industry in substitution to conventional thermal processing, including historical aspects, equipment, PEF effect on microorganisms, on enzymatic inactivation and on food sensory characteristics, combined methods and the difficulties and limitations of the method. For some products, particularly liquid foods, PEF can minimize or completely substitute the use of thermal treatment, and is therefore a promising stabilizing method. Although a great deal of research and a large number of patents already exist in this area, further research is still necessary to elucidate and establish treatment parameters for specific products, as well as to establish specific regulations to allow the use of this technology on an industrial scale.

Keywords: electric field, non-thermal treatment, equipment

¹ Professor adjunto do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) Viçosa/MG. E-mail: amramos@ufv.br

² Estudante de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – DTA/UFV. E-mail: luqteixeira@yahoo.com.br

³ Professor titular do DTA/UFV. E-mail: stringap@ufv.br

⁴ Professor titular do DTA/UFV. E-mail: jbachaves@ufv.br

⁵ Professor titular do DTA/UFV. E-mail: jcgomes@ufv.br

INTRODUÇÃO

No início dos tempos o homem caçava e coletava seu próprio alimento, no momento em que este se esgotava ele se mudava para outra região. Quando ele começou a cultivar seu próprio alimento, ele pôde se fixar em certa região. Contudo, a colheita ocorre em um período curto de tempo e em datas específicas para cada tipo alimento. Logo, houve necessidade de desenvolver formas de conservar seus alimentos para garantir seu sustento em época de escassez. O desenvolvimento de métodos de conservação de alimentos foi fundamental para garantir o desenvolvimento da sociedade moderna. Desde os tempos primórdios o homem vem desenvolvendo e aperfeiçoando novos métodos de conservação. O domínio do fogo revolucionou a forma como o homem prepara seu alimento, mais tarde, foi o emprego do calor que representou grande avanço neste setor. Agora o domínio de técnicas não térmicas empregadas com o intuito de conservar os alimentos representa um novo salto qualitativo na relação do homem com o alimento.

A utilização do sal e da secagem foram os primeiros métodos utilizados na conservação de alimentos. A esterilização, desenvolvida por Nicolas Appert, e a pasteurização, em 1860, por Louis Pasteur representaram grande avanço. Os métodos térmicos foram aprimorados, constituindo em uma forma eficiente de se promover a estabilização de um alimento. Porém, este método transfere grande quantidade de calor, aumentando a agitação molecular e atuando em todos os componentes. Dentre as principais desvantagens do emprego do tratamento térmico ressalta-se o longo tempo de tratamento devido a curva de penetração de calor, a necessidade de resfriamento, o grande aporte de energia e recursos requeridos para obtê-lo. Apesar dos grandes avanços, o homem continua com o desafio de produzir, processar e conservar os alimentos por longo período de tempo com o mínimo de perdas possíveis. Assim segue em busca por novos métodos ou pelo aperfeiçoamento daqueles que já são empregados atualmente de forma que ele atue especificamente em microorganismos e enzimas sem causar danos aos demais compostos. Dentro deste contexto, os métodos não térmicos de processamento de alimentos ganharam enorme impulso a partir da década

de 90 com o lançamento no Japão, e logo em seguida por outros países, de vários produtos processados por alta pressão hidrostática. Dentre os processamentos não térmicos podemos citar: alta pressão hidrostática (Cheftel, 1995; Sangronis et al., 1997), campos magnéticos oscilatórios (Hileman, 1994), pulsos luminosos (Dunn et al., 1995), radiação ionizante (Loaharanu, 1995), agentes químicos e bioquímicos (Barbosa-Cánovas et al., 1999) e campos elétricos pulsados (Bendicho et al., 2002).

A demanda por produtos minimamente processados de alta qualidade tem aumentado nas últimas décadas. Este fato tem estimulado o desenvolvimento de métodos não térmicos de processamento (Manas et al., 2001). Dentre estes métodos, o emprego de campos elétricos pulsados (CEP) se mostra como uma das alternativas mais promissoras para substituir o tratamento térmico convencional tais como a pasteurização e a esterilização comercial. Os tratamentos não térmicos apresentam como vantagens uma melhor manutenção do sabor, da cor, do aroma, da textura e dos nutrientes dos alimentos processados quando comparados aos mesmos alimentos processados com emprego de calor (Zhong et al., 2005) e ainda apresentam gasto energético menor (Barbosa-Cánovas et al., 1999).

Existem vários trabalhos citados na literatura sobre a inativação microbiana em vários produtos líquidos, como leite e sucos de frutas via utilização de CEP (Barsotti et al., 1999; Grah & Markl, 1996; Loaharanu, 1995; Mertens & Knorr, 1992). Por outro lado, os trabalhos sobre os efeitos dos CEP na inativação enzimática são em menor número (Yeom & Zhang, 2002).

O maior potencial para utilização dos CEP é em substituição ao tratamento térmico para alimentos líquidos homogêneos que podem ser bombeados facilmente e são menos propensos ao fenômeno de ruptura dielétrica no produto 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 da extração de suco (Lebovka et al., 2004). A ruptura dielétrica consiste numa descarga elétrica entre

os dois eletrodos da câmara, um fenômeno análogo a um relâmpago. Esta descarga de energia pode catalizar reações indesejáveis no alimento ou em casos mais graves, a explosão da câmara de tratamento. A ocorrência desse fenômeno está relacionada com a condutividade elétrica do alimento, assim alimentos sólidos que contém ar em seu interior ou não são homogêneos apresentam maior probabilidade de ocorrência da ruptura dielétrica. Por isso líquidos homogêneos, além de serem facilmente bombeados permitindo assim um tratamento em fluxo contínuo, apresentam menor probabilidade de ocorrência desse fenômeno. Os equipamentos utilizados em laboratório possuem um sistema de segurança que dispara um alarme e desativa o sistema gerador de pulsos sempre que ocorre este fenômeno, sendo necessário reiniciar todo o processo. Este fenômeno é um dos fatores limitantes da intensidade de campo elétrico a ser utilizado e ocorre sempre que por algum motivo haja incorporação de bolhas de ar no alimento a ser tratado. Isto se deve ao fato da maior condutividade elétrica do ar em relação aos alimentos líquidos homogêneos e ocorre com maior intensidade no final da vida útil da câmara de tratamento. Vale ressaltar que, conforme observado nos trabalhos de Lebovka et al. (2004), os experimentos com alimentos sólidos utilizam campos elétricos de menor intensidade a fim de se evitar o fenômeno de ruptura dielétrica no alimento.

Este trabalho baseou-se em uma revisão de literatura e visa discutir sobre os principais pontos desta tecnologia ressaltando desde aspectos históricos, equipamentos, ação dos CEP nos microorganismos, nas enzimas, nas características sensoriais e nutricionais de produtos bem como de seus principais desafios e limitações.

DEFINIÇÃO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA

O processamento de alimentos via aplicação de campos elétricos pulsados (CEP) consiste em submeter o produto a campos elétricos de alta intensidade (da ordem de 5 a 55 kV/cm) repetidos muitas vezes (constituindo o número de pulsos) durante intervalos de tempo muito pequenos (da ordem de ms) com a finalidade de inativar enzimas e destruir

microorganismos (Pettit *et al.*, 2002). Portanto, ele visa substituir o processamento térmico empregado com a mesma finalidade.

O interesse pelo uso de campos elétricos como tecnologia de conservação de alimentos teve seu início no início do século XX. Quando o alimento é submetido a uma diferença de potencial elétrico (V), produz aquecimento devido a sua resistência elétrica intrínseca (Fryer, 1995). Este processo é conhecido como aquecimento ôhmico. Fetterman (1928) desenvolveu um processo de pasteurização de leite por aquecimento ôhmico. De 1928 a 1938, mais de 200 milhões de litros de leite foram pasteurizados nos EUA mediante este processo (Moses, 1938). Contudo, os efeitos sobre microorganismos e enzimas neste processo é devido ao calor produzido. O efeito do campo elétrico nos alimentos em si, começou a ser estudado somente a partir dos anos 60 (Bendicho *et al.*, 2002). Foi a partir daí então, que se desenvolveu o tratamento via campos elétricos pulsados que utiliza pulsos elétricos de pequena duração para minimizar o efeito Joule e, portanto diminuir o aquecimento do produto. Assim, utilizam-se os efeitos elétricos e não os térmicos para estabilizar os alimentos. Atualmente faz-se a distinção entre uso de campo elétrico com finalidade de aquecer os alimentos (tratamento ôhmico) e uso de campos elétricos pulsados (CEP) usados para submeter o alimento a uma “pasteurização” não térmica.

Os efeitos de eletroporação e de eletrofusão que a aplicação de campos elétricos causa nas células são conhecidos desde 1940. Eles ocorrem quando a célula é submetida a um campo elétrico e são usados em engenharia genética para manipulação de material intracelular (Tsong, 1990). Se a intensidade do campo elétrico ultrapassar certo valor, ocorre a ruptura dielétrica da célula. Este fenômeno é que tem sido estudado desde os anos 60 para serem utilizados em métodos de conservação de alimentos. O marco inicial desta tecnologia pode ser tomado como sendo a partir do registro, na Alemanha, da patente de Dovenspeck em 1960 para os primeiros equipamentos utilizados e possíveis efeitos de sua aplicação (citado por Dunn, 2002). Posteriormente vieram os trabalhos de Sale & Hamilton (1967) que foram os primeiros estudos sobre o mecanismo de ação dos CEP sobre as células dos microorganismos. Nas últimas décadas inúmeros

estudos tem sido desenvolvidos para aperfeiçoar os equipamentos, esclarecer os mecanismos de atuação em microorganismos e enzimas e para estabelecer os parâmetros de tratamento para cada produto.

Deste modo, pode-se afirmar que o interesse para aplicação de campos elétricos em alimentos teve início no século XX. Ele pode ser usado para aquecer produtos devido ao efeito Joule e ajustando-se os parâmetros de frequência e tempo dos pulsos durante o tratamento, pode-se eliminar ou minimizar esse efeito, e dependendo da intensidade do campo aplicado, usar os efeitos elétricos para manipulação genética ou para inativar microorganismos e enzimas.

EQUIPAMENTOS PARA APLICAÇÃO DE CEP

A linha para processamento de alimentos via aplicação de campos elétricos pulsados (CEP) é composta por um sistema de geração de CEP, uma câmara de tratamento e um sistema de envase asséptico (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999). O sistema gerador de pulsos elétricos é um sistema simples composto por uma fonte de alta voltagem, um banco de capacitores, resistências elétricas, um osciloscópio para medir a intensidade dos pulsos elétricos gerados e outros componentes eletrônicos comuns a vários sistemas elétricos. Já a câmara de tratamento possui dois eletrodos entre os quais passa o alimento a ser tratado (Pettit *et al.*, 2002). As câmaras possuem sondas de voltagem e de medição de temperatura, um dispositivo para retirada de ar a fim de evitar a ruptura dielétrica durante o tratamento e podem ainda, possuir ou não, um sistema de refrigeração para evitar ou diminuir o aquecimento do produto durante o tratamento (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999). As primeiras câmaras eram estáticas, ou seja, tratavam os alimentos em bateladas. Posteriormente surgiram as câmaras contínuas. As câmaras estáticas atendem a contento as necessidades inerentes à atividade de pesquisas. Contudo, para processos industriais, as câmaras contínuas são mais adequadas por propiciarem um fluxo contínuo. A Figura 1 ilustra um sistema de processamento via CEP.

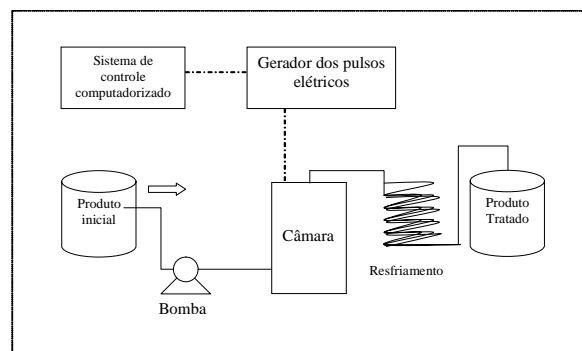


Figura 1 – Sistema de processamento por meio de aplicação de CEP

As câmaras de tratamento são os componentes mais importantes do sistema CEP, e os de projeto mais complicado. São projetadas para conter o alimento a ser tratado e alojar os eletrodos de descarga (Martín *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995). Uma câmara de tratamento consiste de dois eletrodos sustentados por material isolante, localizados de modo a formarem um recinto para conter o alimento e outros materiais. Os eletrodos podem ser placas paralelas, fios paralelos, cilindros concêntricos ou varetas sendo que as placas paralelas se mostram mais adequadas, por produzirem maior uniformidade na distribuição da intensidade do campo elétrico em uma grande área (Martín *et al.*, 1994). Já as câmaras cujos eletrodos são cilindros concêntricos propiciam um escoamento mais suave e uniforme do produto, sendo por isso mais atrativo para aplicações industriais (Zhang *et al.*, 1994). Diversos projetos de câmaras estáticas e contínuas foram sugeridos e uma revisão sobre elas pode ser encontrada em Barbosa-Cánovas (1999).

Com a intensificação dos estudos nesta área surgiram várias câmaras nas últimas décadas com a finalidade de maximizar a eficiência destes equipamentos. As principais características que ela deve possuir são: possibilitar um tratamento homogêneo, ter máxima eficiência tanto na inativação de enzimas quanto de microorganismos, minimizar possíveis reações eletroquímicas e minimizar a possibilidade de ocorrer ruptura dielétrica no alimento enquanto este estiver submetido aos campos elétricos pulsados (Dunn *et al.*, 1995).

A maioria das câmaras de tratamento possui um sistema de refrigeração para evitar o aquecimento do produto enquanto este é submetido aos CEP. O

aquecimento do produto ocorre devido ao efeito ôhmico (Samaranayake *et al.*, 2005) e depende da condutividade elétrica do alimento, e das condições de operação tais como intensidade, número e frequências dos pulsos elétricos aplicados (Esplugas *et al.*, 2002).

Para dimensionar e maximizar as condições de operação em cada tratamento deve-se ter em conta que a inativação de enzimas e microorganismos depende, não somente da natureza destes, mas também das propriedades físicas de cada alimento (Ruhlman *et al.*, 2002). As propriedades físicas dos alimentos que são críticas neste processo são: condutividade elétrica, densidade, calor específico e viscosidade. Estas propriedades podem se alterar com variações de temperatura, por isso elas devem ser consideradas na temperatura em que ocorrerá o processamento (Ruhlman *et al.*, 2002). Assim, mais uma vez, ressalta-se a importância do controle de temperatura durante este processo.

Alimentos líquidos possuem vários íons que conduzem corrente elétrica sendo esta corrente diretamente proporcional à condutividade elétrica do meio (Zhang *et al.*, 1995). Quanto maior for a condutividade elétrica do alimento maior será a geração de calor durante o tratamento provocando mudanças na temperatura caso não haja um sistema eficiente de retirada de calor (Ruhlman *et al.*, 2002).

Assim, é necessário conhecer a quantidade de calor Q (kJ/m³) que é fornecida durante o tratamento. Sendo que para pulsos elétricos com decaimento exponencial, este valor pode ser calculado conforme equação 1 (Giner *et al.*, 2000).

$$Q = \frac{U_0^2 \cdot C}{2 \cdot v} \quad (1)$$

Em que: U_0 é o pico de voltagem (V); C é a capacitância do capacitor (F); e v é o volume (m³).

A viscosidade do produto determina as características do escoamento em câmaras contínuas. Estas características podem ser calculadas pelo número de Reynolds. Deve-se conseguir um escoamento com velocidade uniforme para garantir a uniformidade do tratamento (Ruhlman *et al.*, 2002).

Ruhlman *et al.* (2002) estudaram a influência das propriedades físicas dos alimentos líquidos para tratamento via CEP e concluíram que é mais fácil

processar alimentos líquidos que possuam baixa condutividade elétrica, baixa viscosidade e alta densidade. Para esses alimentos é relativamente fácil controlar a temperatura interna da câmara de processamento utilizando trocadores de calores internos para resfriar o produto e manter a temperatura nos valores estabelecidos.

Em um tratamento com CEP, o produto a ser tratado é submetido a vários pulsos elétricos sucessivos e é de fundamental importância garantir que o potencial elétrico nos eletrodos retorne ao valor zero nos intervalos entre os pulsos a fim de minimizar possíveis reações eletroquímicas. Estas reações eletroquímicas são indesejáveis e quando ocorrem, ocorrem somente na região muito próxima dos eletrodos (aproximadamente 10 Å). O material que compõe o eletrodo também exerce influência sobre estas possíveis reações, sendo que aqueles fabricados com grafite, por exemplo, podem minimizá-las (Dunn, 2002).

Os laboratórios que hoje trabalham com CEP possuem equipamentos diferentes no que se refere ao tipo de câmara, tipo de pulso, sistema contínuo ou em batelada, material utilizado dentre outros. Isto faz com que sejam obtidos resultados diferentes, pois todos esses fatores afetam os parâmetros do tratamento via CEP. Contudo, é possível encontrar muitos pontos em comuns entre os trabalhos. Dentre eles, um de fundamental importância é o impacto que um tratamento não uniforme pode causar na cinética da inativação microbiana. Portanto, garantir a uniformidade do tratamento é de extrema importância para obtenção de resultados satisfatórios com a aplicação de CEP (Dunn, 2002).

Vimos que é grande o número de variáveis que influenciam a eficiência do processamento via CEP. A Tabela 1 resume o número de informações que devem ser observados para que se possa compreender e poder comparar os resultados encontrados na literatura. Assim, a intensidade do campo utilizado, a duração, a forma, o número e a frequência dos pulsos, o tipo de câmara, o tipo de material de que é feito os eletrodos e o meio que foi utilizado para fazer os ensaios exerce grande influência e podem explicar possíveis resultados

Tabela 1 – Características dos sistemas aplicação de CEP.

Alta voltagem e geração de pulsos	Força do campo elétrico (kV/cm) Duração dos pulsos (μ segundos) Frequência dos pulsos (Hz) Forma da onda (quadrada, exponencial)
Câmara de tratamento	Material do eletrodo Distancia entre os eletrodos Configuração dos eletrodos Contato ou não com o ar durante o processamento
Tipo de sistema	Contínuo Batelada Com ou sem refrigeração
Inativação de microorganismo e enzima	Em solução aquosa Em solução tampão Em alimentos simulados Em alimentos reais

Fonte: Yeom & Zhang (2002)

conflitantes encontrados na literatura.

Influência da forma dos pulsos elétricos aplicados

Utilizando capacitores, resistência e indutância em diferentes disposições é possível produzir pulsos elétricos cuja forma são diferentes. Os alimentos podem ser submetidos a pulsos elétricos de alta intensidade de forma quadrada, exponencial, oscilatórios e bipolares (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999). É possível observar a forma do pulso plotando-se um gráfico de intensidade do campo elétrico versus tempo. No pulso exponencial, o campo elétrico atinge um valor máximo e depois decai de forma exponencial com o tempo. No pulso quadrado o campo elétrico se mantém em um valor máximo por certo período para depois cair abruptamente formando um quadrado no gráfico. Já os pulsos oscilantes e bipolares são obtidos por circuitos particulares capazes de produzir estas formas de pulsos (Pettit *et al.*, 2002).

Estudos indicam que a forma do pulso elétrico empregado produz resultados diferentes. Pothakamury *et al.* (1996) obtiveram melhores resultados na inativação de *E. Coli* com pulsos de forma quadrada do que com pulsos exponenciais. Nos pulsos elétricos de forma quadrada, 91 % da energia se situam acima do campo

elétrico crítico, enquanto que nos pulsos elétricos exponenciais temos em torno de 64 % da energia superior ao valor crítico. Isto explicaria a melhor eficiência dos pulsos quadrados (Zhang *et al.*, 1994).

Os pulsos bipolares são mais eficazes do que os monopulares. A inversão brusca da orientação seria responsável por causar maior stress celular e, portanto, conferir maior eficiência (Jeyamkondan *et al.*, 1999).

Ruptura dielétrica do alimento

Na construção da câmara de tratamento é preciso minimizar as possibilidades de ocorrência de ruptura dielétrica. A ruptura dielétrica ocorre quando o campo elétrico ultrapassa a força dielétrica do alimento e se caracteriza por: correntes elétricas elevadas fluindo em canais estreitos; evolução de bolhas de gás; formação de incrustações nos eletrodos; aumento da pressão acompanhado por um som explosivo (Zhang *et al.*, 1995). O risco de ocorrência de ruptura dielétrica limita o processamento de alimentos via aplicação de campos elétricos pulsados primordialmente a alimentos líquidos, embora se possam tratar alimentos líquidos que contenha partículas pequenas. Alimentos sólidos que

tenham bolhas de ar não são adequados para este tipo de processamento. Além disso, a câmara de tratamento deve possuir um sistema de retirada de bolhas de ar para evitar a ruptura dielétrica (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999).

FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA APLICAÇÃO DE CEP

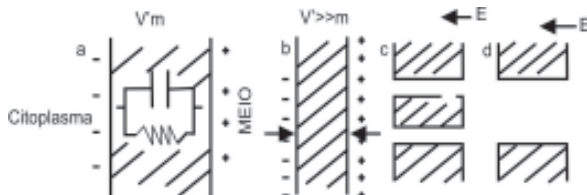
Além do tipo de câmara e pulsos, há outros parâmetros que afetam a eficiência do tratamento via CEP. Os fatores de maior relevância são: características elétricas do alimento, intensidade do campo elétrico aplicado, duração do tratamento, temperatura de tratamento (Pettit *et al.*, 2002), tipo e forma de microorganismo ou enzima (Bendicho *et al.*, 2002) e pH do meio (Garcia *et al.*, 1995). Portanto, devem-se realizar estudos para cada tipo de alimento e para cada tipo de microorganismo e enzima de interesse. No que se refere à intensidade do campo elétrico, os limites são dados por dois pontos importantes: se ele for muito baixo não será capaz de inativar os microorganismos, se for muito alto pode causar ruptura dielétrica no alimento. No que se refere à temperatura de tratamento, quanto maior for sua magnitude, mais efetivo será o tratamento, porém o objetivo principal do estudo desta tecnologia tem sido substituir o tratamento térmico, por isso as câmaras normalmente possuem um sistema de resfriamento e a temperatura é mantida, na maioria das vezes, abaixo de 40 °C. Para o valor de pH a relação é inversa, ou seja, quanto menor for o valor do pH do alimento, mais efetivo será o tratamento (Garcia *et al.*, 1995).

EFEITO SOBRE OS MICROORGANISMOS

A exposição de uma célula biológica a um campo elétrico pulsado de alta intensidade conduz a um fenômeno de permeabilização da membrana. Isto leva a formação de poros que é reversível se o campo elétrico for abaixo de certo valor crítico e por um período de tempo curto. Este fenômeno é chamado de eletroporação e é usado em engenharia genética. Porém se for ultrapassado certos valores de intensidade de campo e de tempo de tratamento, este processo se torna irreversível, ocorre perda de material celular e inativação

da célula (Knorr *et al.*, 1994).

A eletroporação (Figura 2) é o fenômeno segundo o qual uma célula exposta a um campo elétrico de alta voltagem sofre desestabilização da bicamada lipídica e das proteínas de sua membrana, levando à formação de poros na membrana e por conseqüência, sua danificação



parcial ou total.

Figura 2 – Mecanismo de ruptura celular reversível e irreversível: a) membrana celular com potencial V'_m , sem danos na parede; b) Compressão da membrana devido ao aumento do potencial até V (maior que V'_m) e carga da membrana; c) formação de poros (reversível) por novo aumento do potencial até V_c ; d) formação de poros grandes (irreversível) por aplicação de um campo elétrico muito alto.

Fonte: Zimmermann (1986)

Há um mecanismo de dois passos para a formação dos poros, a perfuração inicial seria uma resposta à superação do potencial limite da membrana, seguido de seu aumento com o tempo. A formação de poros é facilitada pela força do campo elétrico e baixa força iônica do meio, sendo relativamente independente da temperatura (Martín *et al.*, 1994).

Muitas hipóteses têm sido estabelecidas para tentar elucidar se a iniciação dos poros se dá na parte protéica ou na parte lipídica da bicamada da membrana. Angersbach *et al.* (2000) afirmam que este processo, devido à imediata formação de canais condutivos na membrana e à rápida formação de uma membrana de alta condutância, deve ocorrer na parte lipídica da membrana. Eles argumentam que o aumento de comprimento dos poros na parte lipídica da membrana ocorre na faixa de microssegundos, enquanto que a desnaturação protéica (por efeito Joule ou modificação elétrica), que é apresentada como alternativa, ocorre na faixa de milissegundos a segundos. Mas o ponto de consenso entre os cientistas é de que o mecanismo de ação dos CEP nos microorganismos está relacionado a mudanças na membrana citoplasmática. A divergência é que para alguns autores, os poros se formam na camada lipídica e para outros ocorrem na parte protéica. Não foram encontrados na literatura trabalhos conclusivos a este respeito. Portanto, o colapso da membrana no processo

de inativação microbiana é um consenso entre vários autores, a discussão se situa em qual seria a cinética exata desta inativação.

Zimmerman (1986) sugeriu um efeito de perfuração iônica da membrana, devido à exposição a CEP. Este efeito é caracterizado por um aumento rápido da condutância da membrana em associação com o movimento iônico. As mudanças estruturais e a permeabilização desenvolvidas na voltagem crítica de ruptura caracterizam a ruptura dielétrica da célula. Esta ruptura é produzida quando da polarização dos fosfolipídios da membrana pela passagem de íons ao longo das linhas de campo elétrico.

Devido à baixa condutividade elétrica da bicamada lipídica, há acúmulo de íons em sua superfície, gerando um potencial transmembrana, que ao superar o valor do potencial natural da célula (cerca de 1 V) causa o rompimento da membrana.

Nas últimas décadas diversos estudos têm sido conduzidos para determinar a eficácia do tratamento com CEP na inativação microbiana (Tabela 2). Jayaram *et al.* (1992) obtiveram 9 reduções decimais na população de *Lactobacillus brevis* após um tratamento a 25 kV/cm, à 60 °C utilizando como meio um tampão fosfato.

Tabela 2. Efeitos da aplicação de campos elétricos pulsados em diferentes microorganismos

Microorganismo	Meio	Campo (kV/cm)	Tempo* (µs)	Reduções decimais
<i>S. Cerevisiae</i>	Suco de maçã	12	55,40	4
	Suco de maçã	35	25	>6
	Suco de laranja	6,7	100	5
	Iogurte	25-38	2000	2
<i>Salmonella dublin</i>	Leite desnatado	28	100	2,5 a >5
<i>E. coli</i>	LSU	25	n.e	2,8
	LSU	70	160	9
	Ovo líquido	26	n.e.	5 a 6
<i>Bacillus subtilis</i>	Sopa de ervilha	33	60	5
<i>Lactobacillus brevis</i>	Leite	22	400	4,6
<i>S. aureus</i>	LSU	60	n.e	>5

* tempo total de tratamento = número de pulsos vezes a duração de cada pulso; n.e = não especificado; LSU = leite simulado ultrafiltrado. Fonte: adaptado de Petit *et al.* (2002).

Pothakamury *et al.* (1996) conseguiram reduzir a população de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus delbrueckii* em 4 e 5 ciclos logarítmicos respectivamente, à temperatura ambiente (inferior a 30 °C). Foi utilizado um simulado de leite submetido a 40 ou 50 pulsos com decaimento exponencial e um campo elétrico de 16 kV/cm. Para cada microorganismo específico a curva de sobrevivência dependerá da intensidade do campo elétrico aplicado e do tempo de tratamento conforme as equações 2 e 3 (Hülsheger *et al.*, 1981).

$$\ln S = -b_E(E - E_c) \quad (2)$$

Em que: S é o número de microorganismos sobreviventes; b_E é uma constante de ajuste de

regressão; e E é o campo elétrico aplicado (kV/cm); e E_c é o valor extrapolado do campo elétrico crítico.

$$\ln S = -b_c \left(\frac{t}{t_c} \right) \quad (3)$$

Em que: S é o número de microorganismos sobreviventes; b_c é uma constante de regressão; t é o tempo de tratamento e t_c é o tempo crítico extrapolado para 100 % de sobrevivência.

EFEITO SOBRE OS ESPOROS

Apesar do crescente interesse pelos CEP, ainda há poucos trabalhos sobre a inativação de esporos

bacterianos mediante esta tecnologia. Esporos bacterianos parecem resistir bem à ação de campos elétricos pulsados, embora sejam mais sensíveis após sua germinação. Os pulsos elétricos não induzem a germinação, sendo, portanto ineficazes na inativação de esporos. No entanto, a germinação pode ser induzida por outros meios, de forma que os pulsos elétricos podem ser usados em seguida para inativar as células recém-germinadas. Simpson *et al.* (1995) obtiveram uma redução de cerca de cinco ciclos logarítmicos de esporos de *Bacillus subtilis* utilizando uma combinação de lisozima e CEP. É provável que a lisozima dissolva o revestimento dos esporos, tornando a célula passível de tratamento por CEP. Desta forma, mesmo não sendo possível inativar esporos com a ação isolada de CEP, é possível usar esta tecnologia em combinação com outras para a inativação de esporos.

Pagán *et al.* (1998) relatou a grande resistência dos esporos ao tratamento com CEP. Eles estudaram a inativação de esporos de *B. subtilis* em simulado artificial de leite ultrafiltrado. Os esporos não foram inativados após 75 pulsos a 60 kV/cm. A combinação de CEP com temperatura moderada (60 °C aproximadamente) e/ou ativação prévia dos esporos usando temperatura de 80 °C por 10 minutos e/ou combinação de CEP com lisozima (5000 IU/ml) também não foram capazes de promover a inativação dos esporos. Somente uma combinação de alta pressão hidrostática (150 MPa, 30 min a 40 °C) com CEP produziu bons resultados. A alta pressão promoveu a germinação dos esporos que foram inativados em seguida via aplicação de CEP.

Jin *et al.* (2002) conseguiram inativar 95% de esporos de *B. subtilis* utilizando campos elétricos de 30 a 40 kV/cm e um tempo de tratamento de 2 a 3 ms.

Como visto, os resultados são contraditórios, isto se deve ao fato de os parâmetros serem diferentes (meio de estudo, intensidade do campo, tempo de tratamento, etc.) e, portanto, é difícil comparar os estudos realizados. Fica claro, no entanto, que os esporos são bastante resistentes a este tratamento e que novos estudos devem ser realizados.

EFEITO SOBRE AS ENZIMAS

Para que o CEP possa ser usado em substituição ao emprego de calor, é necessário que ele seja eficiente tanto na destruição de microorganismos como também na inativação enzimática. Parece haver consenso entre os pesquisadores sobre o mecanismo de destruição

microbiana. Contudo, o número de estudos sobre inativação enzimática via emprego do CEP é relativamente pequeno e seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado.

De forma geral, para se obter êxito na inativação de enzimas, são necessários tratamentos mais severos do que aqueles utilizados para destruir microorganismos (Ho *et al.*, 1997). Se estas informações se confirmarem, a inativação enzimática poderá se tornar um importante indicador de eficiência do tratamento via aplicação de CEP, pois ao serem inativadas, estaríamos seguros de que os microorganismos também estariam. Porém, são necessários mais estudos para corroborar esta informação e provavelmente os indicadores de eficiência devem ser estabelecidos para cada produto.

Os primeiros trabalhos citados na literatura sobre o efeito da aplicação de CEP na inativação de enzimas datam do final dos anos 60 com os trabalhos de Hamilton & Sale (1967). Depois de alguns anos sem novos trabalhos, a partir de meados dos anos 90, o interesse pelo efeito dos CEP sobre atividade enzimática se intensificou novamente (Yeom & Zhang, 2002).

Ainda não há um consenso sobre qual é o mecanismo de atuação dos CEP nas enzimas. Para alguns autores a inativação pode ocorrer devido a oxidação de alguns componentes da enzima como grupos sulfidrilas (Ruhlman *et al.*, 2002).

Para outros autores a inativação enzimática ocorre devido a mudanças na estrutura terciária e ou secundária da proteína (Zhong *et al.*, 2005). Quando uma enzima está submetida a um campo elétrico ela é submetida a uma força elétrica devido a grupos carregados que ela possui em posições diferentes, por causa destes grupos, surgem forças elétricas perturbadoras que podem levar a mudança em sua conformação estrutural provocando a sua desnaturação. A maior ou menor resistência da enzima aos CEP dependerá do número de pontes de hidrogênio que ela possui, da sua composição em aminoácidos que lhe conferirá maior ou menor hidrofobicidade, da presença de metais em sua estrutura e do seu volume (Bendicho *et al.*, 2002).

MODELO MATEMÁTICO PARA A CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

A inativação enzimática com o emprego de tratamento térmico foi extensamente estudada e um modelo de primeira ordem (equação 4) é geralmente

utilizado para descrever a cinética de inativação enzimática via utilização de tratamento térmico e também via utilização de alta pressão hidrostática (Basak & Ramawamy, 1996).

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (4)$$

Em que:

A é a atividade residual enzimática após o tratamento; A_0 é a média da atividade enzimática no tempo zero, ou seja, antes do tratamento térmico; t é o tempo de tratamento térmico e D é o tempo necessário para reduzir 90 % da atividade enzimática.

Zhong *et al.* (2006) empregaram o mesmo modelo acima para determinar os valores de D e Z_E para as

enzimas polifenoloxidase e peroxidase via aplicação de campos elétricos pulsados. Z_E corresponde ao aumento da força do campo elétrico (E) capaz de reduzir o valor de D em 90 %. Z_E é calculado conforme a equação 5.

$$\log\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \frac{(E_2 - E_1)}{Z_E} \quad (5)$$

Os autores encontraram os valores de $Z_E = 16,2$ kV/cm para a polifenoloxidase e $Z_E = 36,9$ kV/cm para a peroxidase conforme ilustrado na Figura 3.

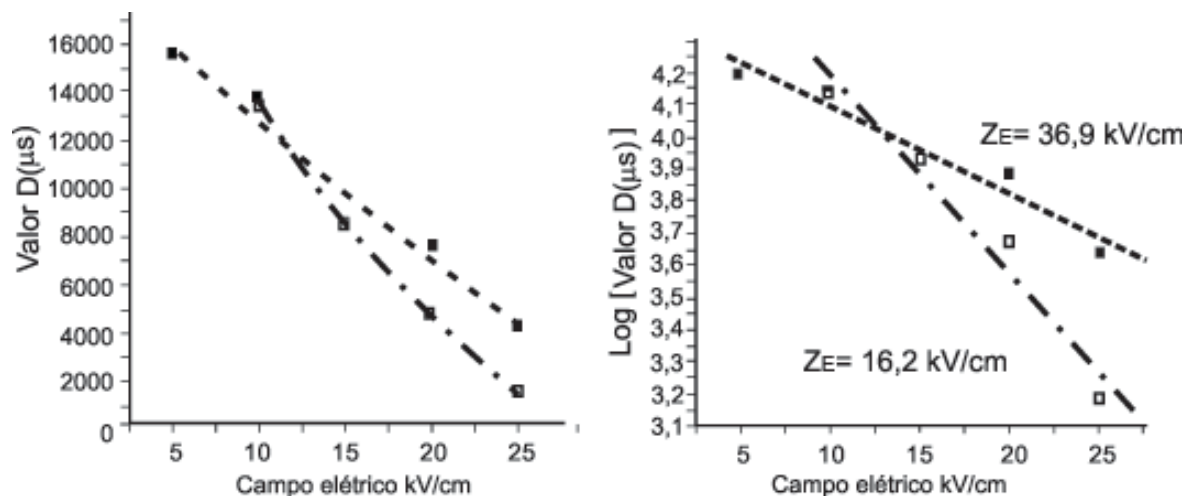


Figura 3 – Efeito da aplicação do CEP no valor D nas enzimas polifenoloxidase (°%) e da peroxidase (¡%).

Fonte: Zong *et al.* (2006)

Alguns autores propõem que a inativação de enzimas via aplicação de campos elétricos pulsados segue a mesma cinética de inativação enzimática encontrada nos tratamentos térmicos e também para os tratamentos não térmicos via aplicação de alta pressão hidrostática. Contudo, há outros trabalhos propondo modelos diferentes. Vale ressaltar ainda que os estudos dos efeitos dos CEP em inativação enzimáticas são recentes e que não existe um consenso sobre qual

mecanismo nem qual modelo descreve melhor este fenômeno. Assim, novos estudos são necessários para confirmar ou não a validade dos modelos de primeira ordem e neste caso, estabelecer os diferentes valores de D e Z_E para cada enzima de interesse e para cada tipo de produto, ou ainda, propor um novo modelo.

Diversos estudos têm sido conduzidos para quantificar a inativação enzimática via aplicação de CEP. Giner *et al.* (2000) obtiveram 93,8% de inativação da

enzima pectinametilesterase com 400 pulsos de 0,02 ms a 24 kV/cm. Zhong *et al.* (2006) utilizando uma solução tampão como meio e tempo de tratamento total de 744 ms a 25 kV/cm conseguiram reduzir a atividade da

peroxidase em 32,3% e da polifenoloxidase em 76,2%. A Tabela 3 ilustra outros resultados obtidos para diferentes enzimas.

Tabela 3. Efeito da aplicação de campos elétricos pulsados em diversas enzimas

Enzima	Meio utilizado	E (kV/cm)	Número de pulsos	Redução da atividade
Fosfatase alcalina	LAU	22	70	65%
	Leite (1,5 % de gordura)	21,5	20	< 10%
	Leite (3 % de gordura)	21,5	20	< 10%
	Tampão (pH 9,8)	40-80	30	≅ 5%
	Leite integral	6,7-20	200	0% (Ta) 74% (T = 70°C)
Plasmina	LAU	15/45	10-50	Até 90%
Peroxidase	Leite	21,5	20	≅ 30%
	Tampão fosfato	40-73,3	30-100	≅ 30%
	Leite integral	13-19	200	> 3%
Protease	LAU	14-15	98	60%
Lípase	Leite	21,5	20	60%

LAU = leite artificial (simulado) ultrafiltrado; Ta = temperatura ambiente.

Fonte: adaptado De BENDICHO *et al.* (2002).

EFEITO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS ALIMENTOS

A maioria dos trabalhos sobre o emprego de CEP refere-se a sua capacidade de inativar microorganismos e de preservar os nutrientes dos alimentos, havendo poucos trabalhos referentes aos seus efeitos nas características sensoriais dos produtos assim processados.

Min *et al.* (2003) encontraram diferença significativa, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey, entre o suco de tomate processado via tratamento térmico (TT) e aquele processado via CEP, sendo que os provadores atribuíram melhores notas para o suco processado pelo sistema CEP conforme Tabela 4. Ainda segundo estes autores, vários outros indicadores sensoriais (aparência, cor e textura) denotam a melhor aceitação do suco processado via sistema CEP.

Tabela 4 – Média dos escores obtidos para aceitação do suco de tomate processado via tratamento térmico e via CEP.

	Tratamento térmico	CEP
Sabor	4,7	6,2
Impressão global	4,8	6,2

Fonte: Min *et al.* (2003)

Sucos cítricos tratados com CEP à temperatura inferior a 34 °C, não apresentaram mudanças significativas na sua acidez, sabor e cor após o tratamento (Cserhalmi *et al.*, 2005), o que corrobora a informação de que este método é mais eficiente para se preservar as características sensoriais dos alimentos do que aqueles estabilizados mediante emprego de calor.

Jia *et al.* (1999) também obtiveram melhor retenção de compostos aromáticos com utilização de CEP em sucos de laranja do que com tratamento térmico. Eles utilizaram um campo elétrico de 30 kV/cm e obtiveram 3 % de perda de compostos voláteis para um tempo total de tratamento de 240 ms e 9 % de perda quando o tempo foi de 480 ms. As perdas de compostos voláteis com emprego de tratamento térmico (90 °C, 1 min) foram de 22 %. O tratamento de 480 ms foi equivalente ao tratamento térmico no que se refere à inativação de fungos filamentosos e leveduras e promoveu menor perda de compostos voláteis (9 %). A perda de compostos voláteis via aplicação de CEP foi atribuída ao sistema de vácuo feito na câmara de tratamento cujo objetivo é evitar o fenômeno de ruptura dielétrica no alimento.

CONCLUSÃO

A aplicação de campos elétricos pulsados é um método promissor para substituir o tratamento térmico, com as vantagens de garantir melhor preservação da cor, da textura, do sabor, da aparência e do aroma dos alimentos. Suas principais limitações devem-se à restrição da sua aplicação em produtos líquidos homogêneos e pelo fato de ser pouco efetivo na inativação de enzimas e esporos. Contudo, o emprego de CEP combinado com outros métodos tais como emprego de temperatura moderada, alta pressão hidrostática, utilização de agentes antimicrobianos, redução do valor do pH do meio, dentre outros, pode produzir excelentes resultados na conservação de alimentos. Consta-se também que há necessidade de novos estudos no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos equipamentos; na elucidação precisa da cinética e mecanismos de inativação de microorganismos, enzimas e esporos; na definição dos parâmetros de tratamento adequado para cada tipo de produto; estudos toxicológicos para garantir a inocuidade do processo; elaboração de legislação específica para processamento via CEP.

REFERÊNCIAS

- Angersbach A, Heinz V, Knorr, D (2000) Effect of Pulsed Electric Fields on Cell Membranes in Real Food Systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1:135-149.
- Barbosa-Cánovas GV, Pothakamury UR, Palou E, Swanson BG (1999) Conservación no Térmica de Alimentos. Zaragoza, Acribia. 280p.
- Barsotti L, Merle P, Cheftel JC (1999) Food Processing by Pulsed Electric Fields. II Biological Aspects. *Food Review International* 15:(2)181-213.
- Basak, S., E Ramawamy, H. S. Ultra High Pressure Treatment of Orange Juice: a Kinetic Study on Inactivation of Pectin Methyl Esterase. *Food Research International*, 7:601-607, 1996.
- Bendicho S, Barbosa-Cánovas G V, Martín O (2002) Milk Processing by High Intensity Pulsed Electric Fields. *Food Science & Technology* 13:195-204.
- Cheftel JC (1995) High-Pressure, Microbial Inactivation and Food Preservation (Review). *Food Science Technologyy Internacional* 1:75-90.
- Cserhalmi Zs, Sass-Kiss A, Tóth-Markus M, Lechner N (2005) Study of Pulsed Electric Field Treated Citrus Juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Article in press 6p.
- Dunn J (1995) Pulsed Electric Field Processing: An Overview. In: Barbosa-Cánovas GV, Zhan QH Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications. Technomic Publishing Company inc. USA. p. 17-47.
- Dunn J, Ott T, Clark W (1995) Pulsed Light Treatment of Food and Packaging. *Food Technology* 49:(9)95-98.
- Esplugas S, Pagán R, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (2002) Engineering Aspects of the Continuous Treatment of Fluid Foods by Pulsed Electric Fields. In Barbosa-Cánovas GV, Zhan QH (Eds.) Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications. Technomic Publishing Company inc. USA. p. 48-60.

- Fetterman JC (1928) The Electrical Conductivity Method of Processing Milk. *Agricultural Engineering* 4:407-408.
- Fryer P (1995) Electrical Resistance Heating of Foods. In: Gould GW (Eds.) *New Methods of Food Preservation*. Chapman & Hall USA, New York. p. 204-236.
- Garcia D, Gómez N, Raso J, Pagán R (2005) Bacterial Resistance after Pulsed Electric Fields Depending on the Treatment Medium pH. *Innovative food science & emerging technologies* 6:388-395.
- Giner J, Gimeno V, Espachs A, Elez P, Barbosa-Cánovas GV, Martín O (2000) Inhibition of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Pectin Methylesterase by Pulsed Electric Fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1:57-67.
- Grah T & Markl H (1996) Killing of Micro-organism by Pulsed Electric Fields. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:148-157.
- Hamilton WA & Sale AJH (1967) Effects of High Electric Fields on Microorganisms II. Mechanism of Action of the Lethal Effect. *Biochim. Biophys. Acta* 148:789-800.
- Hileman B (1994) Findings Point to Complexity of Health Effects of Electric and Magnetic Fields. *Chemical Engineering News* 72:(29)27-33.
- Ho SY, Mittal GS, Cross JD (1997) Effects of High Electric Pulses on the Activity of Selected Enzymes. *Journal of Food Engineering* 31:69-84.
- Hülshager H, Potel J, Niemann EG (1981) Killing of Bacteria with Electric Pulsed of High Field Strength. *Radiation Environmental Biophysics* 20:53-65.
- Jayaram S, Castle GSP, Margaritis A (1992). Kinetics of Sterilization of *Lactobacillus brevis* Cells by the Application of High Voltage Pulses. *Biotechnology Bioengineering* 40:1412-1420.
- Jeyamkondan S, Jayas DS, Holley R (1999) Pulsed Electric Field Processing of Foods. *Journal of Food Protect* 62:10088-1096.
- Jia M, Zhang QH, Min DB (1999) Pulsed Electric Field Processing Effects on Flavor Compounds and Microorganisms of Orange Juice. *Food Chemistry* 65:445-451.
- Jin ZT, Su Y, Tuhela L, Zhang QH, Sastry SK, Yousef AE (2002) Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores Using High Voltage Pulsed Electric Fields. In: Barbosa-Cánovas GV & Zhan QH (Eds.) *Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications*. Technomic Publishing Company inc. USA. p. 183-190
- Knorr D, Geulen M, Grahl T, Sitzmann W (1994) Food Application of High Electric Field Pulses. *Trends in Food Science and Technology* 5:71-75.
- Lebovka NI, Praporscic I, Vorobiev E (2004) Effect of Moderate Thermal and Pulsed Electric Field Treatments on Textural Properties of Carrots, Potatoes and Apples. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 5:9-16.
- Loaharanu P (1995) Food Irradiation: Current Status and Future. In: Gould GW (ed.) *New Methods of Food Preservation*. Chapman & Hall USA, New York. p. 90-109.
- Manas P, Barsotti L, Cheftel JC (2001) 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* 2:239-249.
- Martín O, Zhang Q, Castro AJ, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1994) Empleo de Pulsos Eléctricos de Alto Voltage Para la Conservación de Alimentos. *Revista Española de Ciencia e Tecnología de Alimentos* 34:(1)1-34.
- Mertens B & Knorr D (1992) Development of Non-thermal Processes for Food Preservation. *Food Technology* 46:124-136.
- Min Z, Jin T, Zang QH (2003) Commercial Scale Pulsed Electric Field Processing of Tomato Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3338-3344.
- Moses BD (1938). Electric Pasteurization of Milk. *Agricultural Engineering* 12:525-526.
- Pagán R, Esplugas S, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1998) Inactivation of *Bacillus Subtilis* Spores Using High Intensity Pulsed Electric Fields in Combination With Other Food Conservation Technologies. *Food Science Technology International* 4:33-44.
- Pettit B, Ritz M, Federighi M (2002) Nouveaux Treatments Physiques de Conservation des Aliments:

- Revue Bibliographique. Revue de Médecine Vétérinaire 53:547-556.
- Pothakamury UR, Vega H, Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1996) Effect of Growth Stage and Processing Temperature on the Inactivation of *E. coli* by Pulsed Electric Fields. Journal Food Protection 59:1167-1171.
- Ruhlman KT, Jin ZT, Zhang QH (2002) Physical Properties of Liquid Foods for Pulsed Electric Field Treatment. In: Barbosa-Cánovas GV & Zhan QH (Eds.) Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications. Technomic Publishing Company inc. USA. p. 61-73
- Samaranayake CP, Sastry SK, Zhang H (2005) Pulsed Ohmic Heating - A Novel Technique for Minimizations of Electrochemical Reactions During Processing. Journal of Food Science 70:(8) 460-465.
- Sale AJH, Hamilton WA (1967). Effects of High Electric Fields on Microorganisms I. killing of Bacteria and Yeasts. Biochemica Biophysica Acta. 148:781-788.
- Sangronis E, Pothakamury U, Ramos AM, Ibarz A, Barbosa-Cánovas GV (1997) La Alta Presion Hidrostática: Una Alternativa en el Procesamiento no Térmico de Alimentos. Alimentária 33-43.
- Simpson MV, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1995). Combined Inhibitory Effect of Lysozyme and High Voltage Pulsed Electric Field on the Growth of *Bacillu subtilis* Spores. Annual IFT Meeting, session 89, paper 2.
- Tsong TY (1990) On Electroporation of Cell Membranes and Some Related Phenomena. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 24:271-295.
- Yeom HW, Zhang QH (2002) Enzymatic Inactivation by Electric Fields: A Review. In: Barbosa-Cánovas GV & Zhan QH (Eds.) Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications. Technomic Publishing Company inc. USA. p. 74-81
- Zhang QH, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1995) Engineering Aspects of Pulsed Electric Field Pasteurization. J. Food Engennering 25: 261-291.
- Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1994) Engennering Aspects of PEF Pasteurization. Journal of Food Engeneering 25:261-268.
- Zhong K, Hu X, Zhao G, Fang Chen X (2005) Inactivation and Conformational Change of Horseradish Peroxidase Induced by Pulsed Electric Field. Food Chemistry 92:473-479.
- Zhong K, Wu J, Wang Z, Chen F, Liao X, Hu X, Zhang Z (2006) Inactivation Kinetics and Secondary Structural Change of PEF-treated POD and PPO. Food Chemistry: Article in Press 8p.
- Zimmermann U (1986) Electrical Breakdown, Electropermeabilization and Electrofusion. Rev Physiol Biochem Pharmacol 105:175-256.

Aceito para publicação em 04/01/2007