

LUCIANO JOSÉ QUINTÃO TEIXEIRA

**APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE ALTA
INTENSIDADE NO PROCESSAMENTO DE SUÇO DE CENOURA**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

LUCIANO JOSÉ QUINTÃO TEIXEIRA

**APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE ALTA INTENSIDADE
NO PROCESSAMENTO DE SUCO DE CENOURA**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

APROVADA: 28 de fevereiro de 2008.

Prof^ª Olga Martín Belloso
(Co-orientadora)

Prof. Paulo César Stringheta
(Co-orientador)

Prof. Paulo Rogério Fontes

Prof^ª. Valéria Paula Rodrigues Minin

Prof. Afonso Mora Ramos
(Orientador)

À minha família, especialmente à minha mulher,
Dora; aos meus pais Francisco das Chagas
Teixeira e Conceição Quintão de Castro Teixeira;
e aos meus irmãos Cleuza, Toninho, Marizinha,
Luciene e Elísio (*in memoriam*).
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permanecer comigo em todos os instantes da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar este curso.

À coordenação da CAPES pela bolsa de estudo no Brasil e também pela bolsa de estágio de doutorado no exterior que possibilitou que o experimento fosse realizado na universidad de LLeida/Espanha.

À coordenação de pós-graduação e a todos os professores do DTA-UFV pelo apoio.

Ao departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidad de LLeida por me receber em suas instalações durante a realização do experimento.

Ao Commission of the European Communities, Framework 6, Priority 5 'Food Quality and Safety', Integrated Project NovelQ FP6-CT-2006-015710 que financiou os experimentos realizados.

Ao meu orientador professor Afonso Mota Ramos e aos co-orientadores Olga Martín Belloso e Paulo César Stringheta, não apenas por suas orientações e conselhos, más também, pela boa convivência e pelo vínculo de respeito e consideração que se criou entre nós no decorrer deste trabalho.

À professora Olga, por ter me recebido tão bem em seu laboratório na universidad de LLeida e viabilizado a realização deste projeto.

Aos funcionários do DTA-UFV, em especial: Geralda, José Raimundo, José Geraldo e Luiz.

A Todos os professores e funcionários do DTA (Lleida), por me considerarem como membro do grupo durante o ano que passei com eles.

Aos colegas de curso, pelo convívio e amizade, em especial: Joesse e Danilo.

Aos colegas da república, Odilon e Cleber, onde morei no inicio do curso.

À Minha mulher, Dora, pela compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis como o ano que passei na Espanha conduzindo o experimento e ela ficou no Brasil.

Ao Robert Soliva por sua ajuda e conselhos no momento de redigir os artigos.

À Ingrid e Isabel, pela participação na elaboração de alguns artigos da tese e também pela amizade, pela ajuda e pelos passeios que fizemos durante o tempo que passei em Lleida.

À Gema, Alejandra, Marta e demais companheiros de laboratório, pela boa convivência.

À Andrez e Eduardo, pelo auxílio na condução das análises laboratoriais.

À Angel, pela boa convivência no laboratório e pela caminhada de 5 h no fim de semana.

À Robert Garrofé, Sergi Real, Ricardo e Manuel Recio, pelo bom convívio e pela amizade.

À Manuel, pela ajuda na manipulação e pelo manuseio do equipamento de pulsos na planta piloto.

A todos os bolsistas do DTA/Lleida, pela boa convivência e pelos momentos compartilhados na hora do almoço, principalmente a Ana e a Hector que sempre faziam o café.

Aos meus companheiros de república de Lleida Pep, Sergi e Inma, pela boa convivência e pela amizade.

A todos que passaram no laboratório de novas tecnologias, quebrando a rotina do dia-a-dia.

Ao pessoal do teatro de Lleida, pelos bons momentos que passamos juntos.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Luciano José Quintão Teixeira, 30 anos, filho de Conceição Quintão de Castro Teixeira e Francisco das Chagas Teixeira, nascido em 13 de abril de 1977 na cidade de Senador Firmino – MG. Morou com a família no Município de Brás Pires até concluir a oitava série. Em 1993, a fim de dar continuidade aos estudos, mudou-se para Viçosa. De 1993 a 1995 cursou o segundo grau no COLUNI (Colégio Universitário – UFV). Em 1996 ingressou no curso de **Engenharia de Alimentos** na Universidade Federal de Viçosa – UFV. De 1999 a 2000 fez um intercambio na França dentro do programa de formação de jovens engenheiros na França, programa fomentado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNI (Confederação Nacional das Indústrias) e CNOUS (Centre National des Oeuvres Universitaires et Scolaires - França). Neste período cursou **Engenharia de Alimentos** em uma faculdade francesa, a ENSIA (École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires), na cidade de Montpellier e fez estágio em uma empresa francesa de panificação. Em 2001 retornou a Viçosa. Em 2002 concluiu o curso de engenharia de alimentos – UFV e no mesmo ano iniciou o **mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** no DTA/UFV. Em 26 de fevereiro de 2004 concluiu o curso de mestrado. No mês seguinte iniciou o curso de doutorado no mesmo departamento. Em setembro de 2006, também com bolsa da CAPES, foi para a Espanha, ingressando no departamento de **Tecnologia de Alimentos da Universitat de Lleida**, onde realizou o experimento da tese de doutorado. Em setembro de 2007 retornou para viçosa. Aos 28 de fevereiro de 2008 concluiu o curso de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	6
1.1 - CENOURA: CARACTERÍSTICA DA MATÉRIA-PRIMA E PROCESSAMENTO	6
1.1.1 - HISTÓRICO E ASPECTOS GERAIS DA MATÉRIA-PRIMA	6
1.1.2 - CONSUMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS	7
1.1.3 - SABOR E AROMA DA CENOURA	7
1.1.4 - COR, TEXTURA E ENZIMAS.....	9
1.1.5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	10
1.1.6 - SUCO DE CENOURA	12
1.1.7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
1.2 - APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE ALTA INTENSIDADE NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS (ARTIGO DE REVISÃO)	18
1.2.1 - RESUMO	18
1.2.2 - ABSTRACT	19
1.2.3 - INTRODUÇÃO	19
1.2.4 - DEFINIÇÃO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA.....	22
1.2.5 - EQUIPAMENTO PARA APLICAÇÃO DE CEPAI	23
1.2.6 - INFLUÊNCIA DA FORMA DOS PULSOS ELÉTRICOS APLICADOS	27
1.2.7 - RUPTURA DIELÉTRICA DO ALIMENTO.....	28
1.2.8 - FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA APLICAÇÃO DE CEPAI	28
1.2.9 - EFEITO SOBRE OS MICROORGANISMOS.....	29
1.2.10 - EFEITO SOBRE OS ESPOROS	32
1.2.11 - EFEITO SOBRE AS ENZIMAS	33
1.2.12 - MODELO MATEMÁTICO PARA A CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	34
1.2.13 - EFEITO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS ALIMENTOS	37
1.2.14 - CONCLUSÃO	38
1.2.15 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO 2 – METODOLOGIA GERAL	42
2.1 - OBTENÇÃO DO SUCO DE CENOURA	42
2.2 - APLICAÇÃO DOS CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS.....	45
2.3 - TRATAMENTO TÉRMICO.....	48
2.4 - ANÁLISES LABORATORIAIS.....	48
2.5 - DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS ESTUDADOS	48
2.6 - OTIMIZAÇÃO	50
2.7 - CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	50
2.8 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ESTABILIZAÇÃO	50
2.9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

CAPÍTULO 3 – INACTIVATION OF OXIDATIVE ENZYMES BY HIGH-INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD FOR RETENTION OF COLOR IN CARROT JUICE 52

3.1 - ABSTRACT	52
3.2 - INTRODUCTION	52
3.3 - MATERIALS AND METHODS	54
3.3.1 - Juice Processing	54
3.3.2 - HIPEF Equipment	54
3.3.3 - Experimental Design and Statistical Analysis	55
3.3.4 - Physicochemical Analysis	56
3.3.5 - Color Evaluation	56
3.3.6 - Browning Index	57
3.3.7 - POD Activity Measurement	57
3.3.8 - PPO Activity Measurement	58
3.4 - RESULTS AND DISCUSSION	58
3.4.1 - Characterization and Electrical Conductivity Study	58
3.4.2 - Effect of HIPEF Treatment on POD Activity	61
3.4.3 - PPO Activity in Carrot Juice	66
3.4.4 - Effect of HIPEF Treatment on Color	66
3.5 - CONCLUSIONS	68
3.6 - ACKNOWLEDGMENTS	69
3.7 - REFERENCES	69

CAPÍTULO 4 – MODELING THE REDUCTION OF PEROXIDASE ACTIVITY IN CARROT JUICE BY HIGH-INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELDS..... 73

4.1- ABSTRACT	73
4.2 - INTRODUCTION	73
4.3 - MATERIALS AND METHODS	75
4.3.1 - Juice processing	75
4.3.2 - HIPEF treatment	76
4.3.3 - POD activity measurement	76
4.3.4 - Mathematical models	77
4.3.4 - Statistical analysis	79
4.4 - RESULTS AND DISCUSSION	80
4.4.1 - First-Order Kinetic Models	82
4.4.2 - Weibull distribution function	85
4.4.3 - Fermi's model	87
4.4.4 - Comparison of the kinetic models	89
4.4.5 - POD inactivation as a function of energy density input	90
4.5 - CONCLUSIONS	91
4.6 - ACKNOWLEDGMENTS	92
4.7 - REFERENCES	92

CAPÍTULO 5 – COMPARATIVE STUDY ON COLD STORAGE OF CARROT JUICE PROCESSED BY HIGH-INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD OR HEAT TREATMENT 95

5.1 - ABSTRACT	95
5.2 - INTRODUCTION	96
5.3 - MATERIAL AND METHODS	97
5.3.1 - Juice processing	97
5.3.2 - HIPEF treatment	98
5.3.3 - Thermal treatment	98
5.3.4 - Sample packaging and storage	99
5.3.5 - Vitamin C	99
5.3.6 - Carotenoids: β -carotene	99
5.3.7 - Total Phenolic content	100
5.3.8 - POD activity measurement	101
5.3.9 - Antioxidant capacity	102
5.3.10 - Statistical analysis	102
5.4 - RESULTS AND DISCUSSION	104
5.4.1 - Vitamin C	104

5.4.2 - β -carotene.....	107
5.4.3 - Total phenolic compounds.....	110
5.4.4 - Residual POD activity.....	111
5.4.5 - Antioxidant capacity.....	112
5.5 - CONCLUSIONS.....	114
5.6 - ACKNOWLEDGMENTS.....	114
5.7 - REFERENCES.....	114
CAPÍTULO 6 – AVALIAÇÃO DURANTE A ESTOCAGEM DO SUCO DE CENOURA PROCESSADO POR CEPAL E POR TRATAMENTO TÉRMICO.....	119
6.1 - RESUMO.....	119
6.2 - ABSTRACT.....	119
6.3 - INTRODUÇÃO.....	120
6.4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	122
6.4.1 - Obtenção do suco de cenoura.....	122
6.4.2 - Aplicação dos campos elétricos pulsados.....	123
6.4.3 - Tratamento térmico.....	124
6.4.4 - Estabilidade durante o armazenamento.....	124
6.4.5 - Análise sensorial.....	124
6.4.6 - Estabilidade do suco quanto à turbidez.....	125
6.4.7 - Pectinesterase (PE).....	125
6.4.8 - Lipoxigenase.....	126
6.4.9 - Viscosidade.....	127
6.4.10 - pH e sólidos solúveis.....	127
6.4.11 - Análise estatística.....	128
6.5 - RESULTADO E DISCUSSÃO.....	129
6.5.1 - Análise sensorial.....	130
6.5.2 - Estabilidade quanto à turbidez do suco.....	130
6.5.3 - Inativação enzimática.....	133
6.5.4 - Viscosidade.....	134
6.5.5 - pH e sólidos solúveis.....	135
6.6 - CONCLUSÕES.....	137
6.7 - AGRADECIMENTOS.....	138
6.8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
CAPÍTULO 7 – DISCUSSÃO GERAL.....	142
CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES.....	147
8.1 - TRABALHOS FUTUROS.....	149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Crescimento do valor das vendas de frutas, verduras e seus derivados no período de 2003 a 2004.....	7
Tabela 2 - Composição centesimal, mineral e de vitamina da cenoura por 100 g da parte comestível.....	11
Tabela 3 - Características dos sistemas aplicação de CEPAL.....	27
Tabela 4 - Efeitos da aplicação de campos elétricos pulsados em diferentes microorganismos	31
Tabela 5 - Efeito da aplicação de campos elétricos pulsados em diversas enzimas.....	36
Tabela 6 - Média dos escores obtidos para aceitação do suco de tomate processado via tratamento térmico e via CEPAL.....	37

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Parâmetros utilizados nos experimentos relacionados à aplicação de campo elétrico pulsado de alta intensidade	49
--	----

CAPÍTULO 3

Table 1 - Physicochemical characteristic of the non-processed carrot juice.....	59
Table 2 - Central composite response surface design and residual POD in carrot juice under different HIPEF treatment conditions.....	62
Table 3 - ANOVA calculated after deleting the non significant terms ($P < 0.05$) for the response surface quadratic model of residual POD in carrot juice treated of different HIPEF conditions.....	63
Table 4 - Response for color coordinates and browning index for different HIPEF treatments.	68

CAPÍTULO 4

Table 1 - Simple first-order and first-order fractional conversion kinetic constants for the inactivation of carrot juice POD treated by HIPEF at different field strengths. .	82
Table 2 - Estimated parameters of the Weibull distribution function proposed to describe the inactivation of carrot juice POD by HIPEF treatments at different field strengths.....	85
Table 3 - Estimated parameters of the Fermi's model proposed to describe the inactivation of carrot juice POD by HIPEF treatments at different field strengths.	88

CAPÍTULO 5

Table 1 - Effect of the treatments on the parameters studied for carrot juice samples just after processing (first day).....	104
Table 2 - First-order kinetic rate constants (k) and determination coefficients (R^2) for the degradation of vitamin C of treated carrot juice during storage at 4°C for 56 days.	106
Table 3 - First-order kinetic rate constants (k) and determination coefficients (R^2) for the degradation of β -carotene of treated carrot juice during storage at 4°C for 56 days.....	109
Table 4 - First-order kinetic rate constants (k) and determination coefficients (R^2) for the degradation of antioxidant capacity of treated carrot juice during storage at 4°C for 56 days.	113

CAPÍTULO 6

Tabela 1 - Efeito dos parâmetros estudados no suco de cenoura fresco e após ser processado via CEPAl e por dois tratamentos térmicos distintos (90°C/30 s e 90°C/60 s).....	129
Tabela 2 - Parâmetros de regressão para o modelo que descreve o comportamento da estabilidade do suco de cenoura com o tempo de armazenamento.	132

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Néctar de cenoura; néctar de cenoura com laranja e limão; suco de cenoura tradicional; suco de cenoura orgânico encontrado a venda no mercado local da cidade de Lleida/Espana. 12
- Figura 2 - Média do preço (Euro/kg) do suco concentrado de cenoura (65°Brix) e suco concentrado de maçã (70 °Brix) vendido a granel no mercado Europeu. 13
- Figura 3 - Sistema de processamento por meio de aplicação de CEPAI..... 24
- Figura 4 - Mecanismo de ruptura celular reversível e irreversível:..... 29
- Figura 5 - Efeito da aplicação do CEPAI no valor D nas enzimas polifenoloxidase (▪) e da peroxidase (□). 35

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Fluxograma do processamento do suco de cenoura 44
- Figura 2 - Sistema de geração de campos elétricos pulsados de alta intensidade 46
- Figura 3 - Detalhes da câmara de tratamento 46
- Figura 4 - Foto do monitor do osciloscópio onde se pode verificar a forma e o comprimento do pulso elétrico aplicado..... 47

CAPÍTULO 3

- Figure 1 - Electrical conductivity of carrot juice as a function of the temperature at natural pH (6.20 ± 0.02) and adjusted pH (pH = 3.8)..... 60
- Figure 2 - Residual activity of POD as a function of pulse width and pulse frequency for monopolar (a) and bipolar pulses (b) at different HIPEF conditions. 65

CAPÍTULO 4

Figure 1 - Residual carrot juice POD activity as a function of HIPEF treatment time (mean \pm SD). Treatments were performed at 200 Hz and 6- μ s square pulses in bipolar mode. E = electric field strength.....	81
Figure 2 - Effect of electric field strength on the rate constant (k_i) estimated by a simple first-order model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of carrot juice POD. Experimental results are expressed as the mean \pm standard deviation.....	83
Figure 3 - Effect of electric field strength on the rate constant (k_j) estimated by a first-order fractional conversion model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of a carrot juice POD. Experimental results are expressed as the mean \pm standard deviation.....	843
Figure 4 - Effect of electric field strength on stabilization value (RA_∞) estimated by a first-order fractional conversion model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of a carrot juice POD. Experimental results are expressed as the mean \pm standard deviation.....	844
Figure 5 - Effect of electric field strength on the scale factor (α) and shape parameter (γ) estimated by a Weibull model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of carrot juice POD. Experimental results are expressed as the means \pm standard deviation.....	86
Figure 6 - Effect of the treatment time on the critical electric field strength parameter (E_h) of Fermi's model [Equation (8)]. Experimental results are expressed as the means \pm standard deviation an the plotted line is fits of the data [Equation (17)].	88
Figure 7 - Effect of the treatment time on K_f parameter of Fermi's model [Equation (8)]. Experimental results are expressed as the means \pm standard deviation and the plotted line is fits of the data [Equation (18)].....	89
Figure 8 - Residual carrot juice POD activity exposed at different electric field energy densities supplied by HIPEF treatments at several conditions (means \pm SD). The plotted line correspond to the fit of data to a first-order model	90

CAPÍTULO 5

Figure 1 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on vitamin C retention of carrot juice throughout storage at 4°C for 56 days. Data shown are mean \pm standard deviation. The line is plotted model.....	107
Figure 2 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on β -carotene content (mg/L) of carrot juice throughout storage at 4°C for 56 days. Data shown are mean \pm standard deviation.....	109

Figure 3 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on total phenolic compound of carrot juice throughout storage at 4°C. TT = thermal treatment. Data shown are mean ± standard deviation.....	111
Figure 4 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on antioxidant capacity of carrot juice throughout storage at 4°C. TT = thermal treatment. Data shown are mean ± standard deviation.....	112

CAPÍTULO 6

Figura 1 - Ficha de análise sensorial utilizada no teste de aceitação.....	125
Figura 2 - Suco de cenoura após uma semana de armazenamento a 4°C. Da esquerda para a direita tem-se: suco fresco de cenoura; pasteurizados (90°C/30s e 90°C/60 s); tratado via CEPAI.....	131
Figura 3 - Estabilidade do suco de cenoura, durante o armazenamento a 4°C, tratado via CEPAI e por dois distintos tratamentos térmicos. Estão apresentados os dados ± desvio padrão. A linha representa o modelo ajustado por meio de regressão não linear.....	131
Figura 4 – Variação da viscosidade do suco de cenoura tratado via CEPAI e por dois tratamentos térmicos distintos durante o armazenamento a 4°C. Media ± desvio padrão.....	135
Figura 5 – Variação do valor do pH do suco de cenoura tratado via CEPAI e por dois tratamentos térmicos distintos durante o armazenamento a 4°C. Media ± desvio padrão.....	136
Figura 6 – Variação do teor de sólidos solúveis para suco de cenoura tratado via CEPAI e por dois tratamentos térmicos distintos durante o armazenamento a 4°C. Media ± desvio padrão.....	137

RESUMO

TEIXEIRA, Luciano José Quintão, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade no processamento de suco de cenoura.** Orientador: Afonso Mota Ramos. Co-Orientadores: Olga Martín Belloso e Paulo César Stringheta.

Suco de hortaliças é um produto de alto valor nutricional, porém é perecível e, por isso durante seu processamento necessita passar por um processo de estabilização com o intuito de aumentar a sua vida de prateleira. O tratamento térmico é normalmente empregado com essa finalidade, contudo causa alteração de sabor, aroma, aparência e textura, além de ocasionar consideráveis perdas no valor nutricional do produto. Assim, nos últimos anos, alguns tratamentos não-térmicos têm sido estudados, dentre eles os campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI). Os CEPAI podem estabilizar os sucos com mínima alteração de suas propriedades sensoriais e nutritivas. O trabalho foi dividido em duas fases. Primeiramente determinaram-se as condições de estabilização via CEPAI, ou seja, intensidade do campo elétrico, tempo de tratamento, frequência dos pulsos, comprimento e tipo de pulso (mono ou bipolar) de modo a garantir melhor estabilização do suco de cenoura, tomando como variável resposta a inativação da enzima peroxidase e a cor do suco de cenoura. Foi feito ainda caracterização físico-química do suco de cenoura e foram propostos alguns modelos para explicar a inativação enzimática em função do tempo de tratamento e intensidade dos campos elétricos aplicados. Os diferentes modelos usados se ajustaram adequadamente sendo que o modelo de primeira ordem fracional apresentou melhor ajuste. Em seguida, foi realizado um estudo comparativo entre a eficiência da pasteurização via CEPAI e por meio de dois tratamentos térmicos distintos comumente empregados na indústria de sucos de frutas e hortaliças. A comparação foi feita logo após a aplicação dos tratamentos e também ao longo do tempo de armazenamento tendo como variável resposta alguns compostos bioativos (vitamina C, β -caroteno e compostos fenólicos), teste de aceitação sensorial, inativação enzimática e algumas propriedades físico-químicas. O tratamento via CEPAI utilizando 35 kV/cm,

aplicando pulsos bipolares a uma frequência de 200 Hz e 6 μ s de comprimento durante 1500 μ s foi selecionado como sendo o mais eficaz na estabilização do suco de cenoura. O suco de cenoura tratado via CEPAI teve melhor aceitação sensorial, apresentou maior estabilidade quanto à turbidez e maior retenção de vitamina C do que os tratamentos térmicos. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o valor de pH, teor de sólidos solúveis, viscosidade e capacidade antioxidante. A concentração de β -caroteno aumentou após os tratamentos e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. O teor de β -caroteno, vitamina C e a capacidade antioxidante reduziram exponencialmente com o tempo de armazenamento. O suco de cenoura não apresentou atividade enzimática para a lipoxigenase e a redução do pH foi suficiente para inibir a polifenoloxidase. A pectinesterase foi completamente inativada em todos os tratamentos e a peroxidase apresentou baixa atividade residual após aplicação dos CEPAI e do tratamento térmico não havendo diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Concluiu-se que a aplicação dos CEPAI foram capazes de promover a estabilização do suco de cenoura com menos alteração de suas propriedades intrínsecas e menor perda nutricional, sendo, portanto, mais eficiente do que o uso de tratamento térmico.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Luciano José Quintão, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Application of high intensity pulsed electric field on carrot juice processing.** Adviser: Afonso Mota Ramos. Co-Advisers: Olga Martín Belloso and Paulo César Stringheta.

Vegetable juice is a product of high nutritional value, however it is perishable and for that during your processing needs to pass for a stabilization process to increase your shelf life. Thermal treatment is usually used with this purpose; however it causes nutritional loss, flavor, aroma, appearance and texture alteration. Like this, in the last years, non-thermal treatments have been studied, among them, high intensity pulsed electric fields (HIPEF). HIPEF can stabilize vegetables juices with a minimal alteration of its properties (sensorial and nutritional). This work was divided in two stages. In a first moment it was determined the conditions of HIPEF stabilization (field intensity; width, frequency and polarity of pulses; and total treatment time) that achieved a better stabilization of carrot juice taking as answer variable peroxidase inactivation and color preservation. They were still made physical-chemical characterization of carrot juice and it was proposed some models to explain the enzymatic inactivation as a function of treatment time or electric field intensity applied. The different models used fit well and the model of first fractional order presented a better accuracy. In a second moment, it was made a comparative study among the pasteurization efficiency of HIPEF and two thermal treatments commonly employees by vegetable juices industry. The comparison was made just after process and also throughout storage time taking as answer variable some bioactive compound (β -carotene, vitamin C and phenolics compound), sensorial analysis, enzymatic inactivation and some physical-chemistries properties. The HIPEF treatment using 35 kV/cm of field intensity, applying 6 μ s pulse width in bipolar mode at 200 Hz of frequency during 1500 μ s was selected as being more effective on carrot juice stabilization. The HIPEF treated carrot juice presented a better sensorial acceptance; higher cloudy stability, and more retention of vitamin C than that presented by juices thermally processed. There was no significant difference ($p < 0.05$) among treatments for pH value,

solids soluble content, viscosity and antioxidant capacity. The concentration of β -carotene increased after process for all treated juices and no significant differences ($p < 0.05$) among them were observed. The tenor of β -carotene, vitamin C and antioxidant capacity depleted exponentially as a function of storage time. Carrot juice did not present lipoxygenase activity and the pH reduction was enough to inhibit polyphenoloxidase. Pectin methyl esterase was completely inhibited for all treatments applied and peroxidase presented low residual activity after HIPEF and thermal treatments having no significant differences ($p < 0.05$) among them. It was concluded that the HIPEF process was capable to promote carrot juice stabilization with smaller alteration of its properties and smaller nutritional losses. Therefore, HIPEF is better than thermal treatment to stabilize and to promote high quality of carrot juices.

INTRODUÇÃO GERAL

O mundo globalizado e a vida moderna estão promovendo mudanças significativas no estilo de vida e nos hábitos de consumo das pessoas. Dessa forma, percebe-se que as pessoas mantêm o enfoque contínuo em produtos que sejam saudáveis e ofereçam grande praticidade em seu manuseio e preparo.

Saborosas e benéficas à saúde, as frutas, hortaliças e seus derivados estão conquistando os consumidores, sendo o consumo destes produtos, recomendado pelos órgãos de saúde. A OMS recomenda o consumo de no mínimo 400 g de frutas, legumes e verduras frescos/dia (excluindo tubérculos de amido). Pesquisas indicam que, em geral, consumindo-se quantidades adequadas de vegetais é possível prevenir doenças crônicas, como as doenças do coração, diabetes tipo 2, obesidade e câncer (Aquino, 2006).

Em um estudo realizado pela ACNielsen (2004), em 59 países, constatou-se que as tendências que impulsionam o crescimento do mercado de alimentos e bebidas são: enfoque contínuo na saúde, necessidade de praticidade e impacto das marcas dos produtos. De acordo com este estudo, o consumo de frutas, hortaliças e seus derivados tiveram crescimento maior do que a média global quando comparado ao das demais categorias de alimentos.

De acordo com estudo realizado por Alves e Garcia (1993), até o ano de 1991 praticamente não havia mercado no Brasil para o suco de frutas refrigerado pronto para beber. Hoje a realidade é outra, pois encontram-se sucos prontos para beber oferecidos por diversas marcas e sob diversas formas. Ano após ano, vê-se maior oferta de sucos prontos para beber nos supermercados. Há maior oferta tanto referente à quantidade de produtos, como também de marcas, sabores e tipos de sucos. Dessa forma, abre-se um grande espaço para a inovação deste setor. Portanto, não se pode desprezar a possibilidade de um aumento, nos próximos anos, do consumo para os sucos vegetais como o suco de tomate, suco de cenoura ou sucos mistos, principalmente o suco de cenoura com laranja.

A cadeia agroindustrial da cenoura situa-se como uma das mais importantes do agronegócio brasileiro alimentando setores indiretos como a venda de insumos, máquinas agrícolas, equipamentos de irrigação e embalagem. Ela gera emprego no campo e nas agroindústrias de transformação. A cenoura é a principal matéria-prima utilizada na indústria de minimamente processados (Lana e Vieira, 2000). Ela também pode ser utilizada na produção de sucos, enlatados, congelados e produtos desidratados. No mais, existe grande interesse comercial para o desenvolvimento de novos produtos que combine diferentes sabores e composição nutricional. Assim, têm sido desenvolvidas misturas de suco de cenoura com outros sucos tais como, laranja, maçã, e limão (Mawele et al., 1996; Kim et al., 2001; Rodrigo et al., 2003; Fernandez-Garcia et al., 2001).

A cenoura é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil (Lana e Vieira, 2000). Além de ser muito apreciada pelo seu sabor, ela é considerada uma excelente fonte de carotenóides, fibras, vitaminas, minerais e outros componentes bioativos, promovendo, assim, grandes benefícios para a saúde do consumidor (Qin et al., 2005). Apesar do alto consumo da cenoura “in natura”, ainda há poucos produtos industrializados derivados dela sendo comercializados no Brasil. O consumo de suco de cenoura é bem maior em países da Europa e dos Estados Unidos do que no Brasil cujo consumo ainda é muito incipiente.

O processamento industrial de suco, tanto de frutas, hortaliças ou misturas destas, sempre inclui uma etapa de tratamento térmico com a finalidade de estabilizar o produto final (Servili et al., 2000). O tratamento térmico é, sem dúvida, um método eficiente de conservação dos alimentos. Contudo, uma série de alterações indesejáveis ocorre nos alimentos tratados pelo calor, surgindo assim, vários subprodutos de reações ativadas pela enorme quantidade de energia transferida ao alimento. Tais alterações devem-se ao cozimento do produto e suas conseqüências nos aspectos físicos, sensoriais e nutritivos do alimento tais como alterações no sabor, na cor, na textura e a destruição de vitaminas e outros compostos bioativos que sejam termolábeis (Mawele et al., 1996; Espachs-Barroso et al., 2003; Rivas et al., 2006).

O sabor cozido é importante em alguns produtos como os derivados de carne, mas o mesmo não ocorre com os derivados de frutas e hortaliças onde o sabor natural é mais apreciado. Assim, tem crescido a demanda por derivados de frutas e hortaliças minimamente processadas que tenham sabor e aroma próximo do produto “in natura” (Porretta, 1995), ou seja, os consumidores estão rejeitando o sabor cozido e a perda de

alguns nutrientes induzidos pelo tratamento térmico. Neste contexto, a estabilização de alimentos e bebidas, sobretudo sucos, por meio de processos não-térmicos, como é o caso da utilização de campos elétricos pulsados de alta intensidade, vem ganhando cada vez mais destaque.

A aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI) para o tratamento de alimentos é uma promissora alternativa não-térmica aos tratamentos tradicionais (Martín et al., 1997; Ramos et al., 2006). A tecnologia CEPAI pode complementar o tratamento térmico ou substituí-lo completamente, sem o inconveniente da degradação das propriedades nutricionais e sensoriais causadas pelo tratamento térmico, uma vez que se pode trabalhar com CEPAI à temperatura ambiente ou de refrigeração, e ainda assim conseguir uma eficiente redução tanto microbiológica quanto a inativação enzimática (Barbosa-Cánovas et al., 1999).

Não foi encontrado, no Brasil, trabalho algum sobre processamento de alimentos estabilizados com a aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade. Isto ressalta o caráter inovador do presente trabalho. Primeiramente porque reforça os trabalhos sobre o processamento de suco de cenoura, de grande importância, dado a relevância da cadeia produtiva da cenoura no Brasil e pelo avanço ocorrido nas últimas décadas no mercado de sucos prontos para beber. Segundo, porque as tecnologias de processamento não-térmicas, como é o caso dos CEPAI, vem ao encontro dos anseios dos consumidores que almejam alimentos de sabor e aroma mais próximo do produto natural.

O presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer os valores dos parâmetros de pasteurização do suco de cenoura, por meio de aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade, capazes de estabilizar o produto final.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Estabelecer os parâmetros de pasteurização (intensidade do campo; frequência, polaridade e comprimento do pulso; tempo de tratamento) que garantam a maior inativação da enzima peroxidase no suco de cenoura;
- b) Verificar o efeito da aplicação dos CEPAI em outras enzimas de importância para o processamento de sucos de cenoura;
- c) Estudar a cinética de inativação da peroxidase via aplicação dos CEPAI;
- d) Comparar a qualidade do produto final do suco de cenoura fresco, tratado com CEPAI e com dois diferentes tratamentos térmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNIELSEN GLOBAL SERVICE. Os produtos mais Quentes do Mercado. **Relatório Executivo de Notícias**. Dezembro de 2004. Disponível em: <http://www.acnielsen.com.br/tendencias_analises/estudos_especiais.htm>. Acesso em: 05/01/2006.

Alves, R. M. V.; Garcia, E. E. C. Embalagens Para Suco de Frutas. **Coletânea do ITAL**. v. 2, n. 23, p. 105-122, 1993.

Aquino, C. **Prevenção do Câncer e de Doenças Cardíacas Circulatórias**. Disponível em: <<http://www.mediconatural.com/prevenção.htm>>. Acesso em: 15/11/2006

Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. **Conservación no Térmica de Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 280p. 1999.

Espachs-Barroso, A.G.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martín-Belloso, O. Microbial and Enzymatic Changes in Fruit Juice by High Intensity Pulsed Electric Fields. **Food Reviews International**. v. 19, p. 253–273, 2003.

Fernandez-Garcia, A.; Butz, P.; Bognar, A.; Tauscher, B. Antioxidative Capacity, Nutrient Content and Sensory Quality of Orange Juice and an Orange-lemon-Carrot Juice Product after High Pressure Treatment and Storage in Different Packaging. **European Food Research & Technology**. v. 213, n. 5, p. 290-296, 2001.

Kim, Y.S.; Park, S.J.; Cho, Y.H.; Park, J. Effects of Combined Treatments of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat on the Quality of Carrot Juice. **Journal of Food Science**. v. 66, n. 9, p. 1355-1360, 2001.

Lana, M. M.; Vieira, J.V. Fisiologia e Manuseio Pós-colheita de Cenoura. Brasília: **EMBRAPA Hortaliças**, 2000. 15 p.

Martín-Belloso, O.; Qin, B.L.; Chang, F.J.; BarbosaA-Cánovas, G.V.; Sanson, B.G. Inactivation of Escherichia Coli in Skim Milk by High Intensity Pulsed Electric Fields. **Journal of Food Process Engineering**. v. 20, p.317-336, 1997.

Mawele, S.; Timothy, D.; Benoit, G. Water Blanching Effects on Headspace Volatiles and Sensory Attributes of Carrots. **Journal of Food Science**. v. 61, n. 6, p. 1191-1195, 1996.

Qin, L.; XU, S.; Zhang, W. Effect of Enzymatic Hydrolysis on the Yield of Cloudy Carrot Juice and the Effects of Hydrocolloids on Color and Cloud Stability During Ambient Storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 85, p. 505-512, 2005.

Porretta, S.; Birzi, A.; Ghizzoni, C.; Vicin, E. Effects of Ultra-high Hydrostatic Pressure Treatments on the Quality of Tomato Juice. **Food Chemistry**. v. 52, p. 35-41, 1995.

Ramos, D. M. R. **Avaliação das perdas de carotenóides e valor de vitamina A durante a desidratação e a liofilização industrial de cenoura e espinafre** (Tese de Mestrado), Campinas, 1991, 106p. Universidade Estadual de Campinas.

Ramos, A.M.; Teixeira, L.J.Q.; Stringheta, P.C.; Chaves, J.B.P.; Gomes, J.C. Aplicação de Campos Elétricos Pulsados de Alta Intensidade na Conservação de Alimentos. **Ceres**. v. 53, n. 308, p. 425-438, 2006.

Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Rodrigo, M. Effect of PEF and Heat Pasteurization on the Physical-chemical Characteristics of Blended Orange and Carrot Juice. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie- Food Science and Technology**. v. 39, p. 1163-1170, 2006.

Rodrigo, D.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martínez, A.; Rodrigo, M. Pectin Methyl Esterase and Natural Microflora of Fresh Mixed Orange and Carrot Juice Treated with Pulsed Electric Fields. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 12, p. 2336-2342, 2003.

Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; 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, p. 407-415, 2000.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - CENOURA: CARACTERÍSTICA DA MATÉRIA-PRIMA E PROCESSAMENTO

1.1.1 - HISTÓRICO E ASPECTOS GERAIS DA MATÉRIA-PRIMA

O ancestral selvagem da cenoura apareceu provavelmente a cerca de 5.000 anos na Ásia central onde hoje se localiza o Afeganistão que continua sendo o centro de diversidade da *Daucus carota*. Ela foi introduzida na Europa no século X. As variedades ancestrais eram violeta, negra, e branca sendo que a variedade laranja apareceu na Holanda no século XVII. (Mabey, 1997). Ela foi trazida para o Brasil pelos portugueses e é cultivada principalmente na região sudeste e no sul do Brasil (CEAGESP, 2007).

A cenoura (*Daucus carota L.*) é uma hortaliça herbácea, da família Apiácea, de cultivo anual, cuja parte comestível é uma raiz aromática, tuberosa, lisa, carnuda, reta e sem ramificações podendo ter formato cônico ou cilíndrico. As principais variedades se distinguem ainda pela coloração externa, coloração da rama e época de plantio. Esta é uma hortaliça muito consumida no Brasil e pode ser encontrada em diferentes formas no comércio, sendo os principais produtos industrializados a cenoura ralada, em cubos, rodela, palitos e minicenouras (EMBRAPA, 2003).

De acordo com os dados de produção mundial de 2005, China, Rússia e Estados Unidos, são, nesta ordem, os maiores produtores mundiais de cenoura (FAOSTAT, 2005). Já no Brasil, Minas Gerais e São Paulo são os principais produtores de cenoura (Lima et al., 2004). Portanto, ela é cultivada em larga escala no sudeste e também no sul do Brasil por serem regiões de clima mais ameno. Contudo, devido ao desenvolvimento de cultivares tolerantes ao calor, seu cultivo tem se expandido para outros estados como Bahia, Pernambuco e Distrito Federal. Suas variedades se dividem em dois grupos: as de verão e as de inverno. (Vieira, Pessoa e Makishima, 1997).

1.1.2 - CONSUMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS

Em um estudo realizado pela empresa de pesquisa de mercado ACNielsen (2004), em 59 países, sobre o crescimento do consumo de 89 categorias de alimentos e bebidas, revelou que entre os anos de 2003 e 2004 o valor das vendas de alimentos, nas regiões pesquisadas, aumentou em 4%, sendo que houve acréscimo em algumas categorias e retração em outras. A Tabela 1 ilustra o aumento das vendas dos derivados de frutas e hortaliças em que se nota o crescimento destes produtos acima da média do setor de alimentos e bebidas em geral (4%). Dessa forma, constata-se que o mercado está propício para acolher o lançamento de novos derivados de frutas e hortaliças, pois a procura por estes produtos tem crescido em face de uma maior procura por alimentos saudáveis e que ofereçam praticidade em seu armazenamento, manipulação e consumo.

Tabela 1 - Crescimento do valor das vendas de frutas, verduras e seus derivados no período de 2003 a 2004

Produto	% de crescimento
Frutas congeladas	9
Salada pronta	8
Vegetais frescos	7
Frutas e castanha não perecível	6

Fonte: Adaptado de ACNielsen Global Service (2004).

Segundo este estudo, o consumo de frutas e verduras entre aquele ano corrente de 2003 a 2004 cresceu 7% na América latina, 3% na Ásia-pacífico e na América do norte e 5% na Europa (ACNielsen Global Service, 2004).

1.1.3 - SABOR E AROMA DA CENOURA

As características tanto nutricionais como sensoriais dos vegetais dependem de sua constituição físico-química. A composição físico-química conferirá ao vegetal certos atributos, que são responsáveis pela aceitação do produto pelo consumidor ou pela indústria de transformação. As características sensoriais referem-se a sabor, aroma, aparência e textura dos alimentos. Portanto, a qualidade da cenoura dependerá de suas características físicas, que influenciam a sua atratividade por parte do consumidor, assim

como de suas características físico-químicas e composição nutricional (Barrett Reina, 1990).

O sabor e o aroma são importantes atributos de qualidade de todos os produtos alimentares. O sabor da cenoura é resultado de uma combinação de compostos voláteis, açúcares, compostos amargos e aminoácidos livres (Howard et al., 1995). A composição final de vegetais depende de vários fatores como variedade, tratos culturais e composição do solo (Davies e Hobson, 1991). O ponto de colheita e a manipulação pós-colheita também exercem grande influência na qualidade final dos produtos de origem vegetal. O ponto de colheita depende da variedade cultivada. Para garantir produtos de qualidade, é preciso tomar cuidados especiais no transporte e armazenamento desta hortaliça. A cenoura não deve ser exposta à concentração de etileno superior a 0,5 microlitro de etileno por litro de ar, pois isto induziria a síntese de compostos fenólicos, como a isocumarina, que são substâncias amargas (Chitarra e Chitarra, 2005). Por isso, deve-se evitar o armazenamento da cenoura juntamente com frutas climatéricas. É importante ainda observar a temperatura e a umidade de armazenamento.

Além das características intrínsecas do produto, as condições de processamento também devem ser levadas em conta, pois assim como qualquer outro produto alimentício, a adoção de um método de conservação inadequado irá causar modificações nas suas propriedades sensoriais devido à atuação de enzimas, reações químicas e crescimento microbiano. Tacott e Howard (1999) concluíram que cenouras submetidas a estresse na pré-colheita apresentam mudança em seus atributos sensoriais de maneira que os provadores atribuíram um sabor amargo mais pronunciado e um gosto doce menos intenso.

O processamento térmico realizado em derivados da cenoura afeta a qualidade sensorial do produto final reduzindo a intensidade do sabor doce e a concentração de compostos voláteis como terpenos (Simon, 1985). Os terpenos são encontrados em várias hortaliças, como o tomate e a cenoura. Eles podem ser originados ainda pela atividade de enzimas como a lipoxigenase ou resultado da co-oxidação dos carotenóides ou por reação de Maillard durante o tratamento térmico (Servili et al., 2000). Ainda segundo estes autores, o tratamento térmico modifica principalmente os compostos de carbono C₆ saturados e insaturados, álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e os derivados dos carotenóides. Portanto, a forma de estabilizar os derivados vegetais por tratamento térmico pode modificar a composição do seu aroma final.

1.1.4 - COR, TEXTURA E ENZIMAS

Os sentidos são responsáveis pela percepção de tudo aquilo que ocorre ao nosso redor, sendo que o impacto é marcado pelo aspecto, forma e, sobretudo, pela cor dos objetos. Das percepções captadas pelo homem, 87% são pela visão, 9% pela audição e os 4% restantes, distribuído entre olfato, paladar e tato. A cor e aroma conferem ao homem uma variada associação de idéias que estimulam o apetite. A expressão “comer com os olhos”, neste sentido, define bem a importância visual, pois os consumidores preferem produtos com aspecto sadio e de coloração característica do produto (Pimentel, 1995).

Dentre as características dos derivados de cenoura, principalmente do suco de cenoura, a cor é considerada o atributo de qualidade que mais influencia o consumidor no momento da compra. Desta maneira, os cientistas e a indústria de alimentos dão muita importância à manutenção e correta medição da cor. A cor laranja, típica da cenoura e seus derivados estão relacionados com o seu conteúdo de carotenóides (Simon, 1985). Entretanto, quando ela é processada para obter suco e durante seu armazenamento, podem ocorrer reações indesejáveis de escurecimento enzimático e não-enzimático. Estas reações causam a condensação de compostos fenólicos ou formação de melanoidinas via reação de Maillard conduzindo à mudança de cor no produto final (Talcott e Howard, 1999). A reação de Maillard é influenciada pela temperatura de processamento e estocagem, pH e atividade de água do produto (Jaime et al., 1998).

Carotenóides são pigmentos importantes encontrados em pigmentos fotossintéticos, complexo de proteínas de plantas, bactéria, fungos e alga e são responsáveis pela coloração de várias frutas e hortaliças (Stahl e Sies, 1996). A oxidação de carotenóides também contribui para a descoloração do produto (Jaime et al., 1998). Ela é influenciada pela exposição a temperaturas de armazenagem, disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, atividade de água e acidez do produto (Padula, 1983).

Alguns constituintes da parede celular como substâncias pécticas, hemiceluloses, celuloses e proteínas são os principais responsáveis pela textura dos vegetais. (Chitarra e Chitarra, 2005).

Assim como as frutas, a cenoura possui diversas enzimas endógenas. A degradação da pectina da parede celular é catalisada pela ação de dois grupos de enzimas endógenas

chamadas de pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG). A ação destas enzimas aumenta a solubilidade da parede celular e promove uma diminuição da viscosidade dos derivados dos vegetais (Fachin, 2003).

Polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) e peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) são enzimas oxidativas de grande interesse no processamento do suco de cenoura. PPO catalisa a hidroxilação de monofenóis conduzindo a formação de di-fenóis e, ou oxidação de di-fenóis para formar quinonas. Em seguida, por condensação de quinonas são formadas as melanoidinas que são pigmentos escuros (Witaker, 1995). POD geralmente é considerada uma das enzimas presentes em vegetais de maior termoresistência e por isso é usada como indicador de qualidade, ou seja, após o tratamento térmico aplicado, se ela foi inativada, admite-se que todas as outras também foram (Soysal and Söylemez, 2004; Morales-Blancas et al., 2002)

1.1.5 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A cenoura, como pode ser observada na Tabela 2, é uma hortaliça muito nutritiva sendo uma excelente fonte de provitamina A que é essencial para a manutenção da boa acuidade visual, saúde da pele e das mucosas. Ela ainda é boa fonte de minerais e possui baixo valor calórico podendo, portanto ser um importante complemento alimentar para pessoas que estão fazendo dieta para perder peso.

De acordo com a Portaria n ° 33, de 13 de janeiro de 1998 da ANVISA (Brasil, 1998) a ingestão diária recomendada para uma pessoa adulta de vitamina A é de 800 mcg de retinol equivalente (RE), o que confirma a cenoura como excelente fonte deste nutriente.

A cenoura e o suco de cenoura são as maiores fontes de pro-vitamina (Oszmianski e Górska, 2002). Além das funções benéficas já amplamente conhecida da vitamina A, sua presença na alimentação melhora a biodisponibilidade do ferro. De acordo com Layrisse et al. (1997) a vitamina A previne o efeito inibitório dos polifenóis presentes no chá e café os quais são responsáveis pela redução de mais de 50% na absorção do ferro dos alimentos. As cenouras são as principais fontes de origem vegetal de α e β -caroteno (Britton, 1992). Os carotenóides com atividade pró-vitáminica (β -caroteno, α -caroteno e criptoxantina) provenientes de diversos vegetais têm sido considerados como o grupo de substâncias que

podem ser transformadas em vitamina A na alimentação humana. (Rodrigues e Penteado, 1989).

Tabela 2 – Composição centesimal, mineral e de vitamina da cenoura por 100 g da parte comestível.

Componentes	Cenoura crua	Cenoura cozida
Umidade (%)	90,1	90,7
Energia (kcal)	34	30
Proteína (g)	1,3	0,8
Lipídeos (g)	0,2	0,2
Carboidratos (g)	7,7	6,7
Fibra alimentar (g)	3,2	2,6
Cinzas (g)	0,9	0,6
Cálcio (mg)	23	26
Magnésio (mg)	11	14
Manganês (mg)	0,05	0,05
Fósforo (mg)	28	27
Ferro (mg)	0,2	0,1
Potássio (mg)	315	176
Cobre (mg)	0,05	0,02
Zinco (mg)	0,2	0,2
Vitamina C (mg)	5,2	Traços
Vitamina A (mcg-RE)*	602	860

Fonte: Tabela Brasileira de composição de alimentos (2007).

* USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 14 (Julho, 2001)

Os carotenóides protegem as células contra a ação fotodinâmica, sendo que dentre eles, o licopeno é o que oferece maior proteção, seguido de astoxantina e β -caroteno (Tikler et al., 1994). Isto explica o crescente interesse pelo potencial antioxidante dos carotenóides que combate os radicais livres e assim retarda o processo de envelhecimento e diminui o risco de surgimento de cânceres e doenças coronárias.

1.1.6 - SUCO DE CENOURA

A tecnologia de produção industrial de suco de cenoura é parecida com a de produção de suco de maçã ou pêra. É necessário escolher uma matéria-prima de boa qualidade e em bom estado de conservação. As etapas comuns a praticamente todos os processos são: eliminação da matéria-prima imprópria para processamento, lavagem, trituração, prensagem e pasteurização ou esterilização. Pode haver outras etapas como clarificação, concentração, uso de enzimas, branqueamento e acidificação. Maiores detalhes sobre o processamento industrial de suco de cenoura podem ser obtidos em Suzuki, et al. (2002). Nos domicílios e em laboratórios, o suco de cenoura normalmente é obtido com o auxílio de um processador de suco do tipo centrífuga.

No Brasil, praticamente ainda não há venda de suco de cenoura industrial pronto para beber. Nos Estados Unidos, Europa e China este é um produto comercializado juntamente com sucos de frutas nos supermercados e em outros pontos de venda. A Figura 1 ilustra alguns exemplos de suco de cenoura encontrados a venda no mercado local da cidade de Lleida, Espanha em agosto de 2007. O volume das embalagens varia de 0,5 a 1 L e os preços de 0,90 Euros para os néctares e 2,45 Euros para o suco puro de cenoura.



Figura 1 – Néctar de cenoura, néctar de cenoura com laranja e limão, suco de cenoura tradicional, suco de cenoura orgânico encontrado a venda no mercado local da cidade de Lleida/Espanha.

O rendimento da extração do suco de cenoura pode chegar a quase 75% (Sharma et al., 2005) e o suco concentrado de cenoura é negociado, no mercado Europeu, a valores superiores ao suco concentrado de maçã (Figura 2). A demanda por suco de cenoura concentrado vem aumentando rapidamente nos últimos anos na China (Wang et al., 2006). A produção de suco de cenoura ou da mistura de suco de cenoura com suco de laranja poderia ser uma alternativa para propiciar uma maior diversificação da produção e venda de sucos no Brasil. No caso de mistura, Torregrosa et al. (2006) sugerem a seguinte proporção: 20% de suco de cenoura e 80% de suco de laranja. Ainda segundo estes autores, a combinação de suco de cenoura com laranja melhora a aceitação do produto em relação ao suco de cenoura puro e se torna muito nutritivo, pois a cenoura é rica em betacaroteno e a laranja em vitamina C.

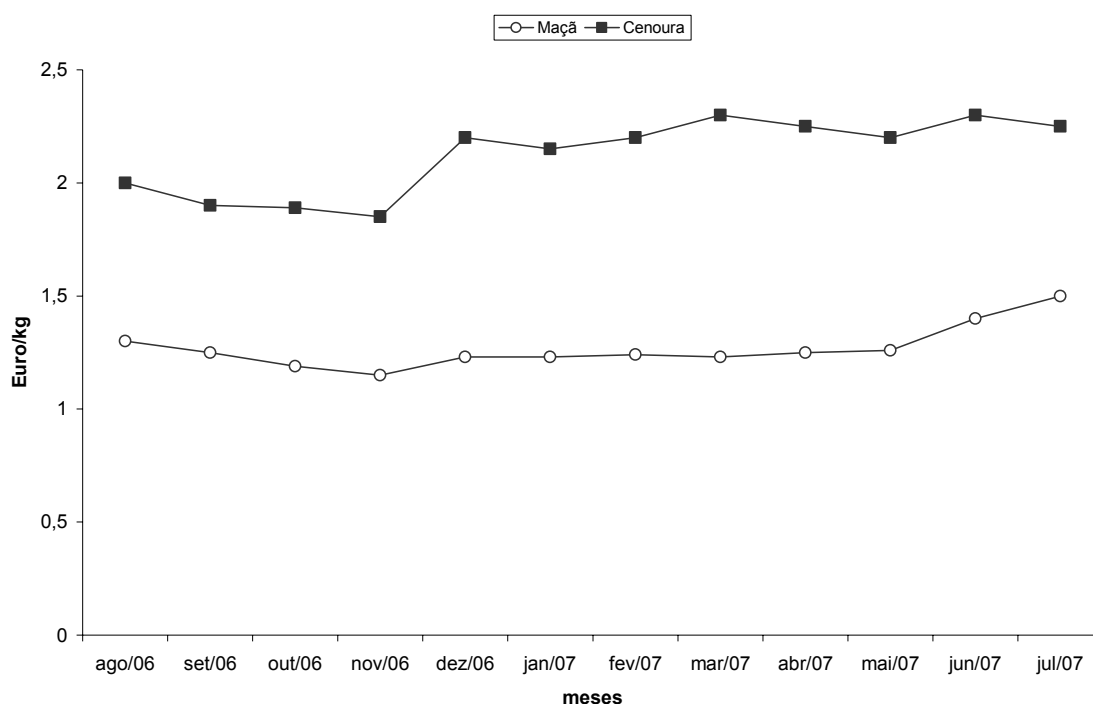


Figura 2 – Média do preço (€/kg) do suco concentrado de cenoura (65°Brix) e suco concentrado de maçã (70 °Brix) vendido a granel no mercado Europeu.

Fonte: Adaptado de Anônimo, 2007.

O suco de cenoura é um produto de baixa acidez exigindo assim muita atenção em seu processamento e comercialização, pois como tal, ele é um produto susceptível ao desenvolvimento do Clostridium botulinum. A ocorrência de botulismo é rara, mas é uma doença grave podendo ser fatal. Ela é causada pela toxina botulínica. Entre os meses de setembro e outubro de 2006 houve quatro casos de intoxicação botulínica nos EUA e duas no Canadá, todas relacionadas ao consumo de suco de cenoura refrigerado e enlatado. Estes sucos foram pasteurizados e rotulados com: manter refrigerado. FDA suspeita que estes produtos foram mantidos, durante o transporte ou pelos consumidores, em temperaturas superiores às de refrigeração. O regulamento do FDA para sucos de baixa acidez recomenda um maior controle do Clostridium botulinum inclusive para sucos de cenoura. Isto pode ser obtido reduzindo o valor do pH para valores igual ou inferiores a 4,5 (FDA, 2007).

1.1.7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNIELSEN GLOBAL SERVICE. Os produtos mais Quentes do Mercado. **Relatório Executivo de Notícias**. Dezembro de 2004. Disponível em: <http://www.acnielsen.com.br/tendencias_analises/estudos_especiais.htm>. Acesso em: 05/01/2006.

Anônimo. Market Price Report. **Fruit Processing**, July/august, p. 238-242. 2007.

Barrett Reina, L. D. C. **Conservação Pós-colheita de Tomate (Lycopersicon esculentum Mill) da Cultivar Gigante kada Submetido a Choque e Armazenado com Filme de PVC**. Lavras: ESAL, 1990. 114 p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura de lavras, 1990.

Brasil, Portaria n ° 33, de 13 de janeiro de 1998. Adota valores como níveis de IDR para as vitaminas, minerais e proteínas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 16 Jan. 1998. Disponível em: < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 25/11/2007.

Britton, G. Carotenoids. In: **Natural foods colorants**, Hendry, G.F., Blackie, New York, p.141-148, 1992.

CEAGESP. Produtos: cenoura. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtos/produtos/cenoura>>. Acesso em: 05/11/2007.

Chitarra, M.I.F e Chitarra, A.B. **Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças**. Lavras: Editora UFLA. 785p. 2005.

Davies, J. N., and Hobson, G. E. The Constituent of Tomato Fruit- the Influence of Environment, Nutrition, and Genotype. **Critical Review of Food Science and Technology**. v. 15, p. 205–280, 1981.

EMBRAPA. Hortaliças minimamente processadas. **Embrapa informação Tecnológica**, Brasília, DF, 2003. 140 p.

Fachin, D.; Van Loey, A. M.; Ly Bguyen, B.; Verlente, I.; Hendrickx, E. Inactivation kinetics of Polygalacturonase in Tomato Juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 135–142, 2003.

FDA. **Guidance for Industry Refrigerated Carrot Juice and Other Refrigerated Low-Acid Juices**. 2007. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/juicgu15.html> acesso em: 07/12/2007.

FAOSTAT. The Statistic Division. Online database 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/statistics/> Acesso em: 07/12/2007.

Howard, R. C; Braswell, D.; Heymann, H. Lee, Y.; Pike, L.M. Aselege, J. Sensory Attributes and Instrumental Analysis Relationships for Strained Processed Carrot Flavor. **Jornal of Food Science**, v. 60, p. 145-148, 1995.

Jaime, S. B. M.; Alves, R. M. V.; Segantini, E. et al. Estabilidade do Molho de Tomate Em Diferentes Embalagens de Consumo. **Ciência. Tecnologia. Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 193-199, 1998.

Lafuente, M.T.; Lopez, G.; cantwell, M.; Yang, S.F. Factors Influencing Ethilene-induced Isocumarin Formation and Increased Respiration in Carrots. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 121, n. 3, p. 537-542, 1996.

Layrisse, M.; García-Casal, M. N.; Solano, L. The role of vitamin A on the inhibitor of nonheme iron absorption: Preliminary results. **Jornal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, n.2, p. 61-67, 1997.

Lima, K.S.C.; Lima, A.L.S.; Freitas, A.L.S.; Alves, P.F.M.; Coneglian, R.C.C.; Godoy, R.L.O.; Daaa-Srurr, A.U.O. Efeito de Baixas Doses de Irradiação nos Carotenóides Majoritários em Cenouras Prontas Para o Consumo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.2, p. 183-193, 2004.

Mabey, R. Flora Britannica. London: Chatto and Windus, 298 p. 1997.

Morales-BlancaS, E.F.; Chandia, V.E.; Cisneros-Zevallos, L. Thermal Inactivation kinetics of Peroxidase and Lipoxygenase from Broccoli, Green Asparagus and Carrots. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 146-154, 2002.

Oszmianski, J.; Górski, M. Improvement of Carotenoids Content and Colour in Carrot Juice Concentrate. **Fruit Processing**, v. 2, p. 70-73, 2002.

Padula, M. **Goiaba (Psidium Guajava L.) Cultivar IAC-4: Carotenóides e Outras Propriedades, Mudanças Durante o Processamento e Estocagem**. Campinas, SP, 1983.

106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1983.

Pimentel, F.A. **Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de sementes de urucum (*Bixa orellana* L)**. Viçosa, MG, 1995. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

Rodrigues, R. S. M.; Penteado, M. V. C. Carotenóides com atividade Pró-vitamínica A em hortaliças folhosas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 39-52, 1989.

Sharma, A.K.; Sarkar, B.C.; Sharma, H.K. Optimization of Enzymatic Process Parameters for Increased Juice Yield from Carrot (*Daucus carota* L.) Using Response Surface Methodology. **European Food Research Technology**, v. 221, p. 106-112, 2005.

Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Begliomini, A. L.; Montedoro, G. Relationships Between the Volatile Compounds Evaluated by Solid Phase Micro Extraction and the Thermal Treatment of Tomato Juice: Optimization of the Blanching Parameters. **Food Chemistry**, v.71, p. 407-415, 2000.

Simon, W. Carrot flavor: Effects of Genotype, Growing Conditions, Storage and Processing. In **Evaluation of Quality of Fruits and Vegetables**, E. Eskin (ed.) p. 315-328 AVI publishing co., Westport, CT. 1985.

Soysal, Ç.; Söylemez Z. Effect of High Hydrostatic Pressure and Temperature on Carrot Peroxidase Inactivation. **European Food Research Technology**, v. 218, p. 152-156, 2004.

Stahl, W. e Sies H. Lycopene: A Biologically Important Carotenoids For Humans? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, p. 1-9, 1996.

Suzuki, Y.; Sugimoto, A.; Kakuda, T.; Ikegawa, Y. **Manufacturing Process of Carrot Juice**. Patente número 6340489. Janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.patentgenius.com/patent/6340489.html>. Acesso em: 07/12/2007.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). **Composição da Cenoura Crua e Cozida**. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela> (acesso em: 13/11/2007).

Talcott, S.T.; Howard, L.R. Chemical and Sensory Quality of Processed Carrot Puree as Influenced by Stress-Induced Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural chemistry**, v. 47, p. 1362-1366, 1999.

Tikler, J. H.; Bohm, F.; Schalch, W.; Truscott, T. G. Dietary Carotenoids Protect Human Cells From Damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 26, p. 283-285, 1994.

Torregrosa, F.; Esteve, M.J.; Frígola, A.; Cortés, C. Ascorbic Acid Stability During Refrigerated Storage of Orange-Carrot Juice Treated by High Pulsed Electric Field and Comparison with Pasteurized Juice. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 339-345, 2006.

USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 14 (Julho 2001). Disponível em: <http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=2411>. Acesso em: 20/11/2007.

Vieira, J.V.; Pessoa, H.B.S.V.; Makishima, N. Cultivo da cenoura (*Daucus carota L.*) **Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças**, n.13, Brasília, dezembro de 1997.

Wang, H.Y.; Hu, X.S.; Wu, J.H.; Zhang, Z.; Liao, X.J. Kinetic Analysis of Non-enzymatic Browning in Carrot Juice Concentrate During Storage. **European Food Research Technology**, v. 223, p. 282-289, 2006.

Witaker, J.R. Polyphenol Oxidase. In: Wong DWS (ed) Food enzyme: Structure and Mechanism. Chapman & Hall, New York, USA. p. 271-307. 1995.

1.2 - APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE ALTA INTENSIDADE NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS (ARTIGO DE REVISÃO)¹

1.2.1 - 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 de alta intensidade (CEPAI) se destaca como uma promissora tecnologia para substituir o tratamento térmico convencional. Este trabalho discorre sobre a aplicação dos CEPAI na indústria de alimentos. Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o tema abordando, desde aspectos históricos, equipamentos utilizados, efeito dos CEPAI nos microorganismos, efeito dos CEPAI na inativação enzimática, efeito dos CEPAI 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.

¹ Publicado na revista CERES, v. 53, n. 308, p. 425-438. 2006

1.2.2 - 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

1.2.3 - 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 preparava 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 ele segue em busca de 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 (CEPAI) 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 CEPAI (Barsotti et al., 1999; Grah & Markl, 1996; Loaharanu, 1995; Mertens & Knorr, 1992). Por outro lado, os trabalhos sobre os efeitos dos CEPAI na inativação enzimática são em menor número (Yeom & Zhang, 2002).

O maior potencial para utilização dos CEPAI 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 CEPAI 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 catalisar 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 discorrer sobre os principais pontos desta tecnologia ressaltando desde aspectos históricos, equipamentos,

ação dos CEPAI nos microorganismos, nas enzimas, nas características sensoriais e nutricionais de produtos bem como de seus principais desafios e limitações.

1.2.4 - DEFINIÇÃO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA

O processamento de alimentos via aplicação de campos elétricos pulsados (CEPAI) 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 μ s) 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 (CEPAI) 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 (Dunn, 2002). Posteriormente vieram os trabalhos de Sale & Hamilton (1967) que foram os primeiros estudos sobre o mecanismo de ação dos CEPAI 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.

1.2.5 - EQUIPAMENTO PARA APLICAÇÃO DE CEPAI

A linha para processamento de alimentos via aplicação de campos elétricos pulsados (CEPAI) é composta por um sistema de geração de CEPAI, 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 3 ilustra um sistema de processamento via CEPAI.

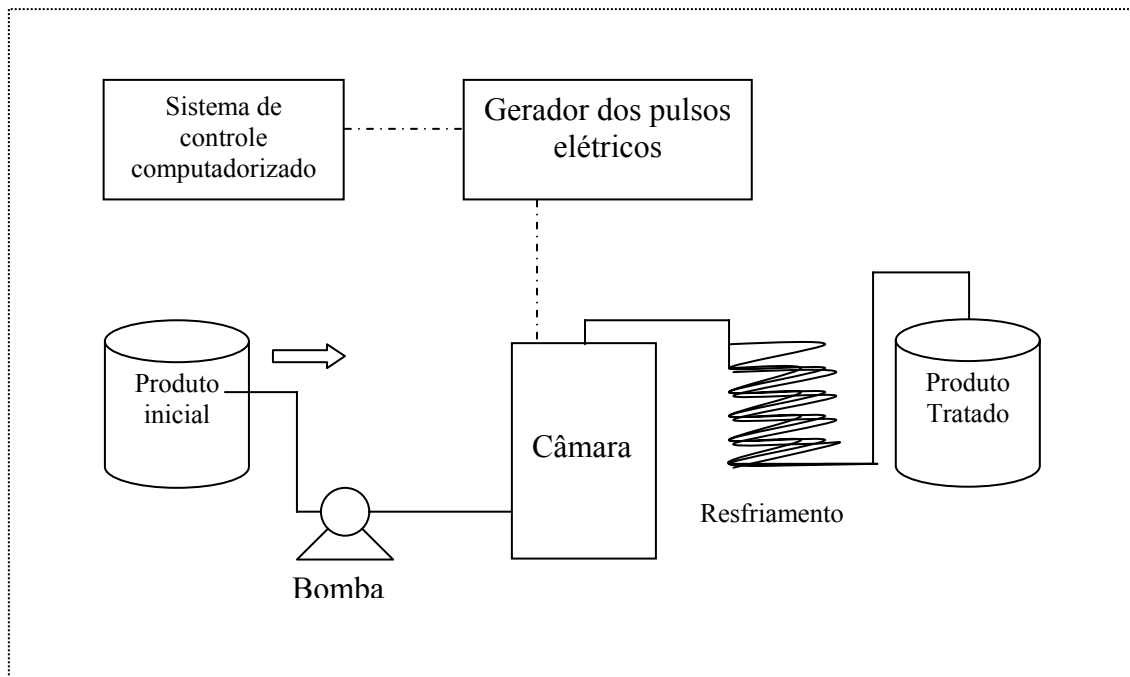


Figura 3 - Sistema de processamento por meio de aplicação de CEPAI

As câmaras de tratamento são os componentes mais importantes do sistema CEPAI, 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 CEPAL. 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 influencia das propriedades físicas dos alimentos líquidos para tratamento via CEPAI 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 CEPAI, 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 influencia sobre estas possíveis reações, sendo que aqueles fabricados com grafite, por exemplo, podem minimizá-las (Dunn, 2002).

Os laboratórios que hoje trabalham com CEPAI 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 CEPAI. 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 CEPAI (Dunn, 2002).

Vimos que é grande o número de variáveis que influenciam a eficiência do processamento via CEPAI. A Tabela 3 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 influencia e podem explicar possíveis resultados conflitantes encontrados na literatura.

Tabela 3 - Características dos sistemas aplicação de CEPAl

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)

1.2.6 - INFLUÊNCIA DA FORMA DOS PULSOS ELÉTRICOS APLICADOS

Utilizando capacitores, resistência e indutância em diferentes disposições é possível produzir pulsos elétricos cuja forma sejam 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 monopolares. A inversão brusca da orientação seria responsável por causar maior stress celular e, portanto, conferir maior eficiência (Jeyamkondan *et al.*, 1999).

1.2.7 - 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).

1.2.8 - FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA APLICAÇÃO DE CEPAL

Além do tipo de câmara e pulsos, há outros parâmetros que afetam a eficiência do tratamento via CEPAL. 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).

1.2.9 - 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 4) 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.

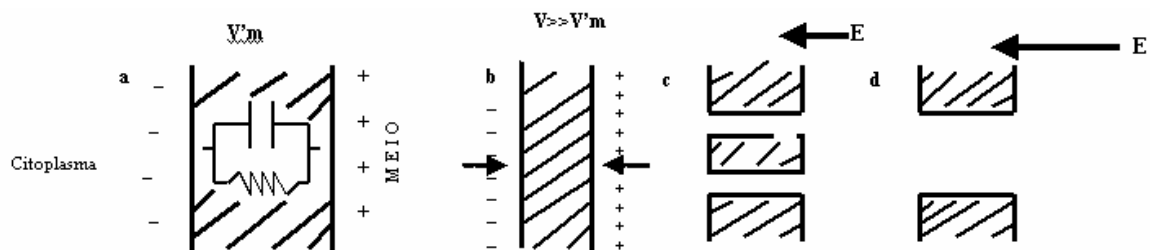


Figura 4 – Mecanismo de ruptura celular reversível e irreversível:

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 outra alternativa, ocorre na faixa de milissegundos a segundos. Mas o ponto de consenso entre os cientistas é de que o mecanismo de ação dos CEPAI 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 CEPAI. 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 CEPAI na inativação microbiana (Tabela 4). 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 4 – Efeitos da aplicação de campos elétricos pulsados em diferentes microorganismos

microorganismo	Meio	Campo (kV/cm)	Tempo* (μ s)	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) (Hülshager *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 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.

1.2.10 - EFEITO SOBRE OS ESPOROS

Apesar do crescente interesse pelos CEPAI, 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 CEPAI. É provável que a lisozima dissolva o revestimento dos esporos, tornando a célula passível de tratamento por CEPAI. Desta forma, mesmo não sendo possível inativar esporos com a ação isolada de CEPAI, 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 CEPAI. 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 CEPAI com temperatura moderada (60°C aproximadamente) e/ou ativação prévia dos esporos usando temperatura de 80°C por 10 minutos e/ou combinação de CEPAI com lisosima (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 CEPAI produziu bons resultados. A alta pressão promoveu a germinação dos esporos que foram inativados em seguida via aplicação de CEPAI.

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.

1.2.11 - EFEITO SOBRE AS ENZIMAS

Para que o CEPAI possa ser usado em substituição ao emprego de calor, é necessário que ele seja eficiente tanto na inativação de microorganismos como também na inativação enzimática. Parece haver consenso entre os pesquisadores sobre o mecanismo de inativação microbiana. Contudo, o número de estudos sobre inativação enzimática via emprego do CEPAI 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 inativar 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 CEPAI, 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 CEPAI 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 CEPAI sobre atividade enzimática se intensificou novamente (Yeom & Zhang, 2002).

Ainda não há um consenso sobre qual é o mecanismo de atuação dos CEPAI 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 CEPAI 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).

1.2.12 - 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; **A₀** 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 modelo de primeira ordem (Equação 4) 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 5.

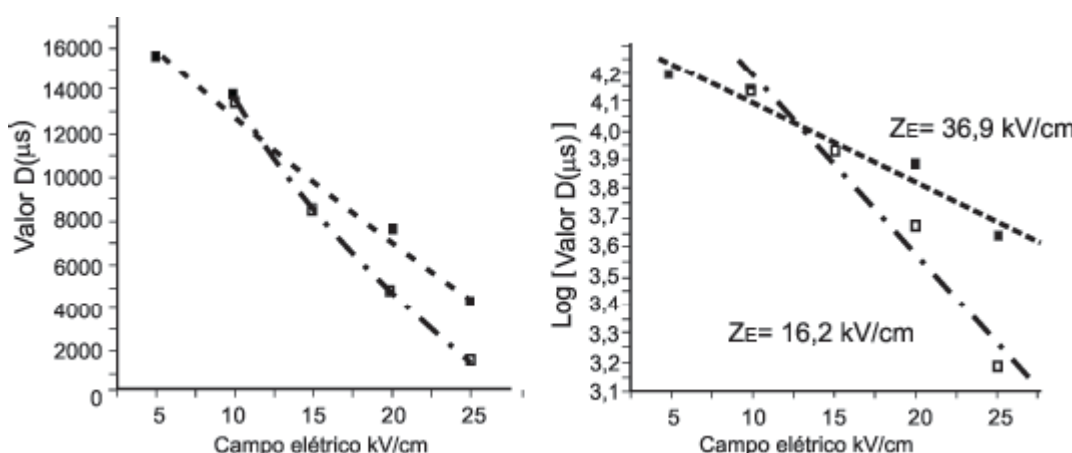


Figura 5 – Efeito da aplicação do CEPAI no valor D nas enzimas polifenoloxidase (■) e da peroxidase (□).

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 CEPAI 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, estabelecerem 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 CEPAL. 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 μ s a 25 kV/cm conseguiram reduzir a atividade da peroxidase em 32,3% e da polifenoloxidase em 76,2%. A Tabela 5 ilustra outros resultados obtidos para diferentes enzimas.

Tabela 5 – Efeito da aplicação de campos elétricos pulsados em diversas enzimas

Enzima	Meio utilizado	E (kV/cm)	Número de pulsos	Redução da atividade
Fosfatase	LAU	22	70	65%
alcalina	Leite (1,5% de gordura)	21,5	20	< 10%
	Leite (3% de gordura)	21,5	20	< 10%
	Tampão (pH 9,8)	40-80	30	\cong 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	\cong 30%
	Tampão fosfato	40-73,3	30-100	\cong 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).

1.2.13 - EFEITO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS ALIMENTOS

A maioria dos trabalhos sobre o emprego de CEPAI 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 CEPAI, sendo que os provadores atribuíram melhores notas para o suco processado pelo sistema CEPAI conforme Tabela 6. Ainda segundo estes autores, vários outros indicadores sensoriais (aparência, cor e textura) denotam a melhor aceitação do suco processado via sistema CEPAI.

Tabela 6 – Média dos escores obtidos para aceitação do suco de tomate processado via tratamento térmico e via CEPAI.

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

Fonte: Min *et al.* (2003)

Sucos cítricos tratados com CEPAI 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 CEPAI 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 μ s e 9% de perda quando o tempo foi de 480 μ s. As perdas de compostos voláteis com emprego de tratamento térmico (90°C/1 min) foram de 22%. O tratamento de 480 μ s 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 CEPAI foi atribuída ao sistema de vácuo feito na câmara de tratamento cujo objetivo é evitar o fenômeno de ruptura dielétrica no alimento.

1.2.14 - CONCLUSÃO

A aplicação de campos elétricos pulsados é um método promissor para substituir o tratamento térmico, com as vantagens de garantir melhor conservação 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 CEPAI 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. Constatase 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 CEPAI.

1.2.15 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Technology 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.
- García 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 Methyltransferase 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 Presión Hidrostática: Una Alternativa en el Procesamiento no Térmico de Alimentos. *Alimentaria* 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 *Bacillus 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 Engineering* 25: 261–291.
- Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1994) Engineering Aspects of PEF Pasteurization. *Journal of Food Engineering* 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.

CAPÍTULO 2 – METODOLOGIA GERAL

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de “Nuevas Tecnologias” e na planta-piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universitat de Lleida, situada na cidade de Lleida, na Espanha.

Para cumprir com os objetivos propostos, foram realizados alguns ensaios preliminares que juntamente com a revisão de literatura propiciaram o estabelecimento dos parâmetros e seus valores a serem utilizados. Após o estabelecimento de quais seriam as variáveis fixas e quais seriam as variáveis respostas, três experimentos foram planejados e conduzidos, sendo que os dois primeiros tiveram a finalidade de estabelecer o melhor tratamento para estabilização do suco de cenoura via aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI), e o terceiro experimento teve como propósito comparar o melhor tratamento estabilizado via aplicação dos CEPAI com dois tratamentos térmicos, tendo como referência o suco fresco de cenoura. Antes dos experimentos serem realizados, foram feitos ensaios adicionais para aferir a metodologia e também para propiciar o treinamento do correto manuseio de todos os equipamentos envolvidos no trabalho.

2.1 - OBTENÇÃO DO SUCO DE CENOURA

Para elaboração do suco, foram utilizadas cenouras (*Daucus carrota.*) da variedade Nanteza, compradas no comércio local da cidade de Lleida/Espanha. O suco de cenoura, utilizado em todos os tratamentos, foi processado de acordo com o descrito na Figura 1, sendo que na etapa de estabilização, alguns tratamentos foram submetidos a tratamento térmico convencional e outros à aplicação de campos elétricos pulsados.

As cenouras foram selecionadas eliminando aquelas que possuíam algum tipo de defeito, tais como: danos físicos, podridão etc. Em seguida, elas foram cuidadosamente lavadas em água corrente com auxílio de uma escova. Com o auxílio de uma faca de aço

inoxidável foram feitos cortes transversais e longitudinais a fim de adequar o tamanho da cenoura ao equipamento utilizado na extração do suco de cenoura.

A extração do suco de cenoura foi realizada em uma centrífuga extratora de sucos vegetais doméstica (Bifinett, KompernaB GmbH, Bochum, Germany), obtendo um rendimento de aproximadamente 50% (p/p) de suco em relação ao peso de cenoura.

Imediatamente após a extração, o pH do suco de cenoura foi determinado por leitura em pHmetro (2001 pH meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain). O valor de $\text{pH} = 6,20 \pm 0,02$, obtido no suco, foi ajustado pela adição de ácido cítrico concentrado (50% m/m), segundo prática industrial, para valor de $\text{pH} = 3,8$. Após a acidificação, o suco de cenoura foi filtrado por meio de um aparato provido de filtro de tecido fino, quitasato e uma bomba de vácuo.

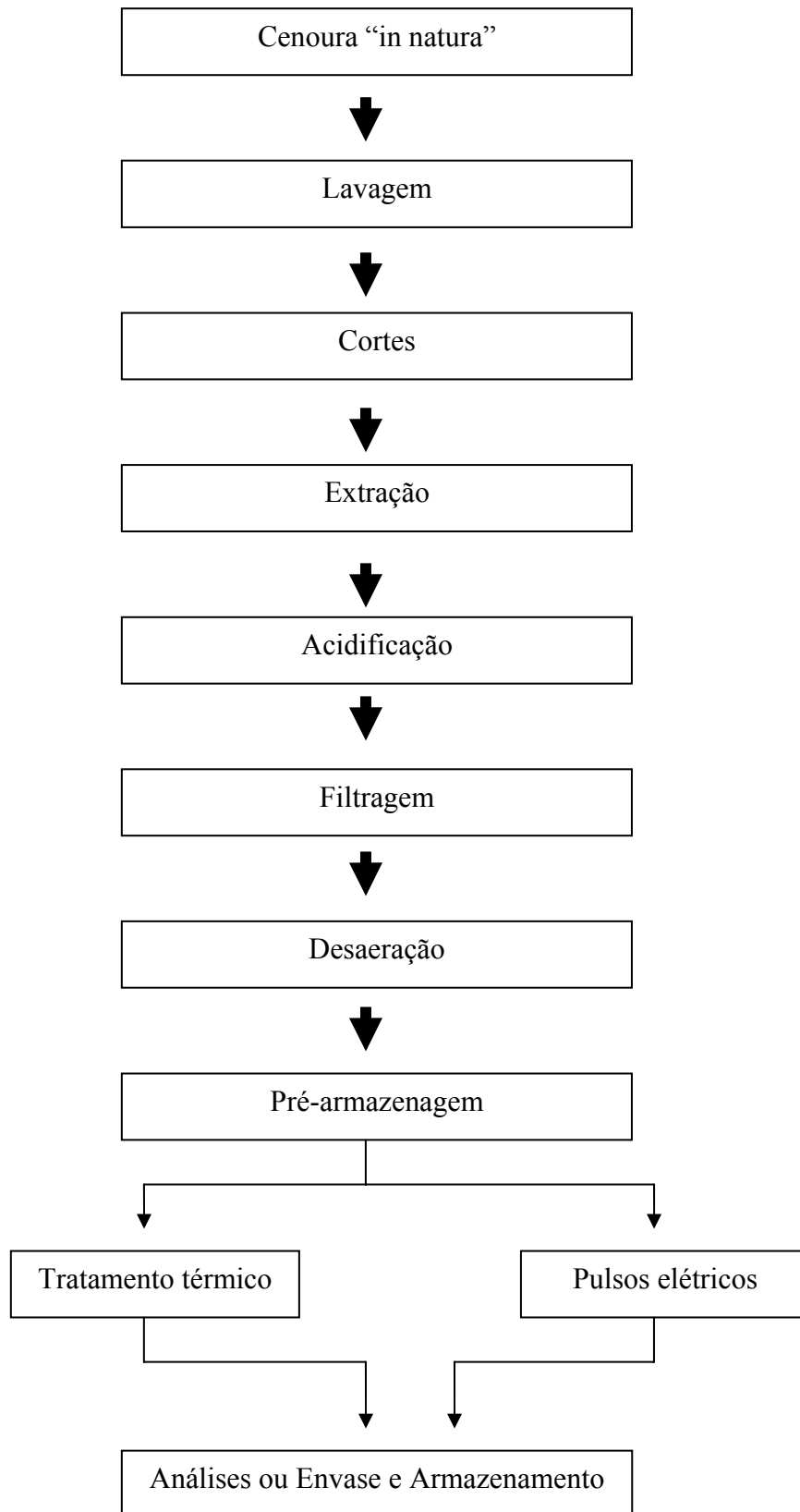


Figura 1 – Fluxograma do processamento do suco de cenoura

A última etapa de obtenção do suco de cenoura foi a desaeração realizada com a finalidade de se retirar todas as bolhas de ar presente no suco para minimizar a ocorrência do fenômeno de ruptura dielétrica na câmara de aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade durante o processamento. A desaeração foi realizada por meio de uma bomba de vácuo (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany) e, ao mesmo tempo, submetendo o suco a uma agitação com o auxílio de um agitador magnético, durante aproximadamente 5 minutos.

O suco assim obtido foi mantido refrigerado (4°C) por um período máximo de 2 horas até sua utilização posterior (aplicação dos tratamentos térmicos ou aplicação dos CEPAI).

2.2 - APLICAÇÃO DOS CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS

A aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI) foi realizada em um equipamento OSU-4F HIPEF unit (The Ohio State University, Columbus, Ohio) de fluxo contínuo (Figura 2). O sistema de aplicação dos CEPAI inclui gerador de alta voltagem, câmara de tratamento (Figura 3), uma bomba peristáltica (model 75210-25 Cole Palmer, Vernon Hills, III), banho de água e gelo para manter o produto tratado em temperaturas inferiores a 40°C, quatro termostatos para indicação correta da temperatura na entrada e saída da câmara de tratamento, painel de controle para introdução dos parâmetros de tratamento e osciloscópio para controle das propriedades elétricas do tratamento tais como: frequência, intensidade do campo elétrico aplicado e comprimento dos pulsos elétricos.

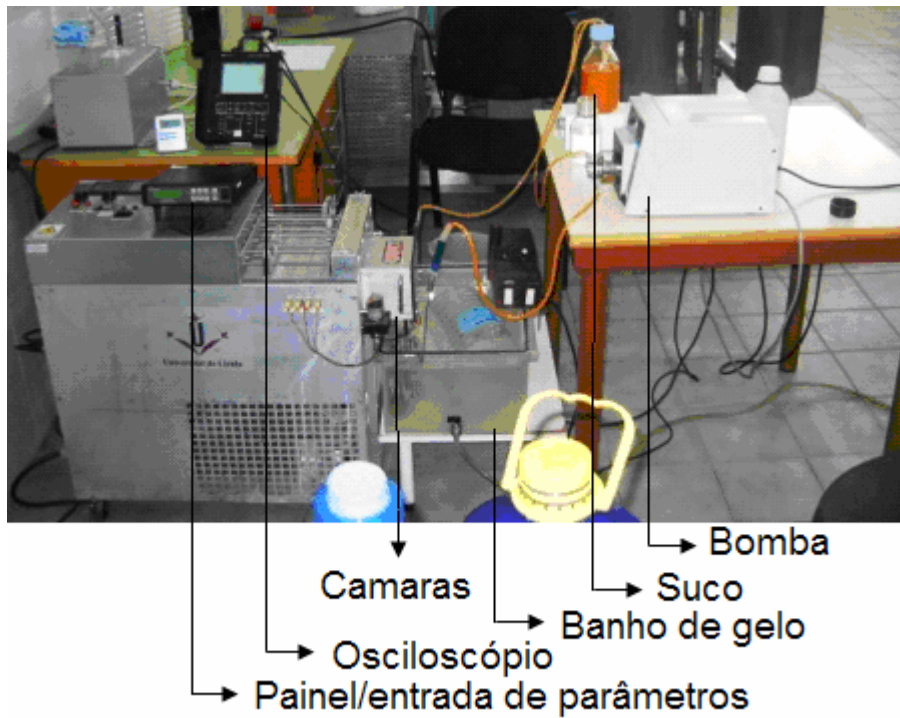


Figura 2 – Sistema de geração de campos elétricos pulsados de alta intensidade

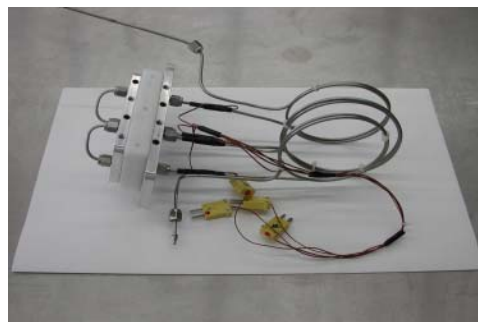


Figura 3 – Detalhes da câmara de tratamento

O sistema possui 8 câmaras de tratamentos em série que descarregam pulsos elétricos quadrados (Figura 4). Cada câmara possui um “gap” de distância de 0,29 cm e volume de 0,012 cm³.

Este equipamento é bastante flexível, com ele é possível variar a frequência de aplicação dos pulsos, o comprimento e a polaridade (mono e bipolar) dos pulsos elétricos, assim como a intensidade do campo elétrico que pode chegar a 35 kV/cm.

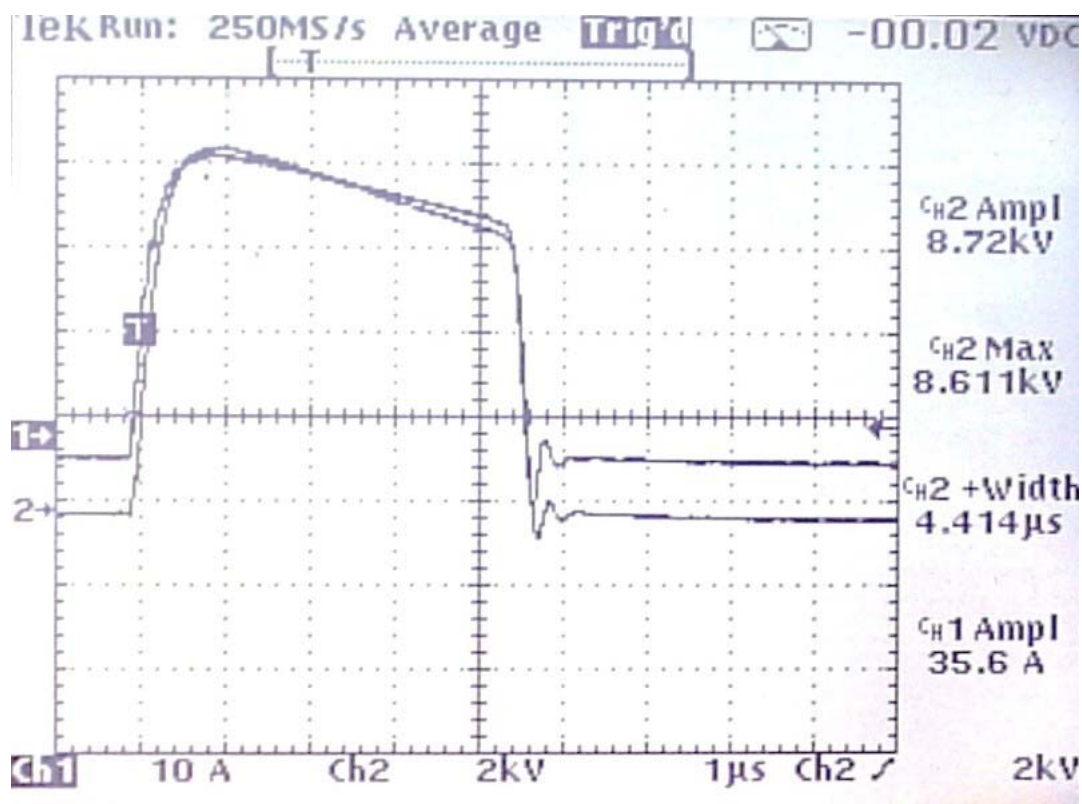


Figura 4 – Foto do monitor do osciloscópio onde se pode verificar a forma e o comprimento do pulso elétrico aplicado.

Após a utilização do sistema de aplicação dos CEPAI, o equipamento era submetido a uma limpeza e esterilização fazendo circular nele e de forma alternada, água destilada, solução de hidróxido de sódio, solução de hipoclorito de sódio, e solução alcoólica. Antes de nova utilização, o equipamento deveria ser preparado substituindo a solução alcoólica, nele contido, por água destilada e depois pelo suco a ser tratado. Outro cuidado a ser tomado era anotar o tempo de tratamento efetuado, pois a câmara de tratamento possui vida útil de 2.000 minutos, tendo que ser substituída após este período.

Embaixo do recipiente contendo o suco a ser tratado foi colocado um agitador magnético para manter o suco sob leve agitação garantindo, portanto, que ele permanecesse homogêneo durante os diversos tratamentos aplicados.

2.3 - TRATAMENTO TÉRMICO

O tratamento térmico foi utilizado para comparar a eficiência entre este e a aplicação dos CEPAI. O suco de cenoura foi submetido a dois tratamentos térmicos distintos: 90°C por 30 segundos e 90°C por 60 segundos. As amostras foram processadas em um trocador de calor tubular. Todos os detalhes estão descritos na metodologia dos capítulos 5 e 6.

2.4 - ANÁLISES LABORATORIAIS

Foram realizadas as seguintes análises laboratoriais:

- Atividade enzimática: polifenoloxidase, peroxidase, lipoxigenase e pectinesterase;
- Caracterização físico-química: pH, atividade de água, condutividade elétrica, acidez, sólidos solúveis;
- Compostos bioativos: vitamina C, β -caroteno e fenóis;
- Capacidade antioxidante;
- Viscosidade;
- Cor: sistema CIELAB, Browning index;
- Estabilidade quanto à turbidez do suco;
- Teste de aceitação.

A metodologia das análises, bem como o delineamento experimental estão descritos com detalhes nos artigos apresentados nos capítulos seguintes (3, 4, 5 e 6).

2.5 - DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS ESTUDADOS

O Equipamento utilizado para aplicação dos CEPAI é bastante flexível e permite trabalhar com vários parâmetros que influenciam a eficiência dos CEPAI, quais sejam: comprimento do pulso aplicado (μ s); frequência dos pulsos aplicados (Hz); polaridade do pulso (mono ou bipolar); intensidade do campo elétrico (kV/cm) e tempo de tratamento (μ s). O estabelecimento dos valores a serem utilizados para cada um desses parâmetros foi baseado na revisão de literatura e nos limites de trabalho do equipamento.

- Intensidade do campo elétrico aplicado: 20 kV/cm a 35 kV/cm, sendo que 35 kV/cm é o limite superior do equipamento e valores abaixo de 20 kV/cm foram pouco eficientes em outros trabalhos (Giner et al., 2005; Soliva-Fortuny et al., 2006;).
- Comprimento do pulso: 1 μ s a 7 μ s. Estes valores foram baseados nos trabalhos de (Elez-Martínez et al., 2006; Quintão-Teixeira et al., 2007).
- Frequência de aplicação dos pulsos: 50 Hz a 250 Hz. Valores abaixo de 50 Hz são pouco eficientes na inativação enzimática (Elez-Martínez et al., 2007; Quintão-Teixeira et al., 2007). Para determinar o limite superior (250 Hz), foram feitos ensaios preliminares. Nestes ensaios utilizando os valores mais altos de intensidade do campo elétrico (35 kV/cm) e comprimento máximo dos pulsos elétricos previamente estabelecidos (7 μ s), aumentou-se a frequência a partir de 50 Hz até valores limites, acima do qual ocorria o fenômeno indesejado de ruptura dielétrica. O valor máximo, com o qual se poderia trabalhar com segurança, foi de 250 Hz.
- Polaridade: foram utilizadas as duas existentes, mono e bipolar.
- Tempo de tratamento: 300 μ s a 2.000 μ s. Foram baseados nos trabalhos de Soliva-Fortuny et al., 2006; Elez-Martínez et al., 2006).

Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros e valores estabelecidos para serem utilizados nos dois primeiros experimentos com o objetivo de assegurar melhor estabilização do suco de cenoura.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados nos experimentos relacionados à aplicação de campo elétrico pulsado de alta intensidade para escolha do tratamento de melhor eficiência.

Parâmetros	Otimização ¹	Cinética de inativação ²
Intensidade do campo	35 kV/cm	20 – 35 kV/cm
Frequência de aplicação dos pulsos	50 – 250 Hz	200 Hz
Comprimento dos pulsos	1 – 7 μ s	6 μ s
Polaridade	Mono e bipolar	Bipolar
Tempo de tratamento	1.000 μ s	300 μ s – 2.000 μ s

1 – primeiro experimento descrito no item 2.6

2 – segundo experimento descrito no item 2.7

2.6 - OTIMIZAÇÃO

Montou-se um experimento para estabelecer a frequência de aplicação dos pulsos elétricos, o comprimento e a polaridade destes pulsos que garantam melhor eficiência na estabilização do suco de cenoura. Foram adotados como variáveis respostas, a cor e a inativação da enzima peroxidase. Realizou-se também a caracterização físico-química do suco de cenoura, a avaliação da atividade da polifenoloxidase e o estudo da condutividade elétrica do suco de cenoura em função da temperatura. Todos os detalhes e resultados deste experimento estão publicados no artigo intitulado “Inactivation of Oxidative Enzymes by High-Intensity Pulsed Electric Field for Retention of Color in Carrot Juice” e descrito em detalhes no Capítulo 3. Neste experimento foi mantido constante a intensidade do campo elétrico (35 kV/cm), bem como o tempo de tratamento (1.000 μ s). Os resultados (frequência, comprimento e polaridade do pulso que garantam melhor eficiência) deste experimento foram utilizados no experimento seguinte, conforme descrito no item 2.7.

2.7 - CINÉTICA DE INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

A partir dos dados de frequência, comprimento e polaridade de pulsos, definidos no experimento anterior (item 2.6), que garantem melhor eficiência na inativação enzimática (peroxidase), montou-se um experimento variando a intensidade do campo elétrico aplicado (20 a 35 kV/cm) assim como o tempo de tratamento (300 a 2.000 μ s). A variável resposta adotada foi a inativação da enzima peroxidase. De posse dos dados deste experimento foi possível aplicar modelos de inativação cinética em função da intensidade do campo elétrico aplicado, do tempo de tratamento e da energia fornecida. Todos os detalhes e resultados deste experimento estão descritos no artigo intitulado “Modeling the reduction of peroxidase activity in carrot juice by High-Intensity Pulsed Electric Fields” (capítulo 4).

2.8 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ESTABILIZAÇÃO

De posse dos resultados obtidos nos dois experimentos anteriores (itens 2.6 e 2.7), foi possível estabelecer os parâmetros que garantam melhor eficiência na estabilização do

suco de cenoura via aplicação dos CEPAI. Assim, ficou estabelecido que o tratamento de melhor eficiência na inativação da peroxidase e manutenção da cor é aquele cujos parâmetros são: Intensidade do campo elétrico de 35 kV/cm; frequência de 200 Hz; comprimento do pulso de 6 μ s aplicados no modo bipolar. A partir destas definições, montou-se um experimento para comparar a eficiência deste tratamento com dois tratamentos térmicos escolhidos com base na literatura e um tratamento “controle” (suco de cenoura fresco). A comparação foi feita no tempo zero, ou seja, logo após os tratamentos serem realizados e ao longo do tempo de estocagem do produto. As variáveis respostas foram: Inativação das enzimas peroxidase e pectinesterease; vitamina C; β -caroteno; capacidade antioxidante; cor; aroma; pH; sólidos solúveis; Viscosidade; fenóis totais; e estabilidade quanto à turbidez. Todos os detalhes e resultados deste experimento estão relatados nos artigos intitulados “Comparative Study on Cold Storage of Carrot Juice processed by High-Intensity Pulsed Electric Field or Heat Treatment” e “Comparação entre tratamento térmico e aplicação dos CEPAI em suco de Cenoura”. Ambos estão descritos em detalhes nos capítulos 5 e 6.

2.9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Elez-Martínez P, Aguiló-Aguayo I & Martín-Belloso O (2006) Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (1), 71-81.

Elez-Matínez P, Suárez-Recio M & Martín-Belloso O (2007) Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 78, 184-193.

Giner, J.; Grouberman, P.; Gimeno, V.; Martín, O. (2005). Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: Comparison of inactivation kinetic models. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 85, 1613-1621.

Quintão-Teixeira, L.J.; Aguiló-Aguayo, I.; Ramos, A.M.; Martín-Belloso, O. (2007). Inactivation of oxidative enzymes by high-intensity pulsed electric field for retention of color in carrot juice. *Food Bioprocess Technology*, DOI: 10.1007/s11947-007-0018-x.

Soliva-Fortuny, R.; Bendicho-Porta, S.; Martín-Belloso, O. (2006). Modeling high-intensity pulsed electric field inactivation of a lipase from *pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 89, 4096-4104.

CAPÍTULO 3 – INACTIVATION OF OXIDATIVE ENZYMES BY HIGH-INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD FOR RETENTION OF COLOR IN CARROT JUICE²

3.1 - ABSTRACT

The effects of high-intensity pulsed electric fields (HIPEF) on oxidative enzymes and color of fresh carrot juice were studied. A response surface methodology (RSM) was used to evaluate the effect of pulse polarity (mono or bipolar mode), pulse width (from 1 to 7 μ s), and pulse frequency (from 50 to 250 Hz) on color and peroxidase (POD) inactivation of carrot juice treated by HIPEF. The total treatment time and the electric field strength were set at 1000 μ s and 35 kV/cm respectively, at a temperature below 35° C. The physicochemical characteristics of carrot juice were measured. There was a linear relationship between electrical conductivity and temperature of the carrot juice. The results showed that HIPEF-treated carrot juice at 35 kV/cm for 1000 μ s applying 6 μ s pulse width at 200 Hz in bipolar mode led to 73.0% inactivation of POD. The color coordinates did not change significantly. Therefore, HIPEF was effective in POD inactivation and carrot juice color preservation.

Keywords: Color, Enzymatic inactivation, POD, PPO, HIPEF

3.2 - INTRODUCTION

² Publicado em 22/08/2007 na revista Food Bioprocess Technology.

DOI 10.1007/s11947-007-0018-x

Link para o artigo: <http://www.springerlink.com/content/92g32p312840455g/fulltext.pdf>

Nowadays, consumers look for foods with high nutritional value and low caloric content. Carrots are considered as a good source of carotenoids, fiber, vitamins, minerals, and bioactive compounds, and thus provide many benefits for the human health (Qin et al., 2005).

Carrots are processed as juice but also as canned, frozen, and dehydrated derivatives. Moreover, the commercial interest for the development of new products that combine different flavors and nutritional compositions lead to blending carrot juice with others, such as orange, apple, or lemon juice (Mawele et al., 1996; Lee and Yong 2001; Kim et al., 2001; Rodrigo et al., 2003; Fernandez-Garcia et al., 2001).

Traditionally, thermal treatments are used to stabilize and preserve vegetable juices. When the pH is lower than 4.6, juices are thermally processed for a few seconds at temperatures between 60 and 100 °C (Chen et al., 1993; Rivas et. al, 2006). However, this conventional treatment causes color alterations, flavor damages and nutrient losses (Mawele et al., 1996; Espachs-Barroso et al., 2003; Rivas et al., 2006). High-intensity pulsed electric field (HIPEF) technology has gained interest as an alternative to thermal processing. It offers advantages over heat application because it inactivates microorganisms and enzymes without changes to flavor and nutrients (Martín et al., 1997; Barsotti et. al, 2002; Ramos et al., 2006). Moreover, HIPEF is an adequate technology for liquid food, with a relevant potential to increase the shelf-life of fresh juices (Rodrigo et al., 2003; Selma et al., 2004; Rivas et al., 2006).

Among the characteristics of carrot juice, color is considered the major quality attribute that influences the consumer's choice. Thus, food scientists and industry pay much attention to color measurement. The typical orange color in carrots is related to its carotenoids content (Simon, 1985). Nevertheless, when it is processed to obtain juice and stored, undesirable browning reactions take place because of the enzymatic and nonenzymatic reactions that cause the condensation of phenolic acids, resulting in the discoloration of the product or melanoidins formation by maillard reaction (Talcott and Howard, 1999).

Polyphenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) and peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) are oxidative enzymes related to the browning of juices. PPO catalyses the hydroxylation of monophenols, leading to the formation of di-phenols, or oxidation of diphenols to form

quinones. Next, the condensation of quinones generates melanines, that are dark substances (Witaker, 1995). POD is generally considered as one of the most heat-stable enzymes and thus, long heat treatment times are needed to ensure POD inactivation. Hence, POD is commonly used as an indicator for the inactivation of endogenous enzymes and microorganism during heating (Soysal and Söylemez, 2005; Morales-Blancas et al., 2002; Ling and Lund, 1978). In fact, POD inactivation has been also used as a quality index of vegetable product when submitted to a non-thermal preservation process as high hydrostatic pressure or HIPEF (Soysal et al., 2004; Zhong et al., 2005a; Elez-Martínez et al., 2006). Nevertheless, there is no report available on the effects of HIPEF on peroxidase activity and color of carrot juice. Thus, the aim of this work was to establish HIPEF treatment conditions (pulse width, pulse polarity and pulse frequency) that assure greater POD inactivation and minimize color change in carrot juice.

3.3 - MATERIALS AND METHODS

3.3.1 - Juice Processing

Carrots (*Daucus carota*) were purchased in a local market (Lleida, Spain) washed with tap water and weighed. The carrot juice was extracted by a juice extractor (Bifinett, KompernaB GmbH, Bochum, Germany) and filtered through a muslin cloth by means of a vacuum pump (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany). The natural pH of carrot juice, determined with a pH meter (2001 pH meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), was 6.20 ± 0.02 and it was adjusted, according to the general commercial practice for carrot juice, to 3.8 with the addition of citric acid. Finally, carrot juice was degassed using a vacuum pump (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany) under agitation for 5 min and stored at 4 °C until treatment, which was carried out before 2 h as a maximum. The analysis of untreated and treated samples was made immediately after HIPEF processing.

3.3.2 - HIPEF Equipment

A continuous-flow HIPEF system was used to carry out this study. The system includes a high-voltage pulse generator, a treatment chamber, a peristaltic pump, a cooled water bath, a thermocouple attached in the treatment chamber for temperature control, and an oscilloscope for the control of the electrical properties such as voltage, frequency, and pulse width. The treatment device was an OSU-4F HIPEF unit (The Ohio State University, Columbus, Ohio) that discharges square-shaped pulses within eight collinear chambers.

Gap distance and volume in each chamber were 0.29 cm and 0.012 cm³, respectively. The carrot juice was cooled through a cooling water bath in such a way that the juice temperature never exceeded 35°C during the treatment. The flow rate of the process was adjusted to 60 mL/min and controlled by a variable speed pump (model 75210-25, Cole Palmer, Vernon Hills, III). The treatments consisted of applying an electric field strength (E) of 35 kV/cm for 1000 µs in monopolar or bipolar mode, at different pulse frequencies (from 50 to 250 Hz) and pulse widths (from 1 to 7 µs).

3.3.3 - Experimental Design and Statistical Analysis

A regression analysis was conducted to evaluate the electrical conductivity and temperature dependence using Statgraphics plus version 5.1 for Windows package (Statistical Graphics Co., Rockkille, MD, USA). All determinations were performed in triplicate.

Response surface methodology (RSM) was performed to observe the effect of different HIPEF processing parameters on the color and residual POD activity of carrot juice and to determine a region of the factor space in which operating HIPEF condition is optimum or satisfactory. A central composite design (CCD) with two numerical and one categorical factors, and faced-centered was proposed as experimental design (Myers and Montgomery, 2002). The numerical independent variables were pulse width (from 1 to 7 µs) and pulse frequency (from 50 to 250 Hz). The categorical variable was the polarity mode (monopolar or bipolar pulses). Values for each variable were chosen according to previous studies. In this experimental design, there were three coded factor levels: -1, 0 and +1, where -1 corresponds to the lowest level of each factor, +1 to the highest level, and 0 to the middle level. In the experimental design, 3 variables and 5 replicates at the center point for a total of 26 experiments was used. Each analysis was performed in duplicate, and the order of assays was randomized.

The effect of the variables was modeled using a second-order response function (Eq. 1).

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where y is the estimated response, β_0 is the constant, β_i , β_{ii} , and β_{ij} represent the coefficients of the linear, quadratic, and interactive effects, respectively; X_i , X_i^2 , and X_{ij} represent the linear, quadratic, and interactive effects of the independent variables, respectively. The non significant terms ($P \leq 0.05$) were deleted from the second-order polynomial model after calculating an analysis of variance (ANOVA), and then a new ANOVA was recalculated to obtain the coefficients for the final equation.

To perform the central composite analysis, Design Expert 6.0.1 software (Stat Ease Inc., Minneapolis, MN) was used in all analyses and generated plots. A 95% confidence interval was used for all procedures.

3.3.4 - Physicochemical Analysis

Physicochemical properties of nonprocessed carrot juice were determined to characterize the fresh juice.

The electrical conductivity of the carrot juice was measured with a conductivity meter (240 conductivimeter, Tesco GmbH & Co., Lenzkirch, Germany). These measurements were done in duplicate as a function of the temperature (from 5 to 65 °C) before and after lowering the pH. The soluble solids content was measured with a refractometer at 25°C (Atajo RX-100 refractometer, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Total acidity was determined by means of a 0.1-N NaOH solution up to a pH of 8.1. The results were expressed as grams per 100 mL of citric acid.

3.3.5 - Color Evaluation

The color of carrot juice was measured at room temperature using a Macbeth Color-Eye 3,000 colorimeter controlled by a computer that calculated color coordinates from reflectance spectrum (Macbeth-Kollmorgen Inst Corp, Newburgh, NY, USA). This equipment was set up for illuminant D75 and 10° observer angle. The samples were placed in an optical glass tray, using the white plate of the colorimeter. L^* (lightness), a^* (green–red tonality) and b^* (blue–yellow tonality) values were recorded and hue angle [$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$] and chroma [$Ch^* = (a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$] were calculated.

3.3.6 - Browning Index

A Browning Index (BI) was measured following the method proposed by *Meydav* et al. (1997) with some modifications. BI is a way to look at the overall changes in the browning color. A portion of 10 mL of carrot juice was diluted 1:1 with ethyl alcohol and centrifuged at 5000 RPM for 20 min, following a filtration through whatman N° 42 filter paper, to obtain a fully clear extract. BI is expressed as absorbance at 420 nm.

3.3.7 - POD Activity Measurement

POD activity in carrot juice was measured using the method described by *Elez-Martínez* et al. (2006) with some modifications. All chemicals were purchased from Scharlab Chemie, SA (Barcelona, Spain). The enzyme extracts for the determination of POD activity were obtained by homogenization of 10 mL carrot juice with 10 mL 0.2 M sodium phosphate buffer (pH = 6.5). The homogenate was centrifuged (12500 RPM, 15 min) at 4°C (Centrifuge AVANTI™ J-25, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). The supernatant was filtered through a Whatman n° 1 paper and the resulting liquid constituted the enzymatic extract, which was used for the POD activity determination.

POD activity was assayed spectrophotometrically by placing 2.7 mL 0.05 M sodium phosphate buffer (pH = 6.5), 0.2 mL p-phenylenediamine of 0.25% (w/v) as H-donor, 0.1 mL hydrogen peroxide of 1.5% (v/v) as oxidant and 0.1 mL of enzymatic extract in a 1-cm path cuvette. The oxidation of p-phenylenediamine was measured at 509 nm at room temperature using a CECIL CE 2021 spectrophotometer (Cecil Instruments Ltd, Cambridge, UK). POD activity was determined by measuring the initial rate of the reaction, which was computed from the linear portion of the plotted curve.

One unit of POD activity was defined as an increase of 0.001 unit of absorbance at 509 nm per minute and per milliliter of enzymatic extract.

As a control, the POD activity was measured in the fresh carrot juice. This analytical measurement was done at the same time than the treated carrot juice. The percentage of residual POD activity (RA) was defined as indicated by Eq. 2.

$$RA = 100 \cdot \frac{A_t}{A_0} \quad (2)$$

where A_t and A_0 were the enzyme activities of the treated and untreated samples, respectively.

3.3.8 - PPO Activity Measurement

PPO activity in carrot juice was measured using the method described by Zhang et al. (2005) and Giner et al. (2002) with some modifications. All chemicals were purchased from Scharlab Chemie, SA (Barcelona, Spain). PPO assays were performed by a spectrophotometric procedure measuring the increase in absorbance at 410 nm at room temperature and determining the initial rate of quinone formation. The enzyme extracts were obtained by homogenization of 10 mL of carrot juice with 10 mL of McIlvaine buffer (pH = 6.5). This buffer contained 1 M NaCl (Riedel-de-Haën AG, Seelze, Germany) and 5% polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). The homogenate was centrifuged (12500 RPM, 15 min) at 4°C. The supernatant was filtered through a Whatman n° 1 paper and the resulting liquid constituted the enzymatic extract, which was used for the PPO activity determination.

The sample cuvette contained 3 mL of 0.05 M catechol (Sigma-Aldrich) and 0.1 mL of enzymatic extract. The change in absorbance were recorded every 5 s to 2 min and PPO activity was determined by measuring the rate of the reaction, which was computed from the linear portion of the plotted curve. One unit of PPO activity was defined as an increase of 0.001 unit of absorbance at 410 nm per minute and per milliliter of enzymatic extract.

3.4 - RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1 - Characterization and Electrical Conductivity Study

A physicochemical characterization was carried out to offer detailed information about the carrot juice used in this study, such as pH, soluble solids content, titrable acidity, browning index and color parameters (Table 1).

Table 1 - Physicochemical characteristic of the non-processed carrot juice ^a

Parameter	value
Soluble solids (°Brix)	8.21 ± 0.37
Natural pH	6.20 ± 0.02
Acidified pH	3.80 ± 0.02
Total acidity (g citric acid / 100 mL) ^b	0.99 ± 0.17
Color parameters	
L*	35.02 ± 0.95
a*	15.54 ± 0.64
b*	15.07 ± 0.64
h*	39.1 ± 3.6
ch*	21.6 ± 1.3
BI	0.16 ± 0.01

^a Mean ± standard deviation of five independent measurements

^b For acidified carrot juice

BI = Browning index

Liquid foods are mainly composed of water and nutrients like proteins, vitamins, fatty acids and minerals. These nutrients are, in general, electrical conductors. (Martín et al., 1994). The electrical conductivity is an important parameter that limits the HIPEF treatment conditions such as maximum electric field strength, pulse frequency, and pulse width that could be used without occurrence of a dielectric breakdown in the HIPEF treatment chamber (Martín et al., 1994).

Figure 1 shows the electrical conductivity of the carrot juice as a function of the temperature (from 5 to 65°C) at natural pH (6.20) and adjusted pH (3.8). The electrical carrot juice conductivity increased with the temperature. The results were modeled leading to Eq. 3 for natural pH and Eq. 4 for adjusted pH.

$$C_N = 4.77 + 0.24 * T \quad R^2 = 0.984 \quad (3)$$

$$C_A = 4.34 + 0.21 * T \quad R^2 = 0.983 \quad (4)$$

where C_N and C_A are the electrical conductivity (mS/cm) at natural and acidified pH respectively; T is the temperature (°C) of carrot juice.

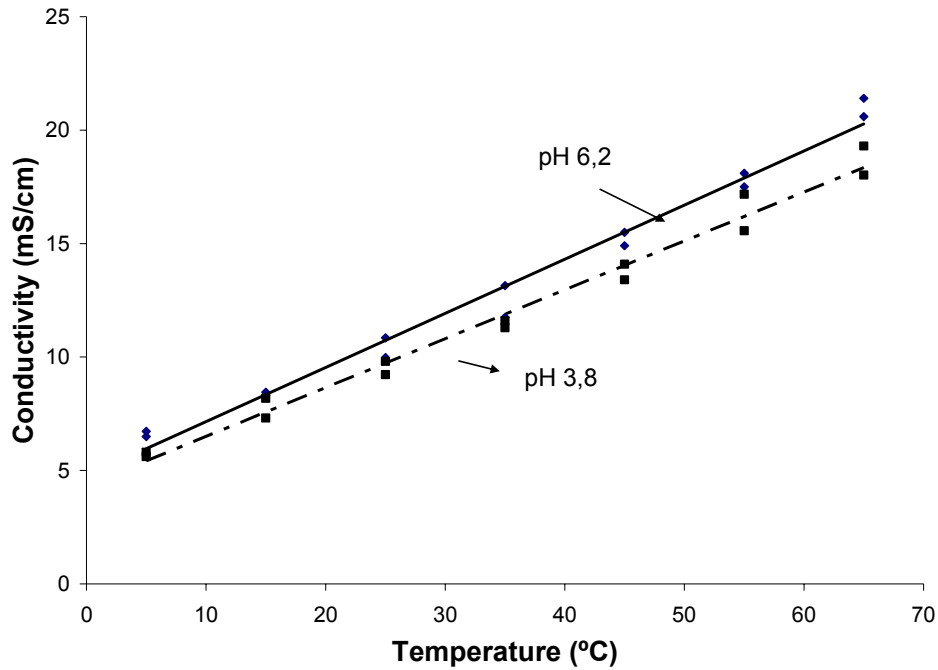


Fig. 1 - Electrical conductivity of carrot juice as a function of the temperature at natural pH (6.20 ± 0.02) and adjusted pH (pH = 3.8).

There was a statistically significant linear relationship between electrical conductivity and temperature at 99% confidence level and P-value for lack-of-fit in the ANOVA was higher than 0.10 in both equations 3 and 4, thus the linear model was adequate to fit the observed data.

These results were in accordance with those from Malek et al. (2006). These authors reported that the electrical conductivity of several fruit juices (apple, orange, and pineapple juice) and liquid egg products (whole egg, yolk, and egg white) increased linearly with temperature, ranging from 5 to 55°C.

The electrical conductivity of the carrot juice with the adjusted pH was slightly lower than that of carrot juice at its natural pH. This phenomenon could be attributed to the ability of citric acid to form complexes with metallic ions. The present work provides a description of the electrical conductivity of carrot juice as a function of temperature from 5 to 65°C. However, the POD inactivation by HIPEF presented in this study was conducted at a temperature below 35°C.

The electrical conductivity of carrot juice obtained at 4°C (5.20 mS/cm) was very similar to that observed by Zhong et al. (2005b) at 4°C in the same product (5.10 mS/cm). In orange juice, Elez-Martínez et al. (2006) reported a conductivity of 4.39 mS/cm at room temperature; Mosqueda-Melgar et al. (2007) pointed an electrical conductivity of 5.23 and 3.66 mS/cm at room temperature for melon juice and watermelon juice, respectively. When the electrical conductivity of the carrot juice was measured at 25°C, an electrical conductivity of 9.72 mS/cm was obtained which is a high value. Milk also has a high electrical conductivity of 6.98 mS/cm at a temperature of 25°C (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2006). Thus, among the liquid foods reported in literature related to HIPEF treatment, carrot juice and milk had the highest electrical conductivity. The differences founded among the products are related to the distinct composition of the food studied.

3.4.2 - Effect of HIPEF Treatment on POD Activity

To study the HIPEF effect on carrot juice POD inactivation, a response surface design was performed. The process variables were pulse frequency, pulse width and pulse polarity, keeping constant the electric field strength at 35 kV/cm and the treatment time at 1000 μ s. The temperature during HIPEF treatments was kept below 35°C. Table 2 shows the RA of POD that remained after applying different combinations of HIPEF variables. HIPEF treatment at 35 kV/cm, 50 Hz, and 1- μ s pulse width caused few POD inactivation; 99.3% and 96.2% RA of POD remained for monopolar and bipolar modes, respectively. The maximum POD inactivation (25.4% RA) was accomplished with the application of 4- μ s pulse width at 150 Hz in bipolar mode.

Table 2 - Central composite response surface design and residual POD in carrot juice under different HIPEF treatment conditions.

Assay number ^b	Coded variables ^c			Uncoded variables			Response
	X ₁	X ₂	X ₃	Pulse width (μs)	Frequency (Hz)	Polarity	Residual POD (%)
1	-1	-1	-1	1	50	mono	99,3
2	1	-1	-1	7	50	mono	82,1
3	-1	1	-1	1	250	mono	88,2
4	1	1	-1	7	250	mono	58,0
5	-1	0	-1	1	150	mono	82,1
6	1	0	-1	7	150	mono	50,5
7	0	-1	-1	4	50	mono	76,9
8	0	1	-1	4	250	mono	61,3
9	0	0	-1	4	150	mono	59,1
10	0	0	-1	4	150	mono	54,9
11	0	0	-1	4	150	mono	56,3
12	0	0	-1	4	150	mono	57,3
13	0	0	-1	4	150	mono	53,6
14	-1	-1	1	1	50	bi	96,2
15	1	-1	1	7	50	bi	61,7
16	-1	1	1	1	250	bi	71,1
17	1	1	1	7	250	bi	41,4
18	-1	0	1	1	150	bi	64,5
19	1	0	1	7	150	bi	30,7
20	0	-1	1	4	50	bi	62,7
21	0	1	1	4	250	bi	32,5
22	0	0	1	4	150	bi	25,4
23	0	0	1	4	150	bi	26,2
24	0	0	1	4	150	bi	30,4
25	0	0	1	4	150	bi	33,2
26	0	0	1	4	150	bi	33,2

^a HIPEF treatment was set at 35kV/cm and treatment total time of 1000 μs.

^b Assay number does not correspond to the order of processing.

^c X₁, pulse width; X₂, pulse frequency; X₃, pulse polarity.

The ANOVA revealed that the second-order model fitted well to the experimental data (Table 3). The determination coefficient, R², was 0.963, and the lack of fit was not significant, indicating that the model was sufficiently accurate for predicting the response. POD inactivation was affected by pulse polarity, linear and quadratic terms of pulse width and pulse frequency. There were no significant interaction terms among the variables studied.

Table 3 - ANOVA calculated after deleting the non significant terms (P< 0.05) for the response surface quadratic model of residual POD in carrot juice treated of different HIPEF conditions.

Source ^a	Mean square	F-value	Prob > F
Model	2247.94	105.40	< 0.0001 ^b
τ	2607.21	122.25	< 0.0001 ^b
f	1331.83	62.45	< 0.0001 ^b
P	2811.33	131.82	< 0.0001 ^b
τ ²	1270.15	59.56	< 0.0001 ^b
f ²	1511.85	70.89	< 0.0001 ^b
Lack of fit	29.38	3.18	0.0547 ^c
Pure error	9.25		
Corrected total	466.64		
Standard deviation	4.62	R ²	0.963
Mean	57.28	Adjusted R ²	0.952
Coefficient of variation	8.06		

^a τ, pulse width; f, frequency; P, polarity

^b Significant influence in effectiveness at 95% confidence interval

^c There is no significant influence in effectiveness at 95% confidence interval

Considering that pulse polarity is a categorical variable, the residual POD activity (RA-POD_M) on carrot juice obtained by HIPEF treatment using monopolar pulses could be fitted through Eq 5, and, in the case of bipolar pulses, the RA-POD_B could be modeled by Eq 6.

$$\text{RA-POD}_M = 152.686 - 18.392.\tau - 0.601.f + 1.684.\tau^2 + 1.654 \times 10^{-3}.f^2 \quad (5)$$

$$\text{RA-POD}_B = 131.889 - 18.392.\tau - 0.601.f + 1.684.\tau^2 + 1.654 \times 10^{-3}.f^2 \quad (6)$$

where RA-POD_M and RA-POD_B are the residual activity of POD (%) in mono and bipolar mode respectively, τ is the pulse width (μs) and f is the pulse frequency (Hz).

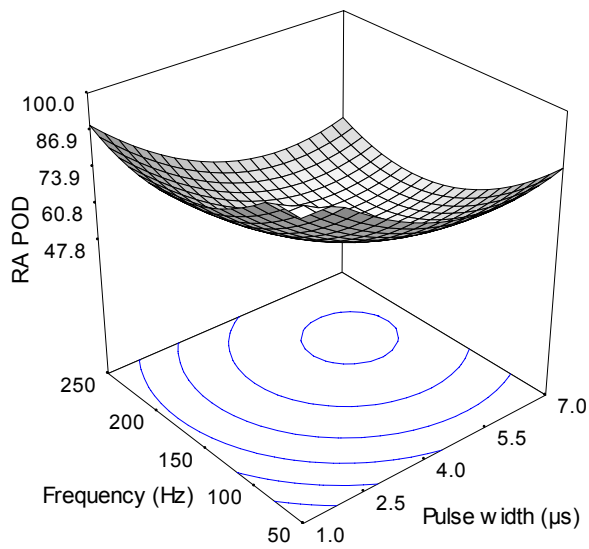
Among HIPEF processing parameters, pulse polarity was one of the most influential factors (P < 0.0001) in POD inactivation (Table 3). In comparison with the monopolar mode, bipolar pulses enhanced POD inhibition. As the intercept terms of equations 5 and 6 show, the RA of POD was lower when using bipolar than monopolar pulses.

The linear term of the pulse width (τ) was negative, which indicated that an increase on this parameter caused a decrease on RA of POD (Eqs 5 and 6). On the other hand, the positive value of the quadratic terms indicated that RA of carrot juice POD reached a minimum in the studied range. In the same way, the linear term of the pulse frequency (f) was negative and also showed a positive quadratic term f^2 . The results suggest that there are points or a region of pulse width and frequency that lead to minimal RA of carrot juice POD.

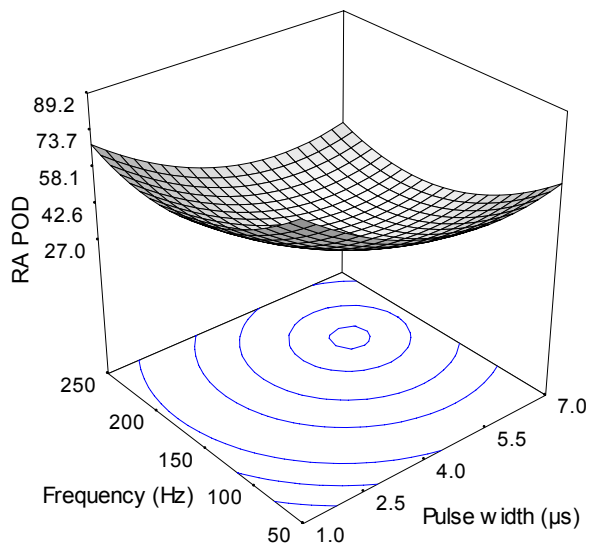
POD is a heat-stable enzyme and it requires temperatures above 75°C for its complete inactivation (Morales-Blancas et al., 2002). Soysal et al. (2004) achieved complete POD inactivation in carrot extract after 10 min at 75°C. Its heat resistancy is used as a quality index in thermal treatment and also, it is studied in the non-thermal treatments (Soysal et al., 2004; Elez-martínez et al., 2006).

The information about the effect of HIPEF treatment on POD is scarce and there are no reported studies in the literature about carrot juice POD inactivation by HIPEF.

The effect of the pulse width and pulse frequency on carrot juice POD activity can be observed in Fig. 2. RA of POD was affected by pulse polarity with the bipolar mode being more efficient than the monopolar mode (Table3). Using bipolar pulses, 27% RA of POD was observed, whereas applying monopolar pulses, 47.8% RA of POD was obtained. No information about the effect of pulse polarity on carrot POD inactivation by HIPEF was found in the literature. Nevertheless, several authors founded an influence of the polarity on the inactivation of enzymes from others sources. Bipolar pulses were more effective in peach PPO inactivation than monopolar pulses (Giner et al., 2002). Elez-Martínez et al. (2007) reported that bipolar pulses led to a greater pectinmethylesterase (PME) inactivation than those used in monopolar mode in orange juice. Elez-Martínez et al. (2006) concluded that POD inactivation in orange juice was influenced by pulse polarity depending on the HIPEF treatment conditions. Using 30 and 35 kV/cm at 1500 μ s, these authors reported that bipolar pulses were more effective than monopolar pulses, but when the electric field strength was lower than 30 kV/cm, the monopolar pulses led to a higher inactivation.



(a)



(b)

Fig. 2 - Residual activity of POD as a function of pulse width and pulse frequency for monopolar (a) and bipolar pulses (b) at different HIPEF conditions.

As shown in Fig. 2, there were regions of minimal residual POD activity. These regions were common for both polarity modes, and this space was defined by pulse widths between 5 and 6 μs and frequencies around 200 Hz. The best result was achieved when the bipolar mode was used in reducing the RA of POD up to 27%.

Carrot POD is also resistant to other non-thermal treatments such as high hydrostatic pressure (HHP). According to Soysal et al. (2004), RA of POD decreased to 44.74% at pressure up to 600 MPa at 25°C. When they combined HHP and moderated temperature at 600 MPa, these authors achieved 42.87% at 35°C and 8.77% at 45°C RA of POD, respectively.

Elez-Martínez et al. (2006) reduced the RA of orange POD to 9% at 35 kV/cm in bipolar mode. These authors achieved higher POD inactivation, applying a treatment time higher (1500 μ s) than those used in this study (1000 μ s). Yang and Zhang (2004) observed 81.9% RA of POD from soybean suspended in a phosphate buffer solution after a treatment of 34.9 kV/cm for 126 μ s using bipolar pulses, pulse width of 2 μ s and pulse frequency of 800 Hz. When soybean POD suspended in a phosphate buffer solution was treated for 60 μ s at 75 kV/cm with pulse width of 2 μ s at 20°C, 70% RA of POD was achieved (Ho et al., 1997).

The differences between the reported results in the literature and those observed in the present study could be because of the diverse HIPEF process conditions applied and the different products treated in each study.

3.4.3 - PPO Activity in Carrot Juice

Low PPO activity was found in carrot juice. The PPO activity in carrot juice with natural pH (6.20) was 0.002 units but no PPO activity was observed at pH 3.80. The pH modification was enough to inhibit the PPO activity in carrot juice. Therefore, the effect of HIPEF parameters on carrot PPO activity could not be evaluated in this study. The acidification of the media where PPO is suspended could inhibit, prevent, or minimize the PPO activity (Richardson and Hylop, 1985). Guerrero-Beltrán et al. (2005) reported that PPO activity decreased when the pH of a mango puree decreased. These authors reported 0.5% of residual PPO activity at pH 3.5. McEvily et al. (1992) pointed out that PPO was completely inhibited when the pH of fruit products was decreased to a pH below 3. The results founded in this work show that decreasing the pH to 3.8 was enough to inhibit carrot PPO activity.

3.4.4 - Effect of HIPEF Treatment on Color

Color is the main quality index of carrot juice, and the instrumental measurement of color provides an objective and consistent method of quality control. According to Table 4,

there were few changes in color coordinates as a function of the HIPEF treatment on carrot juice. Then, an ANOVA and a t-test were conducted to compare the color coordinates and BI. There were no significant differences ($p > 0.05$) for the color coordinates L^* , a^* , b^* , Ch^* and h^* between the fresh and treated juice, and thus the HIPEF treatment did not affect the carrot juice color. Because no significant differences were found between treated and untreated juice, the results can be presented as the mean values that were 35.54 ± 0.53 (L^*), 15.57 ± 0.57 (a^*), 15.45 ± 0.35 (b^*), 21.87 ± 0.63 (ch^*) and 37.81 ± 0.73 (h^*).

There are few works focused on color coordinates for carrot juice. Qin et al. (2005) reported color values for carrot juice processed by thermal treatment and stored. These authors provided values from 26.78 to 29.90 (L^*), 8.85 to 12.06 (a^*), 11.92 to 15.54 (b^*), 15.26 to 19.60 (ch^*) and 55.85 to 60.61 (h^*). Lima et al. (2001) observed values for irradiated carrot that changed in function of the irradiation dose from 41.09 to 48.04 (L^*), 19.80 to 25.56 (a^*), and 21.24 to 26.03 (b^*). The values of color coordinates are different as a function of the variety of carrot and the process conditions used in each carrot derivative, and for that reason, it was difficult to compare the results. It is important to remark that, in this work, there were no significant differences between untreated and treated carrot juice by HIPEF.

Browning appears to be a complex process, which involves several factors including substrate levels, enzyme activity, presence of ascorbic acid, and other inhibitors or promoters influencing the browning reaction. Zhang et al. (2005) suggest that the total phenolic content is a major contributing factor to the BI in carrot. This information was corroborated by Talcott and Howard (1999) who pointed out that the browning of processed carrot was primarily related to phenolic acid condensation with a minor contribution of carotenoids oxidation. Because there was no PPO activity in acidified carrot juice and carrot POD was partially inhibited, a major oxidation of phenolic acids occurred via autoxidation reactions; thus in this case, BI could be attributed mainly to non-enzymatic browning. When bipolar pulses were used, there were no significant differences ($p < 0.05$) on this parameter between fresh and treated juice. In this case, a mean BI of 0.18 ± 0.04 was found. In contrast, for monopolar pulses, there were significant differences ($p < 0.05$) between treated ($BI = 0.28 \pm 0.08$) and fresh carrot juice ($BI = 0.16 \pm 0.01$). Thus, monopolar pulses presented a higher BI than fresh carrot juice indicating that it was caused mainly by the nonenzymatic browning. In this work, the efficiency of HIPEF-treatment to avoid changes in carrot juice color has been demonstrated.

Table 4 - Response for color coordinates and browning index for different HIPEF^a treatments.

Assay number ^b	Color coordinates				Browning index	
	L	a	b	H	Ch	index
1	35,31 ± 0.13	16,19 ± 0.07	15,81 ± 0.11	32,12 ± 0.07	22,63 ± 0.02	0,168 ± 0.02
2	35,58 ± 0.04	15,18 ± 0.10	15,21 ± 0.08	38,13 ± 0.08	21,49 ± 0.04	0,448 ± 0.04
3	36,14 ± 0.04	15,90 ± 0.06	16,01 ± 0.05	36,64 ± 0.03	22,56 ± 0.03	0,214 ± 0.02
4	35,10 ± 0.08	14,15 ± 0.04	14,83 ± 0.06	37,40 ± 0.07	20,50 ± 0.02	0,417 ± 0.02
5	36,45 ± 0.08	15,66 ± 0.03	15,77 ± 0.02	33,05 ± 0.08	22,23 ± 0.04	0,316 ± 0.04
6	35,52 ± 0.09	15,84 ± 0.02	15,47 ± 0.02	36,30 ± 0.04	22,15 ± 0.03	0,290 ± 0.02
7	35,07 ± 0.04	14,97 ± 0.09	15,14 ± 0.02	37,44 ± 0.07	21,29 ± 0.05	0,304 ± 0.08
8	36,15 ± 0.07	16,22 ± 0.15	16,30 ± 0.08	36,20 ± 0.11	22,99 ± 0.03	0,181 ± 0.04
9	34,11 ± 0.02	14,61 ± 0.09	14,74 ± 0.02	38,74 ± 0.10	20,76 ± 0.03	0,188 ± 0.04
10	35,34 ± 0.03	14,17 ± 0.02	15,02 ± 0.05	38,21 ± 0.07	20,65 ± 0.05	0,190 ± 0.08
11	36,11 ± 0.08	15,88 ± 0.06	15,76 ± 0.01	37,64 ± 0.10	22,37 ± 0.02	0,317 ± 0.04
12	35,36 ± 0.17	14,88 ± 0.01	15,22 ± 0.02	38,70 ± 0.06	21,29 ± 0.06	0,278 ± 0.07
13	36,11 ± 0.10	15,56 ± 0.07	15,65 ± 0.03	38,03 ± 0.06	22,07 ± 0.01	0,280 ± 0.01
14	35,16 ± 0.13	15,72 ± 0.04	15,44 ± 0.01	34,94 ± 0.02	22,03 ± 0.18	0,189 ± 0.07
15	35,64 ± 0.02	14,79 ± 0.06	15,32 ± 0.04	33,90 ± 0.13	21,29 ± 0.03	0,161 ± 0.05
16	35,01 ± 0.02	15,24 ± 0.07	15,08 ± 0.07	33,97 ± 0.02	21,44 ± 0.17	0,176 ± 0.09
17	35,70 ± 0.08	15,78 ± 0.04	15,63 ± 0.06	36,40 ± 0.13	22,21 ± 0.03	0,321 ± 0.05
18	35,52 ± 0.05	15,55 ± 0.02	15,51 ± 0.01	35,92 ± 0.04	21,96 ± 0.08	0,175 ± 0.06
19	35,04 ± 0.04	14,92 ± 0.04	15,46 ± 0.05	36,30 ± 0.04	21,49 ± 0.07	0,243 ± 0.06
20	35,29 ± 0.06	15,84 ± 0.04	15,58 ± 0.06	36,10 ± 0.04	22,22 ± 0.07	0,212 ± 0.05
21	35,11 ± 0.03	15,54 ± 0.06	15,41 ± 0.05	36,20 ± 0.05	21,88 ± 0.13	0,187 ± 0.03
22	35,34 ± 0.05	15,71 ± 0.10	15,47 ± 0.05	37,02 ± 0.07	22,05 ± 0.04	0,179 ± 0.02
23	36,10 ± 0.03	15,56 ± 0.06	15,66 ± 0.06	35,93 ± 0.08	22,08 ± 0.03	0,198 ± 0.02
24	36,45 ± 0.05	15,66 ± 0.04	15,78 ± 0.02	37,53 ± 0.04	22,23 ± 0.05	0,217 ± 0.04
25	35,52 ± 0.06	14,52 ± 0.03	15,05 ± 0.02	36,22 ± 0.07	20,91 ± 0.03	0,191 ± 0.03
26	36,04 ± 0.07	15,35 ± 0.09	15,52 ± 0.08	33,90 ± 0.10	21,83 ± 0.05	0,217 ± 0.04

^a HIPEF treatment was set at 35kV/cm and treatment total time of 1000 μs.

^b Assay numbers correspond to the same treatments presented in Table 2

3.5 - CONCLUSIONS

HIPEF treatment at 35 kV/cm and 200 Hz for 1000 μs of total treatment time and 6-μs pulse width in bipolar mode were the appropriated conditions to reduce POD activity from carrot juice to a 27% RA. The carrot juice with a pH adjusted to 3.8 did not present PPO activity and there were no changes in the color coordinates caused by HIPEF treatments. There were also no significant differences on browning index between fresh and treated carrot juice when bipolar pulses were used, but when monopolar pulses were applied, a higher browning index was observed. Therefore, bipolar pulses were more

effective in POD inactivation than monopolar mode, without affecting the color juice. Results from this work demonstrate that HIPEF is a good method to inactivate carrot juice POD and preserve the color of carrot juice.

3.6 - ACKNOWLEDGMENTS

This study has been carried out with financial support from the Commission of the European Communities, Framework 6, Priority 5 'Food Quality and Safety', Integrated Project NovelQ FP6-CT-2006-015710.

We thank to “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES)/Brazil that awarded the author Luciano José Quintão Teixeira a pre-doctoral sandwich grant.

3.7 – REFERENCES

Barsotti L, Dumay E, Mu, TH, Fernández MD & Cheftel JC (2002) Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends in Food Science Technology*, 12, 136-144.

Chen CS, Shaw PE & Parish ME (1993) Orange and tangerine juices. In: Nagy S, Chen CS & Shaw PE (Eds.) *Fruit juice processing technology*, pp 110–165. Auburndale Agscience, Florida, USA.

Elez-Martínez P, Aguiló-Aguayo I & Martín-Belloso O (2006) Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (1), 71-81.

Elez-Martínez P, Suárez-Recio M & Martín-Belloso O (2007) Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 78, 184-193.

Espachs-Barroso AG, Barbosa-Cánovas GV & Martín-Belloso O (2003) Microbial and enzymatic changes in fruit juice by high intensity pulsed electric fields. *Food Reviews International*, 19, 253–273.

Fernandez-Garcia A, Butz P, Bogner A & Tauscher, B (2001) Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice

product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research & Technology*, 213 (5), 290-296.

Giner J, Ortega M, Mesegué M, Gimeno V, Barbosa-Cánovas GV & Martín, O (2002) Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *Journal of Food Sciences*, 67, 1467-1472.

Guerrero-Beltrán JA, Swanson BG & Barbosa-Cánovas GV (2005) Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie- Food Science and Technology*, 38(6), 625-630.

Ho SY, Mittal GS & Gross JD (1997) Effect of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Engineering*, 31, 69-84.

Kim YS, Park SJ, Cho YH & Park J (2001) Effects of Combined Treatments of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat on the Quality of Carrot Juice. *Journal of Food Science*, 66(9), 1355-1360.

Lee JH & Yong HC (2001) Changes in color parameters of clarified apple and carrot blend juice using response surface methodology. *Food Science & Biotechnology* 10(6), 673-676.

Lima KSC, Grossi JLS, Lima ALS & Alves PFM (2001) Efeito da irradiação ionizante na qualidade Pós-colheita de cenouras (*Daucus carota* L.) cv. Nantes. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 21 (2), 202-208.

Ling AC & Lund DB (1978) Determination kinetic parameters for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isozymes from thermal destruction curves. *Journal of Food Science*, 43, 1307-1310.

Malek A, Ngadi MO, Vijaya GSR & Nguyen DH (2006) electrical conductivities of liquid egg products and fruit juices exposed to high pulsed electric fields

International Journal of Food Properties, 9(3) 533-540.

Martín O, Zhang Q, Castro AJ, Barbosa-Cánovas GV & Swanson BG (1994) Review: Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos. *Microbiología e ingeniería del proceso. Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(34), 1-34.

Martín O, Qin BL, Chang FJ, Barbosa-Cánovas GV & Swanson BG (1997) Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20, 317-336.

Mawele S, Timothy D & Benoit G (1996) Water blanching effects on headspace volatiles and sensory attributes of carrots. *Journal of Food Science*, 61(6) 1191-1195.

McEvily AJ, Iyengar R & Otwell S (1992) Inhibition of enzymic browning in foods and beverages. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 32(3), 253-273.

Meydav S, Saguy I & Kopelman IJ (1997) Brown determination in citrus products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 25(3), 602-604.

Morales-Blancas EF, Chandia VE & Cisneros-Zevallos L (2002) Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science*, 67, 146-154.

Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM & Martín-Belloso O (2007) 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*, 117 (2), 192-200.

Myers RH & Montgomery DC (2002) *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, New York, USA.

Qin L, Xu S & Zhang W (2005) Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 505-512.

Ramos AM, Teixeira LJQ, Stringheta PC, Chaves JBP & Gomes JC (2006) Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. *Ceres*, 53(308), 425-438.

Richardson T & Hyslop DB (1985) *Enzymes*. In: Fennema OR (ed) *Food Chemistry* (2nd edition), pp 371–476. Marcel Dekker, USA.

Rivas A, Rodrigo D, Martínez A, Barbosa-Cánovas GV & Rodrigo M (2006) Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie- Food Science and Technology*, 39, 1163-1170.

Rodrigo D, Barbosa-Cánovas GV, Martínez A & Rodrigo M (2003) Pectin methyl esterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 66(12), 2336-2342.

Selma MV, Salmerón MC, Valero M & Fernández PS (2004) Control of *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli* by pulsed electric fields in MRS Broth, Nutrient Broth and orange-carrot juice. *Food Microbiology*, 21, 519-525.

Simon PW (1985) Carrot flavor: Effect of genotype, growing conditions, storage and processing. In: Eskin, E (ed) *Evaluation of Quality of fruits and vegetables*, pp 315-328. AVI Publishing Co., Westport, CT.

Sobrino-Lopez A & Martín-Belloso O (2006) Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection*, 60(2) 345-353.

Soysal Ç, Söylemez Z & Bozoglu F (2004) Effect of high hydrostatic pressure and temperature on carrot peroxidase inactivation. *European Food Research Technology*, 218, 152-156.

Soysal Ç & Söylemez Z (2005) Kinetics and inactivation of carrot Peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 68, 349-356.

Talcott ST & Howard LR (1999) Phenolic autoxidations is responsible for color degradation in processed carrot puree. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 47, 2109-2115.

Witaker JR (1995) Polyphenol oxidase. In: Wong DWS (ed) *Food enzyme: structure and mechanism*, 99 271-307. Chapman & Hall, New York, USA.

Yang RJ & Zhang QH (2004) Effect of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *Journal of Food Science*, 69, 241-248.

Zhang Q, Tan S, Mckay A & Yab G (2005) Carrot browning on simutated market shelf and during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 16-20.

Zhong K, Hu X, Zhao G, Chen F & Liao X (2005a) Inactivation and conformational change of horseradish peroxidase induced by pulsed electric field. *Food Chemistry*, 92(3), 473-479.

Zhong K, Chen F & Wan Z (2005b) Inactivation and kinetic model for the *Escherichia Coli* treated by a co-axial pulsed electric field. *European Food Technology*, 221, 752-758.

CAPÍTULO 4 – MODELING THE REDUCTION OF PEROXIDASE ACTIVITY IN CARROT JUICE BY HIGH-INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELDS

4.1- ABSTRACT

The inactivation kinetics of peroxidase (POD) from carrot juice treated by different High-intensity pulsed electric field (HIPEF) conditions was studied. Samples of carrot juice were subjected to electric field intensities ranging from 20 to 35 kV/cm for treatment time from 300 to 2000 μs using 6- μs bipolar pulses at 200 Hz. POD inhibition increased as field strength and treatment time increased, achieving a maximum inactivation of 93% when it was applied 35 kV/cm for 1500 or 2000 μs . Several models were studied and discussed to describe POD inactivation. A first-order fractional conversion model was the best to describe the residual activity of POD as a function of the time with good accuracy ($A_f = 1.039$ to 1.200 and $R^2 = 0.898$ to 0.983). Moreover, POD inactivation also could be predicted as a function of the energy density input by a first-order model ($A_f = 1.230$ and $R^2 = 0.885$).

KEY WORDS: Modeling, enzymatic inactivation, POD, HIPEF, carrot juice

4.2 - INTRODUCTION

The consumption of fruit and vegetable juices has experienced an increase in the last few years, particularly in developed countries because the presence of bioactive compounds in fruits and vegetables has recently been considered to be of importance in the prevention of chronic diseases, such as cardiovascular disease, various cancers, diabetes and neurological diseases (Kalt et al., 1999; Willet, 1994). Carrot is a rich source of bioactive compounds such as carotenoids and phenolic compounds (Howard et al., 1995).

In addition, in recent years, the interest of the food industry for fresh-like fruit and vegetable juices has increased by all over the world in the food market (Qin et al., 2005). Consumers demand for safe juices with fresh-like quality and stability (Rodrigo et al., 2003; Sampedro et al., 2006). Thus, carrot juice is natural and healthy and thus able to attempt the consumer's expectances.

Traditionally, thermal treatment is the most used method for preventing the adverse effects that enzymes and microorganisms bring on fruit and vegetable juices (Chen et al., 1993). On the other hand, a great amount of energy is transferred to the food during this process developing undesirable reactions that cause nutrients losses, color alterations and off-flavor development in some cases (Mawele et al., 1996; Espachs-Barroso et al., 2003; Rivas et al., 2006). Consequently, the food industry is looking for technologies less aggressive to the characteristics that identify the food as fresh, nutritive, and healthy. On this context high-intensity pulsed electric field (HIPEF) as a non-thermal technology, is gaining interest as an alternative to thermal processing. An advantage of this technology is that food quality characteristics, such as flavour and vitamins, are unaffected or only minimally altered by processing at room temperature (Martín et al., 1997; Barsotti et. al, 2002; Ramos et al., 2006; Elez-Martínez and Martín-Belloso, 2007).

Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) is commonly found in vegetables including carrot and it is often selected as a quality index, since the inactivation of this enzyme means an increased shelf-life of vegetable derivatives (Morales-Blancas et al., 2002). POD catalyses oxidation reactions using peroxides or oxygen as hydrogen acceptor. The hydrogen donors may be phenols, amines or other organic compounds and the products formed depend on the source of hydrogen donors (Soysal and Söylemez, 2005). Thereby, if POD is not inhibited, it will cause loss of color, flavor and nutrients in carrot juice.

The information available about the effect of HIPEF on enzymes shows different results depending on the treatment conditions, the matrix where the enzyme is held and the enzyme itself. When soybean POD suspended in a phosphate buffer solution was treated for 60 μ s at 75 kV/cm with pulse width of 2 μ s at 20 °C, a 30% of POD inactivation was achieved (Ho et al., 1997). On the other hand, Yang and Zhang (2004) observed only an 18.1% inactivation in POD from soybean suspended in a phosphate buffer solution after a treatment at 34.9 kV/cm for 126 μ s using bipolar pulses, a pulse width of 2 μ s and pulse frequency of 800 Hz. Elez-Martínez et al. (2006) reported a 91% inactivation in orange

POD activity using a total treatment time of 1500 μ s at 35 kV/cm, applying 4 μ s-bipolar pulses at 200 Hz.

So far, no kinetic studies have been conducted on carrot juice POD. Most kinetic works on POD enzyme inactivation by HIPEF have described a log-linear decrease throughout time. In addition, different empirical models as simple first-order, first-order fractional conversion, Weibull's model and Fermi's model, have been used with different degrees of success to describe enzyme inactivation by HIPEF (Giner et al., 2005; Elez-Martínez et al., 2006; Soliva-Fortuny et al., 2006).

The objectives of this work were to evaluate the reduction of carrot juice POD activity and to propose mathematical models that could properly relate changes in carrot juice POD activity with the different parameters involved in HIPEF treatments.

4.3 - MATERIALS AND METHODS

4.3.1 - Juice processing

Carrots (*Daucus carota*) were purchased in a local market (Lleida, Spain) washed with tap water and weighted. The carrot juice was extracted by a juice extractor (Bifinett, KompernaB GmbH, Bochum, Germany) and filtered through a muslin cloth by means of a vacuum pump (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany). The natural pH of carrot juice, determined with a pH meter (2001 pH meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), was 6.20 ± 0.02 and it was adjusted to 3.8 with the addition of citric acid, according to the general commercial practice for carrot juice. Finally, carrot juice was degassed using a vacuum pump (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany) under agitation during 5 minutes and stored at 4 °C until treatment, which was carried out within the next two hours. The fresh carrot juice had a solids soluble content of 8.21 ± 0.37 °Brix, determined with a refractometer at 25 °C (Atajo RX-100 refractometer, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan), and an electrical conductivity of 7.83 ± 0.02 mS/cm at 20 °C, measured with a conductivimeter (240 conductivimeter, Tesco GmbH & Co., Lenzkirch, Germany).

4.3.2 - HIPEF treatment

A continuous-flow HIPEF system was used to carry out this study. The system includes a high-voltage pulse generator, a high-voltage pulse treatment chamber, a peristaltic pump, a cooled water bath, a thermocouple attached to the chamber treatment for temperature control and an oscilloscope for controlling the electrical properties as voltage, frequency and pulse width. The treatment device was an OSU-4F HIPEF unit (The Ohio State University, Columbus, Ohio) that discharges square-shaped pulses within 8 collinear chambers. Gap distance and volume in each chamber were 0.29 cm and 0.012 cm³, respectively. A cooling coil was connected before and after each pair of chambers and submerged in an ice-water shaking bath. The temperature during HIPEF treatment was recorded and never exceeded 40 °C. The flow rate of the process was adjusted to 60 mL/min and controlled by a variable speed pump (model 75210-25, Cole Palmer, Vernon Hills, III).

Samples of carrot juice were treated at field strengths of 20, 25, 30 and 35 kV/cm for treatment time of 300, 600, 900, 1200, 1500 and 2000 µs using 6-µs square shaped bipolar pulses at 200 Hz. Pulse polarity and pulse frequency were selected from previous studies (Quintão-Teixeira, 2007).

The electrical energy density input (Q , J/m³) supplied to the samples was computed by the Equation 1 (Martín et al., 1994):

$$Q = \frac{V_0 \cdot I \cdot t}{v} \quad (1)$$

where V_0 is the peak voltage (V), I the intensity of the current (A), t the treatment time (s), and v the volume of all treatment chambers (m³).

4.3.3 - POD activity measurement

POD activity in carrot juice was measured using the method described by Elez-Martínez et al. (2006) with some modifications. All chemicals were purchased from Scharlab Chemie, SA (Barcelona, Spain). The enzyme extracts for determination of POD

activity were obtained by homogenization of 10 mL carrot juice with 10 mL 0.2 M sodium phosphate buffer (pH = 6.5). The homogenate was centrifuged (12500 RPM, 15 min) at 4 °C (Centrifuge AVANTI™ J-25, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). The supernatant was filtered through a Whatman n° 1 paper and the resulting liquid constituted the enzymatic extract, which was used for the POD activity determination.

POD activity was determined spectrophotometrically by placing 2.7 mL 0.05 M sodium phosphate buffer (pH = 6.5), 0.2 mL p-phenylenediamine of 0.25% (w/v) as H-donor, 0.1 mL hydrogen peroxide of 1.5% (v/v) as oxidant and 0.1 mL of enzymatic extract in a 1 cm path cuvette. The oxidation of p-phenylenediamine was measured at 509 nm at room temperature using a CECIL CE 2021 spectrophotometer (Cecil Instruments Ltd, Cambridge, UK). POD activity was determined by measuring the initial rate of the reaction, which was computed from the linear portion of the plotted curve. One unit of POD activity was defined as the increase of 0.001 of absorbance at 509 nm per minute per millilitre of the enzymatic extract.

POD activity was measured simultaneously in the fresh carrot juice to be used as a reference. The percentage of residual POD activity (RA) was defined as indicated in Equation (2).

$$RA = 100 \cdot \frac{A_t}{A_0} \quad (2)$$

where A_t and A_0 are the enzyme activities of the treated and untreated samples, respectively.

4.3.4 - Mathematical models

Mathematical models reported in the literature to describe enzyme inactivation by HIPEF as a function of electric field strength, total treatment time and energy input were tried to relate carrot juice POD activity inhibition with these process parameters.

Simple first-order models are usually used to describe enzyme kinetics (Equation 3). This model is appropriate when the enzyme exhibits an exponential decreasing trend as a function of treatment time (Soliva-Fortuny et al., 2006)

$$RA = RA_0 \cdot \exp(-k_i \cdot t) \quad (3)$$

where RA (%) is the residual activity of POD at total treatment time t (μ s), RA_0 is the initial enzyme activity (100%), k_i (s^{-1}) is the simple first-order kinetic constant. And t is the treatment time.

A first-order fractional conversion model can be used when a fraction of the enzyme is not destroyed after exposure to prolonged treatments (RA_∞). In this case, experimental values can fit using Equation 4.

Applying a neperian logarithmic (Equation 5), Equation 4, can be rearranged, resulting in Equation (6), so it is clear that when RA_∞ approaches 0, the equation turns into a simple first-order model (Equation 3).

$$RA = \frac{RA_0 - RA}{RA_0 - RA_\infty} \quad (4)$$

$$\ln\left(\frac{RA_0 - RA}{RA_0 - RA_\infty}\right) = -k_j \cdot t \quad (5)$$

$$RA = RA_\infty + (RA_0 - RA_\infty) \cdot \exp(-k_j \cdot t) \quad (6)$$

where k_j (s^{-1}) is the first-order fractional conversion kinetic constant.

Among the different empirical models that have been used, Weibull's distribution has recently been proposed to describe enzyme inactivation by HIPEF (Giner et al., 2005; Elez-Martínez et al., 2006; Soliva-Fortuny et al., 2006). The model is a 2-parameter function (Equation 7), where α is a scale factor and γ a shape parameter that indicates

concavity (tail-forming) or convexity (shoulder-forming) of the curve when it takes values below and above 1, respectively.

$$RA = RA_0 \cdot \exp\left[-\frac{t}{\alpha}\right]^\gamma \quad (7)$$

Derived from the Weibull distribution function parameters (α , γ), t_m (Equation 8) is defined as the mean time to inactivate the enzyme by HIPEF and can be used as a measurement of the resistance of the enzyme to HIPEF treatments:

$$t_m = \alpha \cdot \Gamma\left[1 + \frac{1}{\gamma}\right] \quad (8)$$

where Γ is the gamma function.

Fermi's model (Equation 9) has been also proposed to describe enzymatic inactivation by application of HIPEF as a non thermal treatment (Giner et al., 2000; Min et al., 2003; Elez-Martínez et al., 2006).

$$RA = \frac{RA_0}{1 + \exp\left(\frac{E - E_h}{K_F}\right)} \quad (9)$$

where E_h (kV/cm) is a critical level of field (E) where RA is 50%, and K_F parameter (kV/cm) indicates the steepness of the curve around E_h .

4.3.4 - Statistical analysis

Each processing condition was assayed in duplicate, as was enzyme activity determination. Therefore, the results were averages of 4 measurements. Experimental data

were fitted to: simple first-order, first-order fractional conversion, Weibull distribution function, and Fermi's model by nonlinear regression procedures using the Statgraphics Plus package, version 5.1 for windows (Statistical Graphics Co., Rock-ville, MD). Estimated parameters are given with their respective confidence intervals, product of the standard error of the estimates by Student's-t adjusted at the degrees of freedom. Fitting accuracy of the models was evaluated through the analysis of R² coefficients and the accuracy factor A_f. The accuracy factor was proposed by Ross (1996) to evaluate the performance of models. Equation 10 computes A_f from J experimental observations of RA and their respective J values predicted by the model of concern. Thus, the nearer the A_f value to the unit, the better the accuracy:

$$A_f = 10^{\frac{\sum_{j=1}^J \left| \log \left(\frac{\text{predicted}RA_j}{\text{observed}RA_j} \right) \right|}{J}} \quad j = 1, 2, 3, \dots J \quad (10)$$

4.4 - RESULTS AND DISCUSSION

POD activity of HIPEF-treated carrot juice decreased significantly ($p < 0.05$) as the electric field strength (E) and treatment time increased (Figure 1). A 7% of POD residual activity remained when carrot juice samples were processed at 35 kV/cm for 1500 or 2000 μs using 6- μs bipolar pulses at 200 Hz and without exceeding 40 °C. There was no significant difference ($p < 0.05$) in RA when carrot juice was treated with 1500 or 2000 μs of total treatment time. Therefore, HIPEF is an effective method to inhibit carrot POD activity.

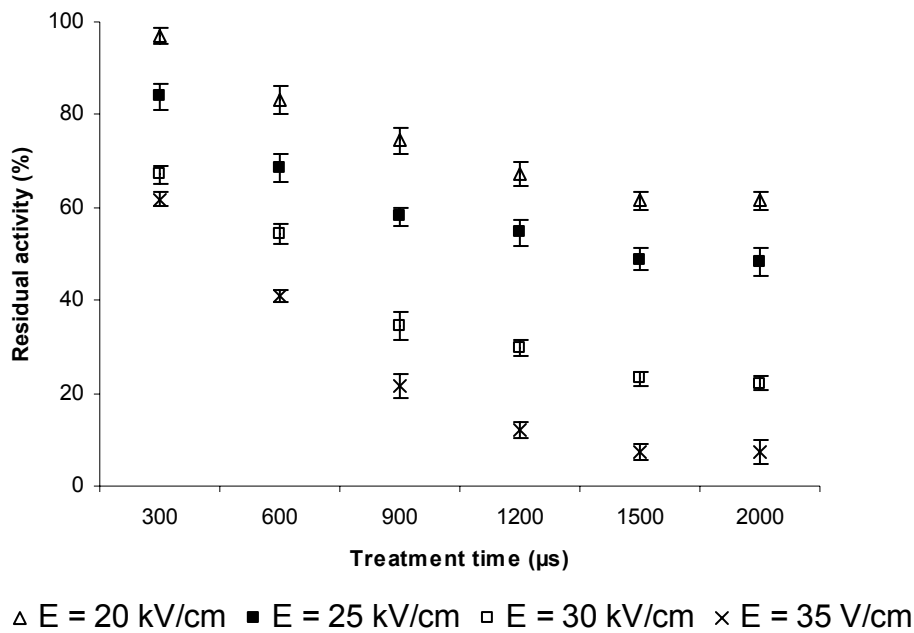


Figure 1 - Residual carrot juice POD activity as a function of HIPEF treatment time (mean ± SD). Treatments were performed at 200 Hz and 6-μs square pulses in bipolar mode. E = electric field strength.

Elez-Martínez et al. (2006) achieved a 100% of inactivation of orange juice POD using 35 kV/cm for 1500 μs with 4 μs pulse width at 200 Hz. On the other hand, Grahl and Markl (1996) observed a 25% decrease on POD activity in milk when processed at 21.5 kV/cm with 20 pulses. Ho et al. (1997) found only 18.1% soybean POD inactivation on the enzyme suspended in a phosphate buffer solution after a treatment of 34.9 kV/cm during 126 μs. Thus, the sensitivity of POD to HIPEF depends on the enzyme source and the process conditions. HIPEF may cause denaturation of the enzyme, probably by changing its conformational state, and thus avoiding the substrate from reaching fitting the active site, preventing the conversion of the substrates into products (Elez-Martínez et al., 2006). Oshima et al. (2007) pointed that HIPEF induced changes in six kinds of native enzymes, including POD. These authors suggest that these HIPEF-induced changes of enzyme activity were not due to peptide digestion and that HIPEF treatment could cause some conformational change, which result in increasing or decreasing in enzyme activity depend on of the strength electric field used. When the electrical field was lower than 13 kV/cm, the authors observed increasing on enzyme activity but for electric field higher than 13 kV/cm the enzyme activity decreased. Yeom et al. (1999) observed that papain was

irreversibly inactivated by HIPEF and that the activate site of papain, a cysteine residue, was not significantly oxidized by HIPEF. These authors pointed a breakdown of α -helix structure in HIPEF treated papain, with a significant reduction of papain activity, was observed. Zhong et al. (2007) reported that the inactivation of polyphenoloxidase and POD is due to changes in secondary structures. Thus the enzymatic inactivation by HIPEF treatment is related with change in the structure of the enzymes.

4.4.1 - First-Order Kinetic Models

The calculated rate inactivation constants (k_i and k_j) and regression parameters for simple first-order (Equation 3) and first-order fractional conversion (Equation 6) models to relate the RA of carrot juice with the treatment time for HIPEF treatments at different electric field intensities are shown in Table 1.

Table 1 - Simple first-order and first-order fractional conversion kinetic constants¹ for the inactivation of carrot juice POD treated by HIPEF at different field strengths.

E, kV/cm	simple first-order			Firs-order fractional conversion			
	$k_i \cdot 10^3 (\mu s^{-1})$	R^2	A_f	$k_j \cdot 10^3 (\mu s^{-1})$	$RA_\infty (\%)$	R^2	A_f
20	0.29 ± 0.01	0.887	1.049	0.56 ± 0.16	52.3 ± 2.3	0.898	1.039
25	0.48 ± 0.02	0.763	1.087	1.32 ± 0.11	42.6 ± 1.9	0.954	1.024
30	1.03 ± 0.03	0.896	1.158	1.54 ± 0.09	16.5 ± 1.9	0.963	1.060
35	1.61 ± 0.03	0.978	1.210	1.63 ± 0.06	1.4 ± 1.3	0.983	1.200

¹mean values \pm asymptotic Standard error. RA_∞ = residual activity after exposure to prolonged treatments; R^2 = determination coefficient adjusted for degrees of freedom; A_f = fitting accuracy of the models.

The fit performance of the simple first-order model was good with $R^2 = 0.887 - 0.978$ and accuracy factor (A_f) very close to 1, but, the fit performance of first-order fractional conversion was better ($R^2 = 0.898$ to 0.983) mainly for intermediate fields and A_f was closer to 1 than the simple first-order model (Table 1). k_i -values of the simple first-order model increased with field strength (Figure 2) following a trend that was well fitted to an exponential equation ($R^2 = 0.987$) in the range of the applied conditions (Equation 11).

$$k_i = [(3.3 \pm 1.2) \cdot 10^{-5}] \cdot \exp\{[(11.0 \pm 1.0) \cdot 10^{-2}] \cdot E\} \quad (11)$$

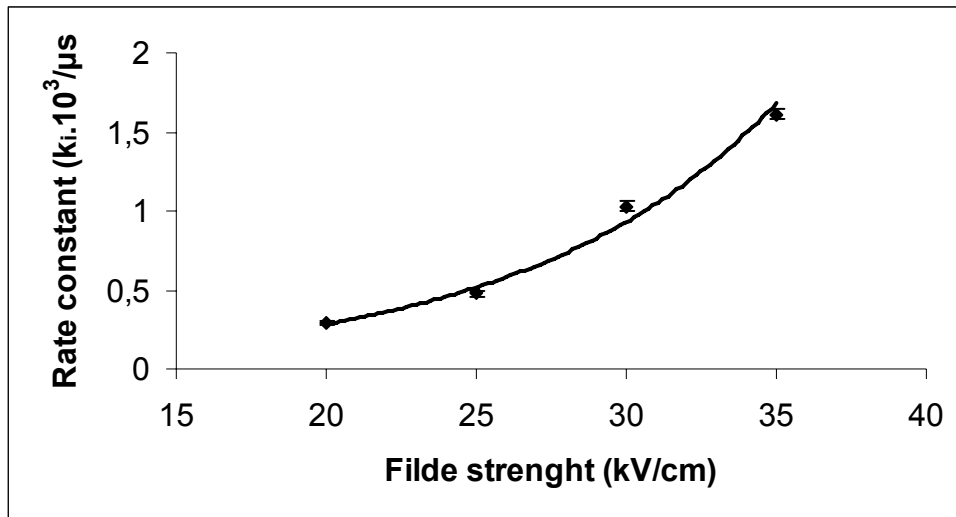


Figure 2 - Effect of electric field strength on the rate constant (k_i) estimated by a simple first-order model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of carrot juice POD. Experimental results are expressed as the mean \pm standard deviation.

In the same way, k_j -values estimated by nonlinear regression of the first-order fractional conversion model increased with field strength ($p < 0.05$) and took values from $0.53 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$ to $1.61 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$. The effects of E on k_j and RA_∞ are shown in Figure 3 and 4.

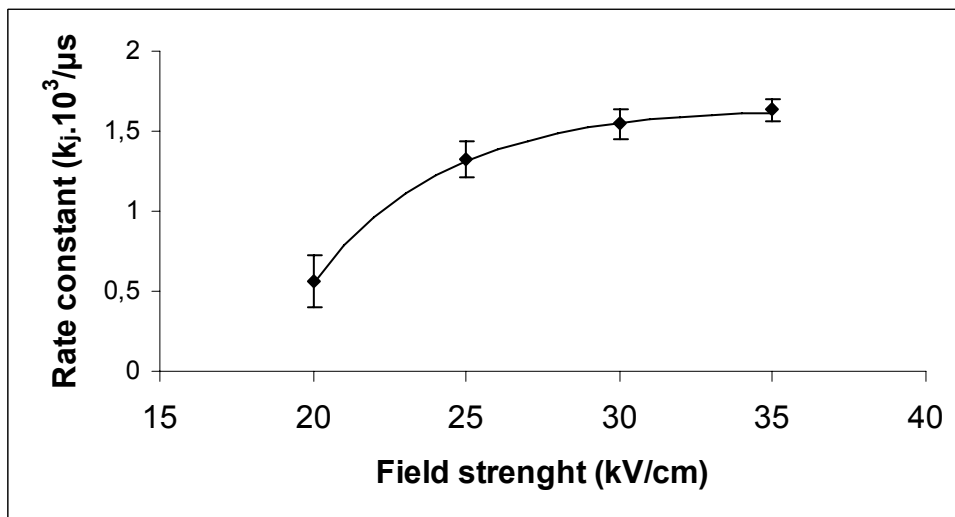


Figure 3 - Effect of electric field strength on the rate constant (k_j) estimated by a simple first-order model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of carrot juice POD. Experimental results are expressed as the mean \pm standard deviation.

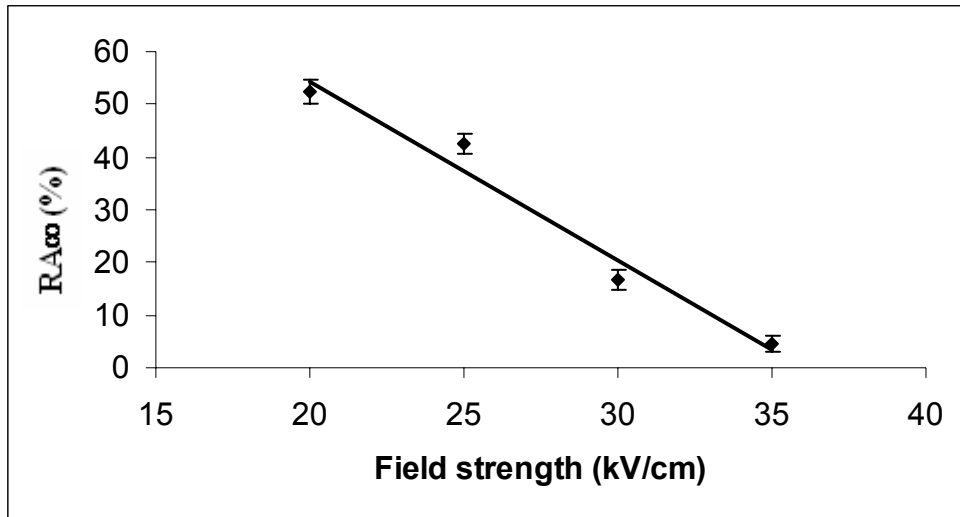


Figure 4 - Effect of electric field strength on stabilization value (RA_{∞}) estimated by a first-order fractional conversion model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of a carrot juice POD. Experimental results are expressed as the mean \pm standard deviation.

The electric field dependence of k_j could be described by a first-order fractional conversion equation ($R^2 = 0.999$; Equation 12). On the other hand, the residual activity after prolonged treatments (RA_{∞}) ranged from 1.4 to 52.3% and decreased linearly as field strength increased ($R^2 = 0.973$; Equation 13).

$$k_j = (1.65 \pm 0.17) \cdot 10^{-3} - (0.12 \pm 0.03) \cdot \exp[(-0.23 \pm 0.01) \cdot E] \quad (12)$$

$$RA_{\infty} = (122 \pm 12) - (3.38 \pm 0.43) \cdot E \quad (13)$$

Hence, substituting k_i values as a function of E (Equation 11) into the simple first-order model (Equation 3) a new equation where RA is a function dependent on both the field strength (E) and treatment time t (μs) was obtained (Equation 14). In a similar way, an Equation (15) can be obtained for calculate RA as a function of E replacing k_j values (Equation 12) in the first-order fractional conversion model (Equation 6).

$$RA = 100 \cdot \exp(-[(3.3 \pm 1.2) \cdot 10^{-5}] \cdot \exp\{[(11.0 \pm 1.0) \cdot 10^{-2}] \cdot E\} \cdot t) \quad (14), \text{ and}$$

$$RA = (122 \pm 12) - (3.38 \pm 0.43) \cdot E + \{100 - [(122 \pm 12) - (3.38 \pm 0.43) \cdot E]\} \exp\{-(1.65 \pm 0.17) \cdot 10^{-3} - (0.12 \pm 0.03) \cdot \exp[(-0.23 \pm 0.01) \cdot E]\} \cdot t \quad (15)$$

As can be deduced from Figure 4, total inactivation after prolonged treatment can be reached at high field strengths. Therefore, the minimal field strength necessary to achieve a 100% enzyme inactivation ($RA_{\infty} = 0$) can be calculated from Equation (13). An estimated value of 36.1 kV/cm is obtained through the resolution of the linear equation.

4.4.2 - Weibull distribution function

The estimated parameters (scale factor, α ; shape parameter, γ) and regression parameters of the fitted model for the Weibull distribution function proposed to describe the changes in carrot juice POD activity against the time at different field strengths (E) are displayed in Table 2.

Table 2 – Estimated parameters of the Weibull distribution function proposed to describe the inactivation of carrot juice POD by HIPEF treatments at different field strengths.

Field strength, kV/cm	α (μ s)	γ	R^2	A_f
20	3651 ± 402	0.93 ± 0.09	0.884	1.046
25	2684 ± 209	0.66 ± 0.05	0.907	1.049
30	976 ± 29	0.77 ± 0.04	0.949	1.096
35	623 ± 11	1.04 ± 0.03	0.980	1.211

Values \pm asymptotic standard error; R^2 = determination coefficient adjusted for degrees of freedom; A_f = fitting accuracy of the models.

The Weibull model fitted well the experimental data ($R^2 = 0.884$ to 0.980) and exhibited good accuracy ($A_f = 1.046$ to 1.211). Electric field dependence of α and γ ($p < 0.05$) is shown in Figure 5. The scale factor (α) decreased when the field strength

increased following a trend that could be described with good accuracy ($R^2 = 0.941$) using an exponential model (Equation 16). The dependency of the shape parameter on field strength fitted well ($R^2 = 0.974$) by a quadratic Equation (17).

$$\alpha = (33416 \pm 18701) \cdot \exp[(-0.10 \pm 0.02) \cdot E] \quad (16)$$

$$\gamma = (4.5 \pm 0.6) - (0.28 \pm 0.05) \cdot E + [(5.3 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}] E^2 \quad (17)$$

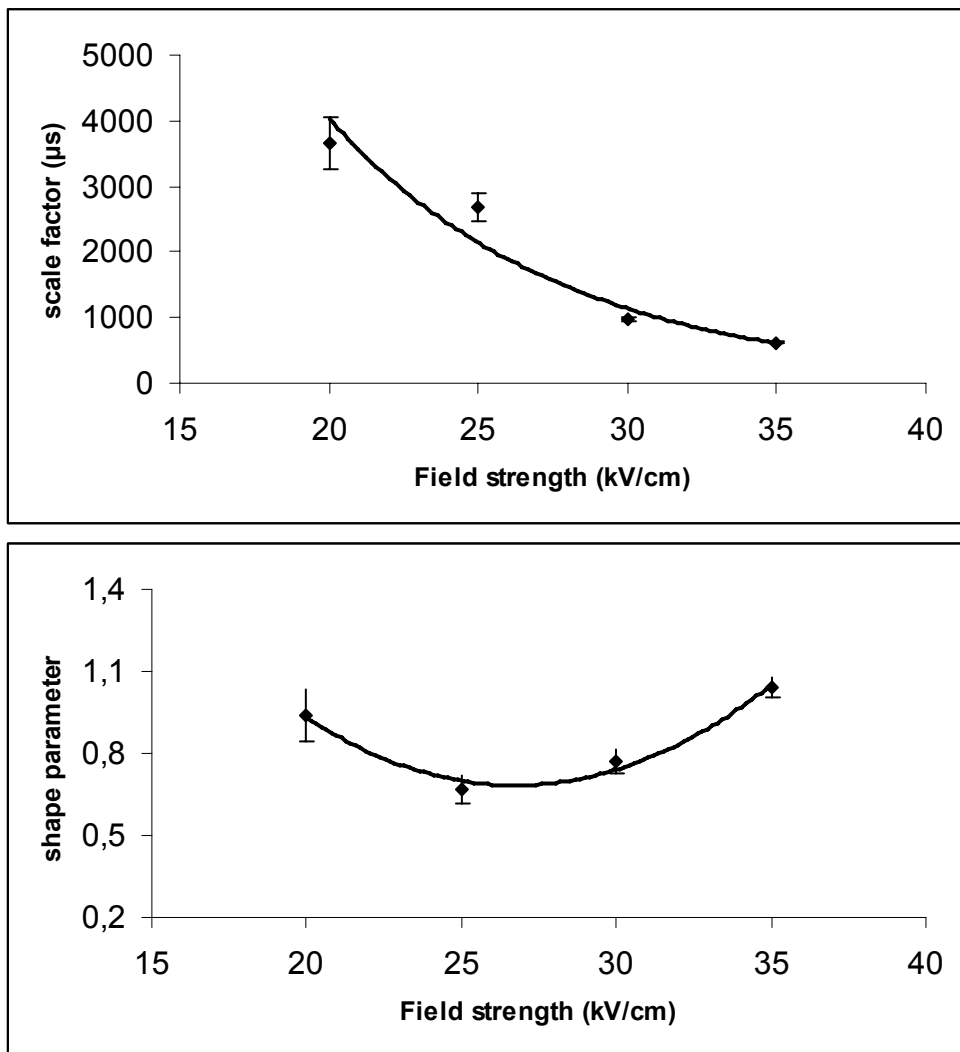


Figure 5 - Effect of electric field strength on the scale factor (α) and shape parameter (γ) estimated by a Weibull model used to describe the high-intensity pulsed electric field-inactivation of carrot juice POD. Experimental results are expressed as the means \pm standard deviation.

Elez-Martínez et al. (2006) studied POD inactivation on orange juice using electric field strength from 5 to 35 kV/cm, and they reported α -values from 18 to 20000 μ s. Soliva-Fortuny et al. (2006) observed α -values from 305 to 2817 modeling lipase reduction by HIPEF. Rodrigo et al. (2003) processed orange-carrot juice by HIPEF from 25 to 35 kV/cm up to 340 μ s and used Weibull's model to describe the inactivation of pectin methyl esterase (PME) by HIPEF. They found that α -parameters ranged from 120.57 to 288.48 μ s (Rodrigo et al. 2003). In the present study, α -values were from 623 to 3651 μ s. Hence, according to the α -parameter of Weibull model, carrot juice POD is more resistant than that present in the mixture orange-carrot juice. In addition, γ -parameter was lower than 1 for electric fields from 20 to 30 kV/cm, indicating a concave inhibition curve, and γ -parameter higher than 1 for electric fields of 35 kV/cm, which implies a convex inhibition curve. Rodrigo et al. (2003) reported γ -parameters higher than 1. On the other hand, Elez-Martínez et al. (2006) and Soliva-Fortuny et al. (2006) observed γ -parameters lower than 1. Thus, the shape curve of enzyme inactivation by HIPEF depends on the enzyme source and of the electric field applied, as can be deduced from γ -parameters.

Mean time values to achieve inactivation (t_m), calculated from Equation 8, decreased with increasing field strength, thus varying from 3775 to 612 μ s. Other authors such as, Giner et al. (2005) and Soliva-Fortuny (2006) reported a similar trend for t_m as a function of E. However, the range of the values substantially depended on the type and source of enzyme.

4.4.3 - Fermi's model

The inactivation of carrot juice POD as a function of field strength at different treatment time when carrot juice was processed by HIPEF, could be described by Fermi's model (Equation 9) and the regression parameter (E_h and K_F) are shown in Table 3.

The determination coefficients range from 0.873 to 0.984 and the accuracy factor varies from 1.038 to 1.168. When, the treatment time is higher than 600 μ s, this fitted model explains with good agreement and enough accuracy the observed variability in RA. However for treatment time lower than 600 μ s the model do not fit well. The critical electric field strength that is necessary to reach a 50% inhibition (E_h) showed a significant

inverse dependence with total treatment time (t) as shown in Equation 18 ($R^2 = 0.986$) and Figure 6.

Table 3 – Estimated parameters of the Fermi’s model proposed to describe the inactivation of carrot juice POD by HIPEF treatments at different field strengths.

Treatment time, μs	E_h (kV/cm)	K_F (kV/cm)	R^2	A_f
300	37.52 ± 0.95	7.44 ± 0.91	0.873	1.058
600	31.70 ± 0.29	7.93 ± 0.40	0.971	1.038
900	26.63 ± 0.19	6.10 ± 0.24	0.984	1.057
1200	25.04 ± 0.27	5.71 ± 0.34	0.969	1.107
1500	23.53 ± 0.32	5.52 ± 0.38	0.960	1.165
2000	23.43 ± 0.37	5.45 ± 0.37	0.961	1.168

Values \pm asymptotic standard error; R^2 = determination coefficient adjusted for degrees of freedom; A_f = fitting accuracy of the models.

$$E_h = (22.43 \pm 0.75) + (27 \pm 2) \exp[(-1.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \cdot t] \quad (18)$$

$$k_f = (24 \pm 9) t^{(-0.19 \pm 0.05)} \quad (19)$$

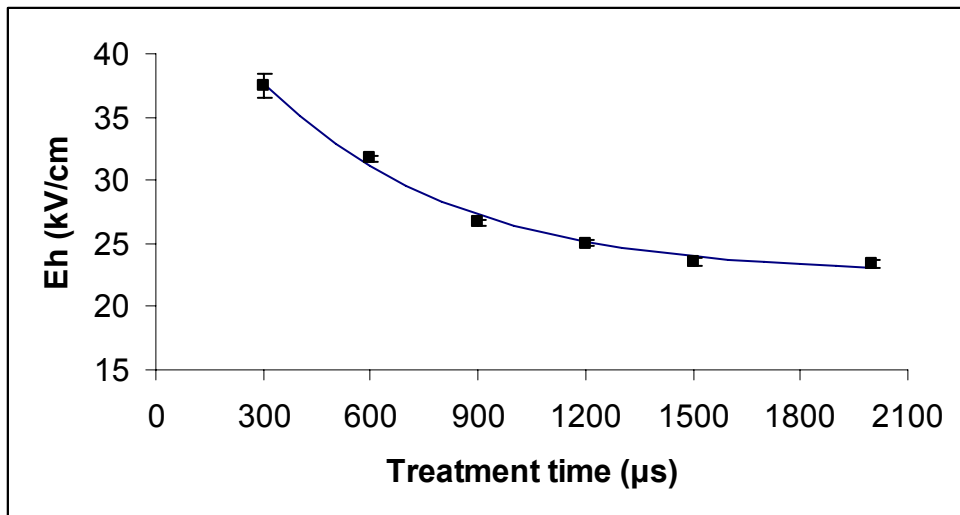


Figure 6 - Effect of the treatment time on the critical electric field strength parameter (E_h) of Fermi’s model [Equation (8)]. Experimental results are expressed as the means \pm standard deviation and the plotted line is fits of the data [Equation (17)].

In the same way K_f decreased as treatment time increased, Equation 19 ($R^2 = 0.735$) and Figure 7.

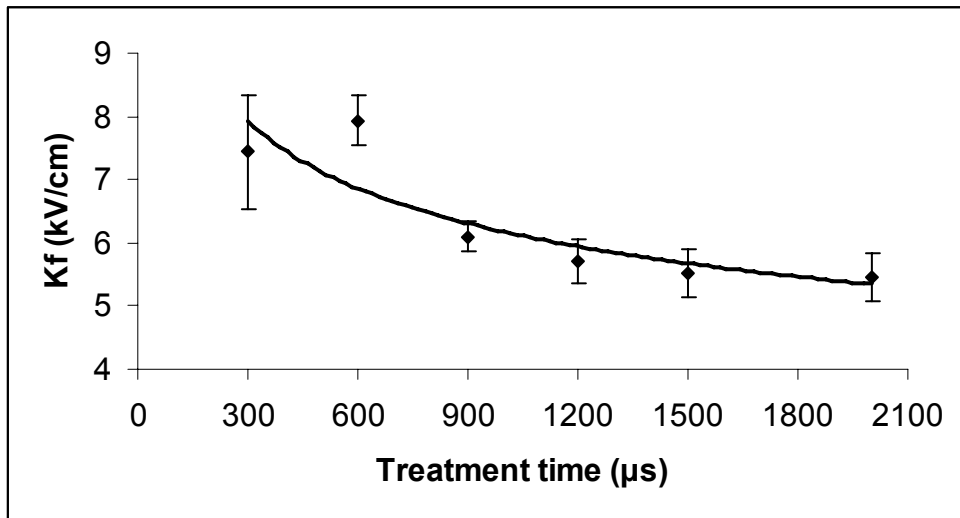


Figure 7 - Effect of the treatment time on K_f parameter of Fermi's model [Equation (8)]. Experimental results are expressed as the means \pm standard deviation and the plotted line is fits of the data [Equation (18)]

4.4.4 - Comparison of the kinetic models

The capacity of the kinetics model to predict the carrot juice POD inactivation by HIPEF process can be analyzed by the accuracy factor (A_f) and the determination coefficient (R^2) that are shown in Tables 1, 2 and 3. In general all tested models presented a good capability ($1.038 < A_f < 1.211$ and $0.763 < R^2 < 0.984$) to describe the POD inactivation as a function of electric field intensity and total treatment time (E and t). Each model provides different information related to the enzyme inactivation by HIPEF. Among the three models (first-order, first-order fractional and Weibull's model) used to model the decreased of POD activity as function of the treatment time, the first-order fractional conversion model presented a better performance ($A_f = 1.039$ to 1.200 and $R^2 = 0.898$ to 0.983) than the simple first-order ($A_f = 1.049$ to 1.210 and $R^2 = 0.763$ to 0.978) and Weibull' model ($A_f = 1.046$ to 1.211 and $R^2 = 0.884$ to 0.984). Thus, the first-order

fractional conversion model was indicated to predict a residual POD activity as function of treatment time by HIPEF. A Fermi's model was proposed to explain the depletion of carrot juice POD as a function of field strength and it fitted well the data ($A_f = 1.038$ to 1.168 and $R^2 = 0.873$ to 0.984). Moreover, this model supplies information about the electric field strength needed to reduce POD activity to 50%. Therefore, with these two models, a first-fractional and a Fermi's model it was possible to obtain the information needed to understand the inactivation of carrot juice POD by HIPEF process from a kinetic point of view.

4.4.5 - POD inactivation as a function of energy density input

Simple first-order, first-order fractional conversion and Weibull's equation were used to model carrot juice POD inactivation as a function of the energy density supplied. The energy input at all the HIPEF experimental conditions was calculated from Equation (1). The relationship between RA of carrot juice POD and energy input with different HIPEF treatment is shown in Figure 8.

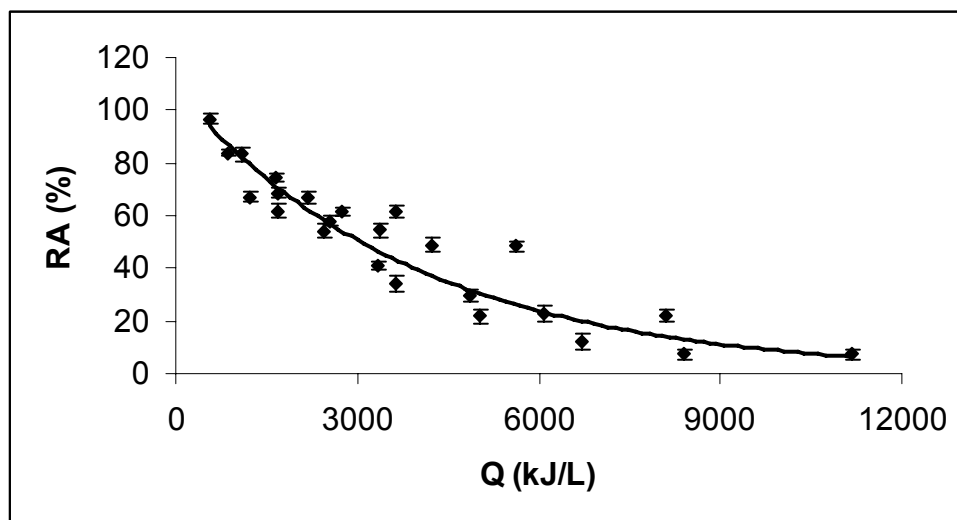


Figure 8 - Residual carrot juice POD activity exposed at different electric field energy densities supplied by HIPEF treatments at several conditions (means \pm SD). The plotted line correspond to the fit of data to a first-order model

The reduction in POD activity could be related to the energy density input (Q) by a first-order model (Equation 20).

$$RA = 100 \cdot \exp\{ [(-2.1 \pm 0.1)10^{-3}]Q \} \quad (20)$$

The simple first-order model yielded the best accuracy factor and determination coefficient ($A_f = 1.23$; $R^2 = 0.885$) compared to the Weibull model ($A_f = 1.33$; $R^2 = 0.881$) and to the first-order fractional conversion model ($A_f = 1.32$; $R^2 = 0.879$). As observed in Figure 8, the RA of carrot juice POD decreased as electric energy density input (Q) increased ($p < 0.05$). Equation (20) allows calculating the energy density necessary to inactivate a determined fraction of the enzyme. Thus, the estimated energy densities to be supplied in order to achieve 50 and 90% inactivation were 3,995 and 16,615 kJ/L, respectively.

The depletion of RA of POD with Q was in agreement with the results found by Giner et al. (2001, 2002) that reported an exponential relationship between enzyme activity and Q. The results of this study were also according to those found by Elez-Martínez et al. (2006) and Soliva-Fortuny et al. (2006). These authors also reported an exponential relationship between enzyme activity and Q, and proposed the use of a Weibull's model to describe the variation of RA with Q.

4.5 - CONCLUSIONS

Reduction of carrot juice POD activity can be achieved by applying HIPEF treatments. The POD activity decreased as the electric field strength, treatment time and energy density input increased. In general all models tested presented a good capability to describe the reduction of POD as a function of HIPEF parameters studied. Moreover each one provides different information related to carrot juice POD inactivation by HIPEF. Among the models used to describe the depletion of POD activity as a function of the treatment time, a first-order fractional conversion presented a better performance than a simple first-order and Weibull's model. The effect of POD inhibition as a function of field strength can be fitted well by Fermi's model for treatment time higher than 600 μ s. A

simple first-order model was indicated to describe, with a good accuracy factor, the carrot juice POD inactivation as a function of energy density input.

4.6 - ACKNOWLEDGMENTS

This study has been carried out with financial support from the Commission of the European Communities, Framework 6, Priority 5 'Food Quality and Safety', Integrated Project NovelQ FP6-CT-2006-015710.

We thank to “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES)/Brazil that awarded the author Luciano José Quintão Teixeira a pre-doctoral sandwich grant.

4.7 - REFERENCES

Barsotti, L.; Dumay, E.; Mu, T.H.; Fernández, M.D.; Cheftel, J.C. (2002). Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends Food Science Technology*, 12, 136-144.

Cano, M.P.; Hernandez, A.; De Ancos B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, 62:85–88.

Chen, C. S.; Shaw, P.E.; Parish, M.E. (1993). Orange and tangerine juices. In Nagy, S.; Chen, C. S.; Shaw, P.E (eds.) *Fruit juice processing technology* (pp 110-165). Aubundale, Flórida: Agscience.

Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. (2007) Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102, 201-209.

Elez-Martínez, P., Aguiló-Aguayo, I., Martín-Belloso, O. (2006). Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 71-81.

Espachs-Barroso, A. G., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín-Belloso, O. (2003). Microbial and enzymatic changes in fruit juice by high intensity pulsed electric fields. *Food Reviews International*, 19, 253–273.

Giner, J.; Gimeno, V.; Espachs, A.; Elez, P.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martín, O. (2000). Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 1, 57-67.

- Giner, J.; Gimeno, V.; Barbosa-cánovas, G.V.; Martín, O. (2001). Effects of pulsed electric field processing on apple and pear polyphenoloxidase. *Food Science and Technology International*, 7(4), 339-345.
- Giner, J.; Ortega, M.; Resegué, M.; Gimeno, V.; Barbosa-cánovas, G.V.; Martín, O. (2002). Inactivation of peach polyphenoloxidases by exposure to pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 67 (4), 1467-1472.
- Giner, J.; Grouberman, P.; Gimeno, V.; Martín, O. (2005). Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: Comparison of inactivation kinetic models. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 85, 1613-1621.
- Grahl, T.; Märkl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 148-157.
- Ho, S.Y., Mittal, G.S.; Gross, J.D. (1997). Effect of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Engineering*, 31, 69-84.
- Howard, L.R., Braswell, D., Heymann, H., Lee, Y., Pike L.M., and Aselage, J. (1995). Sensory attributes and instrumental analysis relationships for strained processed carrot flavour. *Journal of Food Science*, 60, 145-148.
- Kalt, W.; Forney, C.F.; Marin, A.; Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4638-4644.
- Martín, O.; Zhang, Q.; Castro, A.J.; Barbosa-Vanovas, G.V.; Swanson, B.G. Revisión: (1994). Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos. *Microbiología e ingeniería del proceso. Revista Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(34), 1-34.
- Martín, O.; Qin, B.L.; Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20, 317-336.
- Mawele S.; Timothy, D.; Benoit, G. (1996). Water blanching effects on headspace volatiles and sensory attributes of carrots. *Journal of Food Science*, 61(6), 1191-1195.
- Min, S.; Min, S.K.; Zhang, Q.H. (2003) Inactivation kinectis of tomato juice lipoxygenase by pulded electric fields. *Journal of Food Science*, 68(6), 1995-2001.
- Morales-Blancas, E.F.; Chandia, V.E.; Cisneros-Zevallos, L. (2002). Thermal inactivation kinetisc of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science*, 67(1), 146-154.
- Ohshimaa, T.; Tamurab, T.; Satoa, M. (2007). Influence of pulsed electric field on various enzyme activities. *Journal of Electrostatics*, 65, 156–161.

- Qin, L.; Xu, S.; Zhang, W. (2005). Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 505-512.
- Quintão-Teixeira, L.J.; Aguiló-Aguayo, I.; Ramos, A.M.; Martín-Belloso, O. Inactivation of oxidative enzymes by high-intensity pulsed electric field for retention of color in carrot juice. *Food Bioprocess Technology*, DOI: 10.1007/s11947-007-0018-x.
- Ramos, A.M.; Teixeira, L.J.Q.; Stringheta, P.C.; Chaves, J.B.P.; Gomes, J.C. (2006). Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. *Ceres*, 53(308), 425-438.
- Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A.; Barbosa-Cábivas, G.V.; Rodrigo, M. (2006). Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *LWT*, 39, 1163-1170.
- Rodrigo, D.; Arranz, J.I.; Frígola, A.; Rodrigo, M.C.; Esteve, L.M.; Calvo, C.; Rodrigo, M. (2003). Physicochemical Characteristics and Quality of Refrigerated Spanish Orange-Carrot Juices and Influence of Storage Conditions. *Journal of Food Science*, 68(6), 2111-2116.
- Roos, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriol*, 81, 501-508.
- Sampedro, F.; Rivas, A.; Dolores, R.; Martínez, A.; Rodrigo, M. (2006). Effect of temperature and substrate on PEF Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice–milk beverage. *European Food Research Technology*, 223, 30-34.
- Soliva-Fortuny, R.; Bendicho-Porta, S.; Martín-Belloso, O. (2006). Modeling high-intensity pulsed electric field inactivation of a lipase from *pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 89, 4096-4104.
- Soysal, Ç. And Söylemez, Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 68, 349-356.
- Willet, W. C. (1994). Diet and health: what should we eat. *Science*, 254, 532-537.
- Yang, R.J.; Zhang, Q.H. (2004). Effect of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *Journal of food science*, 69, 241-248.
- Yeom, H.W.; Zhang, Q.H.; Dunne, C.P. (1999). Inactivation of papain by pulsed electric fields in a continuous system. *Food Chemistry*, 67, 53-59.
- Zhong, K.; Wu, J.; Wang, Z.; Chen, F.; Liao, X.; Hu, X.; Zhang, Z. (2007). Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry*, 100, 115–123.

CAPÍTULO 5 – COMPARATIVE STUDY ON COLD STORAGE OF CARROT JUICE PROCESSED BY HIGH-INTENSITY PULSED ELECTRIC FIELD OR HEAT TREATMENT

5.1 - ABSTRACT

The effect of high intensity pulsed electric fields (HIPEF) processing (35 kV/cm for 1500 μ s in 6- μ s bipolar pulses at 200 Hz) on the main bioactive compounds, antioxidant capacity and peroxidase inactivation of carrot juice was investigated during storage at 4° C for 56 days and compared to heat pasteurization (90 °C for 1 min or 90 °C for 30 s) having the fresh juice as a reference. HIPEF and heat treated carrot juices, just after processing, showed higher β -carotene and lower vitamin C levels than the untreated juice. However, no significant ($p < 0.05$) changes in the total phenolic content and antioxidant capacity were observed between treated and fresh juices. Moreover, vitamin C content was higher in HIPEF than in pasteurized juices. In regarding to storage, vitamin C, antioxidant capacity and β -carotene content decreased exponentially through storage time following first-order kinetic models ($R^2 = 0.824 - 0.965$ and accuracy factor very close to 1), whereas carrot juices maintained total phenolic content. The depletion of vitamin C through storage time was lower in HIPEF treated than heat pasteurized carrot juice. POD activity decreased drastically after processing irrespective of the treatment applied and was maintained during storage, indicating that the inactivation was irreversible for all treatments. There were no significant differences ($p < 0.05$) in residual POD activity between HIPEF and thermal process. Hence the application of HIPEF may be appropriate to achieve safe and fresh like carrot juice.

Key words: Carrot juice, thermal treatment, HIPEF, POD, Bioactive compound, antioxidant capacity

5.2 – INTRODUCTION

The manufacture of refrigerated fruit and vegetable juices has become an increasing interest of the beverage industry because its consumption can prevent certain diseases such as cancer, cardiovascular diseases and other degenerative chronic diseases (Block et al., 2001; Sánchez-Moreno et al., 2003). These beneficial effects have been attributed to the antioxidant compound, such as vitamins C, phenolic compounds and carotenes (Gardner, et al., 2000; Dumas et al., 2003). Carrots are one of the principal vegetables rich in carotenoids and, some of these carotenoids (mainly β -carotene, α -carotene, and β -criptoxanthin) have provitamin A activity (Qin et al., 2005; Olson, 1989). Moreover animals can not biosynthesize carotenoids so that their intake from food is needed (Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera, 2007).

Carrots also are a good source of vitamin C and phenolic compound that contributes for its antioxidant capacity (Lima et al., 2001; Zhang et al., 2005). Vitamin C may prevent free radical-induced damage to DNA quenching oxidants (Fraga et al., 1991). Moreover, it is thermolabile and, thus provides an indication of the loss of other vitamins and acts as a valid criterion for other organoleptic or nutritional components, such as aromatic and pigment substances (Polydera et al., 2003).

Several studies demonstrated that a diet rich in phenolic compounds correlates with reduced risk of coronary heart diseases. This association was partially explained on the basis of the fact that phenols interrupt lipid peroxidation induced by reactive oxygen species (Amiot et al., 1997).

Carrot juice is perishable food product. Traditionally, thermal treatment is used to extending the shelf-life of vegetable juices, by inactivation of microorganisms and enzymes (Chen et al., 1993). Heat processing often induces undesirable changes that cause nutrients losses, color alterations and off-flavor development (Mawele et al., 1996; Espachs-Barroso et al., 2003; Rivas et al., 2006). Consequently, the food industry is looking for new technologies that are less aggressive than thermal treatment. High intensity pulsed electric field (HIPEF) is an emergent non-thermal technology with

promising results in the field of fluid foods. Therefore, HIPEF is potentially an alternative of choice for carrot juice processing. An advantage of this technology is that food quality characteristics such as flavour and vitamins are unaffected or only minimally altered by processing at room temperature (Martín et al., 1997; Barsotti et. al, 2002; Ramos et al., 2006; Elez-Martínez and Martín-Belloso, 2007).

Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) generally is considered one of the most heat-stable enzymes and thus, long heat treatment times are needed to ensure POD inactivation. Hence, POD is commonly used as an indicator for the inactivation of endogenous enzymes and microorganism during heating (Soysal and Söylemez, 2005; Morales-Blancas et al., 2002; Ling and Lund, 1978). Moreover, POD is involved in the oxidation of a wide range of natural compounds, thus being responsible for loss of flavour and nutrient quality in fruit juices (Bruemmer et al., 1976).

Most HIPEF-process studies refer to the effect of treatment parameters on enzyme inactivation, but little is known about changes during storage. It has been demonstrated that HIPEF can inactivate carrot juice POD with different efficiency depending on the assayed conditions (Quintão-Teixeira et al., 2007). On the other hand, no information is still available on residual carrot juice POD processed by HIPEF during storage.

The aim of this work was to evaluate the effect of the HIPEF treatment adequate to inactivate POD on some physicochemical and bioactive compound. Moreover, changes that occur during storage at 4°C of carrot juice were determined. A comparative study was carried out among HIPEF-treatment, thermally pasteurized and fresh carrot juice.

5.3 - MATERIAL AND METHODS

5.3.1 - Juice processing

Carrots (*Daucus carota L.*) were purchased in a local market (Lleida, Spain) washed with tap water and weighed. The carrot juice was extracted by a juice extractor (Bifinett, KompernaB GmbH, Bochum, Germany) and filtered through a muslin cloth by means of a vacuum pump (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany). The natural pH of carrot juice, determined with a pH meter (2001 pH meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain), was 6.20 ± 0.02 and it was adjusted to 3.8 with the addition of citric acid, according to the general commercial practice for carrot juice. Finally, carrot juice was degassed using a vacuum pump (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany)

under agitation during 5 minutes and stored at 4 °C until treatment, which was carried out within the next two hours. The fresh carrot juice had a solids soluble content of 8.21 ± 0.37 °Brix, determined with a refractometer at 25 °C (Atajo RX-100 refractometer, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan), and an electrical conductivity of 7.83 ± 0.02 mS/cm at 20 °C, measured with a conductivimeter (240 conductivimeter, Tesco GmbH & Co., Lenzkirch, Germany).

5.3.2 - HIPEF treatment

The system includes a high-voltage pulse generator, a high-voltage pulse treatment chamber, a peristaltic pump, a cooled water bath, a thermocouple attached to the chamber treatment for temperature control and an oscilloscope for controlling the electrical properties as voltage, frequency and pulse width. A continuous-flow HIPEF system was used to carry out this study. The treatment device was an OSU-4F HIPEF unit (The Ohio State University, Columbus, Ohio) that discharges square-shaped pulses within 8 collinear chambers. Gap distance and volume in each chamber were 0.29 cm and 0.012 cm^3 , respectively. A cooling coil was connected before and after each pair of chambers and submerged in an ice-water shaking bath. Thermocouples were attached to the surface of the stainless-steel, 2.5 cm away from the HIPEF zones along the flow direction. The thermocouples were connected to temperature readers and isolated from the atmosphere with an insulation tape. The temperatures of the inlet and outlet of each pair of chambers were recorded every 0.1 s during HIPEF treatment and the samples never exceeded 40°C. The flow rate of the process was adjusted to 60 mL/min and controlled by a variable speed pump (model 75210-25, Cole Palmer, Vernon Hills, III).

Carrot juice were treated at field strengths of 35 kV/cm for 1500 μs using 6- μs square shaped bipolar pulses at 200 Hz. HIPEF parameters selected for this study had been shown in previous studies to be the best conditions to reach a maximum POD inactivation on carrot juice.

5.3.3 - Thermal treatment

Carrot juice were subjected to a mild (90°C, 30 s) and a high (90°C, 60 s) heat pasteurizations as a reference to compare the effectiveness of HIPEF treatments on bioactive compounds, antioxidant capacity and enzyme inactivation. These conditions were selected based on literature, where typical heat treatments of juices vary from 95 °C

to 90 °C for 15-60 s (Nagy et al., 1993). The samples were thermally processed in a tubular heat exchanger. A gear pump was used to maintain the juice flow rate through a stainless steel heat exchange coil, which was immersed in a hot water shaking bath (Universitat de Lleida, Lleida, Spain). After thermal processing, the juice was immediately cooled in a heat exchange coil immersed in an ice water-bath.

5.3.4 - Sample packaging and storage

Samples of fresh, HIPEF-treated and pasteurized carrot juice were bottled in polypropylene bottles of 100 mL, leaving the minimum amount of headspace volume. Once filled, the receptacle was tightly closed and stored, up to analysis, under refrigeration at 4 °C in darkness. The analyses were made in the first day and after to every seven days until visual spoilage took place in samples.

5.3.5 - Vitamin C

Vitamin C content in carrot juice was analysed by HPLC. The extraction procedure was based on a method validated by Odriozola-Serrano et al. (2007). A sample of 25 g of juice was mixed with 25 mL of a solution containing 45 g of metaphosphoric acid and 7.2 g of DL-1,4-dithiotreitol per litre. The mixture was centrifuged at 22100 x g for 15 min at 4 °C. The supernatant was vacuum-filtered through Whatman No. 1 paper. The sample was then passed through a Millipore 0.45 µm membrane. An aliquot of 20 µs was injected into the HPLC system using a reverse-phase C18 Spherisorb® ODS2 (5 µm) stainless steel column (4.6 mm x 250 cm). The mobile phase was a 0.01% solution of sulphuric acid adjusted to pH = 2.6. The flow rate was fixed at 1.0 mL/min at room temperature. Detection was performed with a 486 Absorbance Detector (Waters, Milford, MA) set at 245 nm. The quantification of vitamin C was carried out comparing the samples with a calibration line built through 0, 5, 10, 15, 30 and 50 mg ascorbic acid/100 g (Scharlau Chemie, SA., Barcelona, Spain). Results were expressed as mg of vitamin C per 100 g of carrot juice.

5.3.6 - Carotenoids: β-carotene

5.3.6.1 - Extraction

The extraction was carried out following a method proposed by Tonucci et al. (1995). About 2.5g of magnesium carbonate and 2.5g of Celite used as filter aid were

added to 25 mL of carrot juice and 0.5 mg of internal standard (β -apo-8'-carotenal). The mixture was blended for 20 min in an Omni Mixer with 25 mL of THF and was then filtered through Whatman No. 1 filter paper on a Büchner funnel. The solid material was extracted two or three more times until it was devoid of orange color. The THF extracts were combined, and the volume was reduced by about two-thirds under vacuum at 35°C on a rotary evaporator. Components of the combined extract were portioned into 250 mL of methylene chloride and 150 mL of salt water in a separatory funnel. The water layer was washed with methylene chloride until carotenoids were completely removed. The methylene chloride layer containing carotenoids was dried over anhydrous sodium sulfate and filtered through Whatman No. 42 filter paper. The volume of the filtrate was reduced under vacuum to approximately 10 mL and brought up to 25 mL with methylene chloride. Then the extracts was passed through a Millipore 0.45 μ m membrane and injected into the HPLC system.

5.3.6.2 - Chromatography conditions

Conditions for the HPLC separations were the same as those reported by Odrioxola-Serrano et al (2007). The HPLC system was equipped with a 600 Controller and a 486 Absorbance Detector (Waters, Milford, MA) working at 450nm. Samples were introduced into a reverse-phase C18 Spherisorb® ODS2 (5 μ m) stainless steel column (4.6mm x 250mm) through a manual injector equipped with a sample loop (20 μ L). The flow rate was fixed at 0.7 mL/min at room temperature. An isocratic mixture of acetonitrile (85%), methanol (10%), methylene chloride (3%) and hexane (2%) at the initial conditions was followed by a linear gradient beginning at 10 min and completed at 40 min. The final composition of the gradient mixture was acetonitrile (45%), methanol (10%), methylene chloride (23%) and hexane (22%). At the end of the gradient, the column was equilibrated under the initial conditions for 20 min. Calibrations curves based on peak area for the internal standard and β -carotene were used to quantify carotenoids.

5.3.7 - Total Phenolic content

Total phenols compound in carrot juice were determined by the colorimetric method of Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventos (1999) using the Folin-Ciocalteu reagent. Samples of carrot juice were centrifuged at 6000 x g for 15 min at 4 °C (Centrifuge Medigifer; Select, Barcelona, Spain) and filtered through Whatman No 1 filter

paper. Afterwards, 0.5 mL of the extract was mixed with 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent and 10 mL of saturated Na₂CO₃ solution. Samples were allowed to stand for 1 h at room temperature before the absorbance at 725 nm was measured. Concentrations were determined by comparing the absorbance of the samples with a calibration line built through 0, 10, 20, 30, 40 and 50 mg gallic acid/100 g (Scharlau Chemie, SA., Barcelona, Spain). Results were expressed as milligrams of gallic acid per 100 g of carrot juice.

5.3.8 - POD activity measurement

POD activity in carrot juice was measured using the method described by Elez-Martínez et al. (2006) with some modifications. All chemicals were purchased from Scharlab Chemie, SA (Barcelona, Spain). The enzyme extracts for determination of POD activity were obtained by homogenization of 10 mL carrot juice with 10 mL 0.2 M sodium phosphate buffer (pH = 6.5). The homogenate was centrifuged (12500 RPM, 15 min) at 4 °C (Centrifuge AVANTITM J-25, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). The supernatant was filtered through a Whatman n° 1 paper and the resulting liquid constituted the enzymatic extract, which was used for the POD activity determination.

POD activity was assayed spectrophotometrically by placing 2.7 mL 0.05 M sodium phosphate buffer (pH = 6.5), 0.2 mL p-phenylenediamine of 0.25% (w/v) as H-donor, 0.1 mL hydrogen peroxide of 1.5% (v/v) as oxidant and 0.1 mL of enzymatic extract in a 1 cm path cuvette. The oxidation of p-phenylenediamine was measured at 509 nm at room temperature using a CECIL CE 2021 spectrophotometer (Cecil Instruments Ltd, Cambridge, UK). POD activity was determined by measuring the initial rate of the reaction, which was computed from the linear portion of the plotted curve.

One unit of POD activity was defined as a change in absorbance at 509 nm/min.mL of the enzymatic extract.

POD activity was measured simultaneously in the fresh carrot juice as a reference. The percentage of residual POD activity (RA) was defined as indicated by Equation (1).

$$RA = 100 \cdot \frac{A_t}{A_0} \quad (1)$$

where A_t and A_0 are the enzyme activities of the treated and untreated samples, respectively.

5.3.9 - Antioxidant capacity

The antioxidant capacity was evaluated by using free radical-scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The determination was based on the method proposed by De Ancos et al. (2002). Samples of carrot juice were centrifuged at $6000 \times g$ for 15 min at 4°C (Centrifuge Medigifer; Select, Barcelona, Spain) and aliquots of 0.01 mL of the supernatant were mixed with 3.9 mL of methanolic DPPH (0.025 g/l) and 0.090 mL of distilled water. The homogenate was shaken vigorously and kept in darkness for 30 min. Absorption of the samples was measured with a spectrophotometer (CECIL CE 2021; Cecil Instruments Ltd., Cambridge, UK) at 515 nm against a blank of methanol without DPPH. Results were expressed as percentage decrease with respect to the absorption value of a reference DPPH solution.

5.3.10 - Statistical analysis

Treatments were distributed into an experimental unit in a completely randomized design with two replicate and the analysis was made in duplicate. The ANOVA statistical procedure was used to analyze the data obtained just after processing, and the Tukey test was utilized to compare the treatments means using a significance level of 5%. The split-plot treatment design was used to analyze the bioactivity compound content depletion as a function of storage time. In this case, the treatment was considered a principal factor, and the time was designed as a subplot factor. The ANOVA statistical procedure was used to analyze the data. The significance of storage time effect implicate in the fit of nonlinear regression model using a first-order kinetic model (Equation 2) to describe the evolution of the health-related compounds as well as the antioxidant capacity during cold storage. All procedure was made using the Statgraphics Plus v.5.1 Windows package (Statistical Graphics Co., Rockville, Md).

$$C = C_0 e^{(-k \cdot t)} \quad (2)$$

where C is the residual content of bioactive compound (mg/100g) or antioxidant capacity (%), C_0 is the initial content of the bioactive compound (mg/100g) or antioxidant capacity (%), k is a first-order rate constant (days^{-1}) and t the storage time (days). Fitting accuracy of the models was evaluated through the analysis of R^2 coefficients and the accuracy factor A_f . The accuracy factor was proposed by Ross (1996) to evaluate the performance of models. Equation 3 computes A_f from J experimental observations of RA and their respective J values predicted by the model of concern. Thus, the nearer the A_f value to the unit, the better the accuracy:

$$A_f = 10^{\frac{\sum_{j=1}^{j=J} \left| \log \left(\frac{\text{predicted}RA_j}{\text{observed}RA_j} \right) \right|}{J}} \quad j = 1, 2, 3, \dots J \quad (3)$$

5.4 - RESULTS AND DISCUSSION

Changes in vitamin C, β -carotene, total phenolic content, residual POD activity and antioxidant capacity at different treatments was measured just after processing (Table 1) and as function of storage time.

Table 1 – Effect of the treatments on the parameters studied for carrot juice samples just after processing (first day)

Parameters	Fresh juice	HIPEF	90°C/30 s	90°C/60 s
Vitamin C (mg/100 g)	8.1 a	7.2 b	5.8 c	5.1 d
β -Carotene (mg/L)	46.3 a	54.5 b	47.4 b	53.2 b
Total phenolic (mg/100g)	33.59 a	34.10 a	30.61 a	32,25 a
Residual POD (%)	100 a	6.7 b	5.1 b	3.2 d
Antioxidant capacity*	12.87 a	11.77 a	11.46 a	11.19 a

* Antioxidant capacity en DPPH inhibition (%)

The means with the same letter in the line indicate that means are not statistically different by Tukey test ($P < 0.05$)

5.4.1 - Vitamin C

Fresh carrot juice showed 8.1 mg of vitamin C/100 g of juice. The results obtained in the present work (Table 1) for carrot juice vitamin C content are in the range of those published in literature. Aubert (1981) reported 9 mg of vitamin C per 100 g of carrot. In this way, Selman (1994) obtained 6.0 mg of vitamin C/100 g of carrot. On the other hand, Rodrigo et al. (2003) obtained a range of 25.42 to 42.03 mg of vitamin C per 100 g at different samples of orange-carrot juices. This occurs because orange have higher vitamin C content than carrot.

Vitamin C content of both HIPEF and pasteurized carrot juice decreased significantly ($p < 0.05$) after being processed compared to untreated juices (Table 1).

However, HIPEF treated carrot juice showed higher concentration of vitamin C (89.9% retention) than mild pasteurized (71.6% retention) and high pasteurized (62.9% retention) carrot juice. Odriozola-Serrano et al. (2007) obtained vitamin C retention in tomato juice of 86.5%, 80.4% and 79.2% using HIPEF-process, mild pasteurization and high pasteurization, respectively. On the other hand, Elez-Martínez et al. (2006) observed 91.2% retention of vitamin C after HIPEF process in orange juice and 82.2% retention for thermal pasteurization. Our results were similar to reported in the literature, the differences were due to the raw material and parameters of treatments used in each study were different. Ascorbic acid is a heat-sensitive bioactive compound in the presence of oxygen. Thus, high temperatures during processing can greatly affect the rates of its degradation through an aerobic pathway. How in ours studies HIPEF process never exceed 40°C, higher retention of vitamin C was obtained by HIPEF treated carrot juice compared to the thermally processed samples. Consistently, Torregrosa et al. (2006), Sánchez-Moreno et al (2005) and Min et al. (2003) reported the effectiveness of HIPEF in achieving higher vitamin C retention in comparison with heat treatments in juices.

Vitamin C also is sensitive bioactive compound as a function of storage time. A depletion on vitamin C content as a function of storage time at 4°C for 56 days irrespective of the treatment applied was observed. However, low depletion on vitamin C was observed when carrot juice was treated by HIPEF (Figure 1). At 56 days, carrot juice processed by HIPEF retained 16.2% of vitamin C content, mild thermal 13.6% and high thermal pasteurized only 8.7%. These results are similar to those observed by Odriozola-Serrano et al. (2007), Elez-Martínez et al. (2006) and Min et al (2003) that reported higher retention of vitamin C in vegetal juices as a function storage when HIPEF process is used in comparing to thermal pasteurization.

Some studies proposed used vitamin C retention as indicator of shelf life of vegetable juice. Torregrosa et al. (2006) and Shaw (1992) considered that juices with 50% depletion on the initial vitamin C are at the end of its shelf-life. At 28 days of storage, carrot juice treated by HIPEF retained about 52.2% of vitamin C. In contrast, at 28 days of storage, carrot juice treated by mild pasteurization (90°C/30 s) retained 31.7% of vitamin C and in high heat process (90°C/60 s) was observed only 21.7% of vitamin C content. Therefore, HIPEF treatment may extend shelf-life in carrot juice storage at cold temperature compare to thermal process. During storage, the concentration of vitamin C in the vegetable juices decreases according to the storage conditions (Torregrosa et al., 2006),

such as temperature of storage (Elez-Martínez et al., 2005) and atmospheric oxygen (Odriozola-Serrano et al., 2007). The contents of vitamin C as a function of storage time were described by a first-order kinetic model: $C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$, where C is vitamin C (mg/100g) at time t (days) of storage, C_0 is the vitamin content (mg/100g) just after processing and k is the rate constant (day^{-1}). The model fitted well the experimental data ($R^2 > 0.846$ and accuracy factor was very close to 1) (Table 2).

Table 2 - First-order kinetic rate constants (k) and determination coefficients (R^2) for the degradation of vitamin C of treated carrot juice during storage at 4°C for 56 days.

Treatment	C_0	k (days^{-1})	R^2	A_f
90°C/30 s	6.39 ± 0.29	0.0212 ± 0.003	0.913	1.236
90°C/60 s	5.47 ± 0.37	0.0331 ± 0.002	0.956	1.026
HIPEF	6.81 ± 0.22	0.0321 ± 0.002	0.846	1.047

Values \pm asymptotic standard error; R^2 = determination coefficient adjusted for degrees of freedom; A_f = fitting accuracy factor of the models.

In figure 1, the plotted model is shown by the lines. C_0 (6.81 mg/100 g) for HIPEF-treated carrot juice is higher than C_0 for mild pasteurized (6.39 mg/100 g) and for high pasteurized (5.47 mg/100 g).

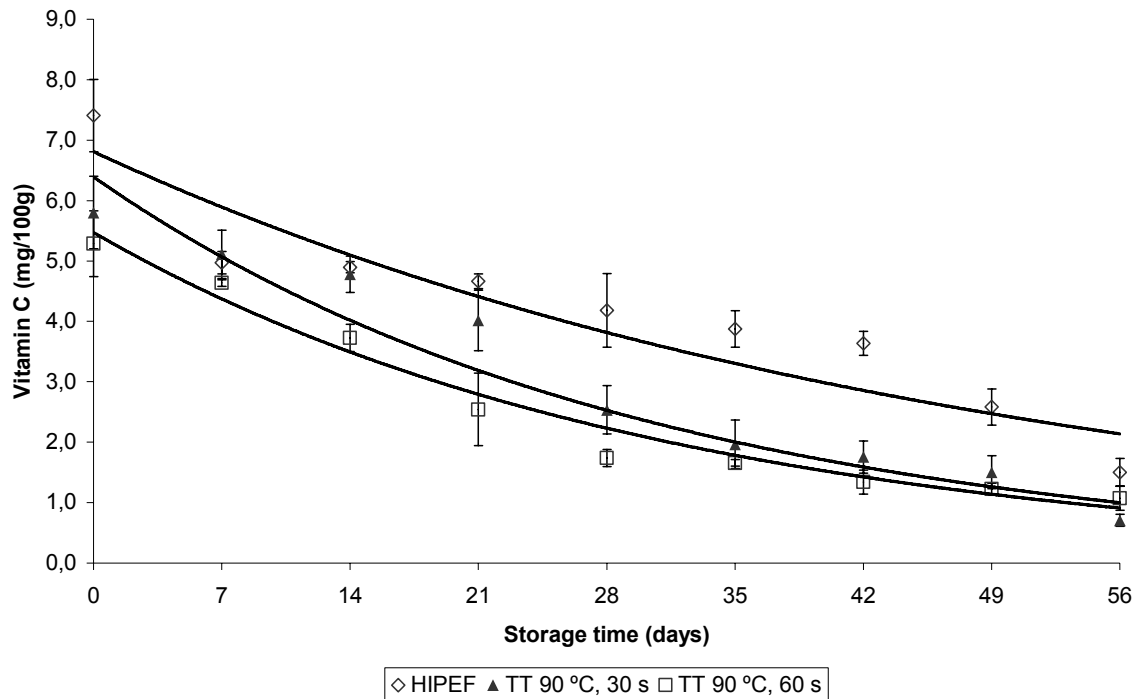


Figure 1 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on vitamin C retention of carrot juice throughout storage at 4°C for 56 days. Data shown are mean \pm standard deviation. The line is plotted model.

This trend was maintained throughout the time being the higher line represents the model for HIPEF treatment, the middle line for mild pasteurized and the lower line for high pasteurized carrot juice. Throughout the storage time, the two lines for thermal process presented lower vitamin C content than that presented by HIPEF-treated carrot juice. Odriozola-Serrano et al. (2007) used a first-order kinetic model to describe the depletion of vitamin C in tomato juice over storage time and observed similar trend to those reported in the present study.

5.4.2 - β -carotene

Fresh carrot juice presented an average of 46.3 ± 1.7 mg/L of β -carotene. This result is in accordance with literature. Kim and Gerber (1998) reported about 43.5 mg/L of β -carotene for fresh carrot juice and Thomas and Irwin (2005) obtained 56.61 mg/L of β -carotene for yellow carrot type.

β -carotene concentration was enhanced significantly ($p < 0.05$) in carrot juices just after thermal or HIPEF processing compared to the untreated juice (Table 1). There was no

difference significant ($p < 0.05$) among HIPEF, mild thermally and high thermally treatments.

According some studies, heat processing had an additive effect on isomerisation in carotenoids composition, with an average increase of 13-cis- β -carotene induced by thermal processing of carrot base product. Marx et al. (2003) observed that when carrot juice was pasteurized (80°C/10 min), the total β -carotene was 105.6 mg/L and when it was used (80°C/30 min), the total β -carotene increased for 123.4 mg/L. In contrast, when these authors used 100°C for 60 min, total β -carotene depleted to 77.4 mg/L. Therefore, depending on the time-temperature regime, thermal treatment of carrots induced formation of β -carotene by isomerization or depletion of total β -carotene.

The increase on any type of carotenoids in vegetable juice by HIPEF treatment is reported in the literature for some authors. Sánchez-Moreno et al. (2005) observed that in “gazpacho” a soup where tomato is the major component, the content of total carotenoids increased after applying 35 kV/cm in bipolar mode, 800 Hz pulse frequency and 4 μ s pulse width during 750 μ s in comparison to the untreated juice. In the same way, Torregrosa et al. (2006) and Cortés et al. (2006) obtained a significant rise in some carotenoids content after HIPEF-processing. Consistently, Odriozola-Serrano et al (in press) observed an increased in lycopene content of tomato juice processed by HIPEF condition and thermal treatment. The lycopene in tomato juice treated by HIPEF might increase from other carotenoids throughout desaturation, isomerization, and cyclization (Bramley et al., 1992). In the same way, β -carotene might increase from other carotenoids in carrot juice. From our results it was evident that β -carotene in carrot juices showed a thermal and HIPEF stability. Moreover, as thermal processing, HIPEF-treatment also induced changes in carotenoids inducing an increased of β -carotene content, but probably the mechanism of induction should be different in HIPEF-process than that in thermal-process. Nevertheless further investigations are still needed to elucidate this enhancement and the mechanism of isomerization induced.

The concentration of β -carotene in carrot juices depleted exponentially as a function of storage time irrespective of the treatment applied (Figure 2). On the other hand, β -carotene in fresh carrot juice decreased drastically (from 46.2 to 29.5 mg/L) in two weeks. In general, β -carotene was retained about 55% (55.0 to 33.3 mg/L) at 56 days of

storage at 4°C for all treated juices. Fresh carrot juice decreased in two weeks the same value than those treated carrot juices decreased in eight weeks.

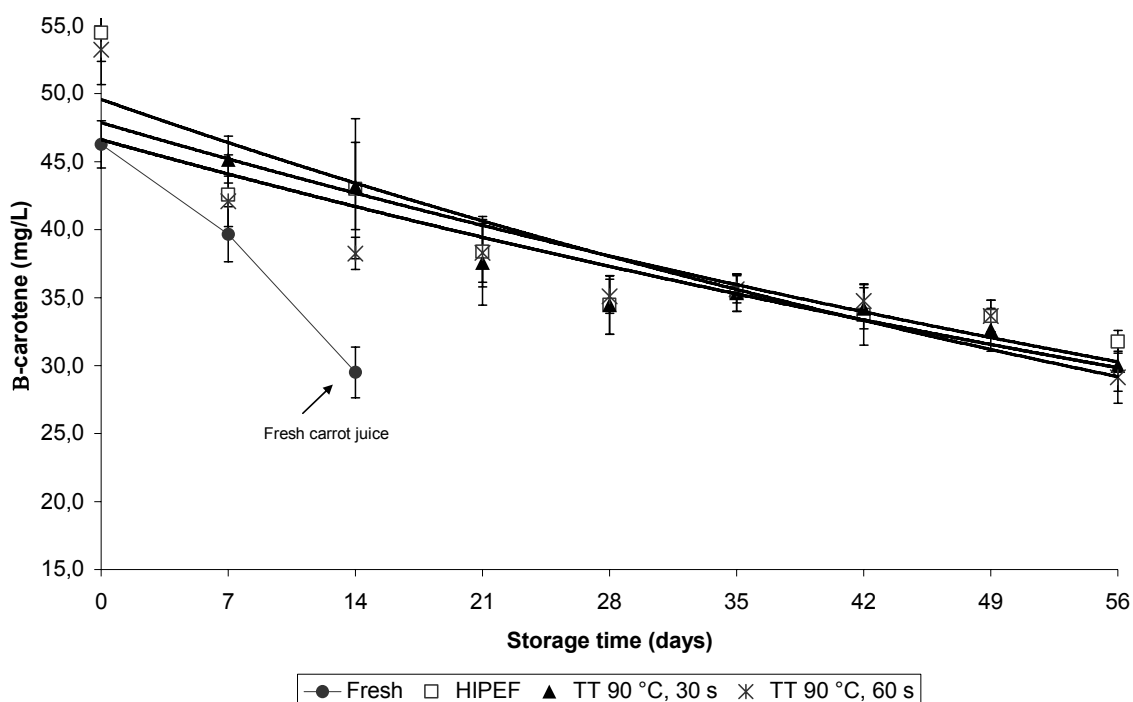


Figure 2 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on β -carotene content (mg/L) of carrot juice throughout storage at 4°C for 56 days. Data shown are mean \pm standard deviation.

The first-order kinetic model predicted well the β -carotene content depletion as a function of storage time (Table 3). The first-order kinetic models fitted the experimental data with good agreement ($R^2 > 0.824$ and accuracy factor very close to 1). There were no significant differences ($p < 0.05$) between thermal and HIPEF treatment.

Table 3 - First-order kinetic rate constants (k) and determination coefficients (R^2) for the degradation of β -carotene of treated carrot juice during storage at 4°C for 56 days.

Treatment	C_0	k (days ⁻¹)	R^2	A_f
90°C/30 s	52.0 \pm 1.9	0.0080 \pm 0.0013	0.859	1.113
90°C/60 s	47.6 \pm 1.8	0.0107 \pm 0.0052	0.824	1.061
HIPEF	49.1 \pm 1.7	0.0085 \pm 0.0061	0.838	1.058

Values \pm asymptotic standard error; R^2 = determination coefficient adjusted for degrees of freedom; A_f = fitting accuracy factor of the models.

5.4.3 - Total phenolic compounds

Total phenolic content in carrot juices ranged from 30.61 to 34.10 mg/100 g just after processing (Figure 3). These values are in accordance with those reported in the literature. Alasalvar et al. (2005) reported 34.8 and 102 mg/100 g of total phenolic compound for orange and purple carrot, respectively.

On the other hand, there were no significant difference ($p < 0.05$) between total phenolic compound in fresh, thermally and HIPEF-treated carrot juice (Table 1). Odriozola-Serrano et al. (2007) studied the total phenolic compound in tomato juice processed by HIPEF (35 kV/cm for 1500 μ s in bipolar 4- μ s pulses at 100 Hz), pasteurized (90°C/30 s or 90°C/60 s) and fresh juice and observed no difference among them in total phenolic content. As can be seen in Figure 3, no significant ($p < 0.05$) changes in total phenolic compounds of carrot juice during 56 days of cold storage were obtained. Consistently, Dewanto et al. (2002) did not find significant differences in total phenolic content between thermally treated and fresh tomato puree. The maintenance of total phenolic compounds during storage might be due to inactivation of oxidative enzymes responsible for its degradation. In fact, on our work the residual POD activity decreased significantly being less than 6.7% (Table 1) for all treated carrot juice. POD is the main enzyme implicated in reactions that are associated with loss of quality in vegetable juices. In addition, this enzyme is involved in the oxidative degradation of phenolic compound (Amiot et al., 1997).

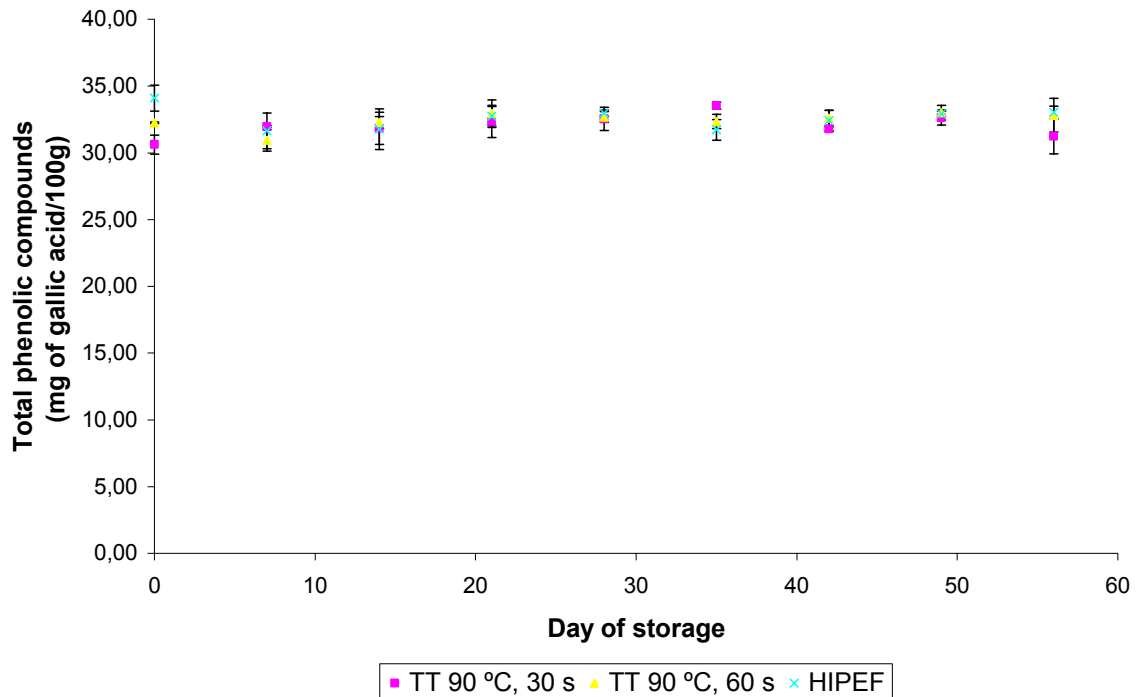


Figure 3 - Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on total phenolic compound of carrot juice throughout storage at 4°C. TT = thermal treatment. Data shown are mean \pm standard deviation.

5.4.4 - Residual POD activity

As can see in Table 1, residual POD activity was reduced drastically after processing for thermal pasteurization and HIPEF treatment. There was no significant difference ($p < 0.05$) among thermal and HIPEF treatment. Therefore, HIPEF was as effective as thermal treatments. These results contrast with the higher inactivation reported by Elez-Martínez et al. (2006) that obtained 100% of POD inactivation on orange juice for HIPEF treatment and thermal process. These differences in POD residual activity can be attributed to different enzyme source. Zanatta et al. (2006) reported 15% of POD residual activity in guava after 80°C for 10 min. Moreover there are complex systems of POD isoenzyme in vegetable and one part of them is more heat-resistant than the other (Tijskens et al., 1997).

The enzyme inactivation throughout storage was not significantly ($p < 0.05$) dependent on the storage time. Regarding thermal and HIPEF processing, both technologies yielded low stable enzyme activity during 56 days, thus indicating that the changes induced in the enzyme structure were irreversible for both treatments. Therefore,

HIPEF processing can be a good alternative to heat processing in order to reduce oxidation of natural compounds and to avoid undesirable POD-mediated reactions on carrot juice processed by HIPEF and storage at 4°C.

5. 4.5 - Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of carrot juice is related to the amount and composition of bioactive compound such as vitamin C, carotenoids and phenolic compound (Gardner, et al., 2000; Dumas et al., 2003). The effects of processing and storage conditions on the DPPH radical scavenging capacity (RSC) are shown in Figure 4.

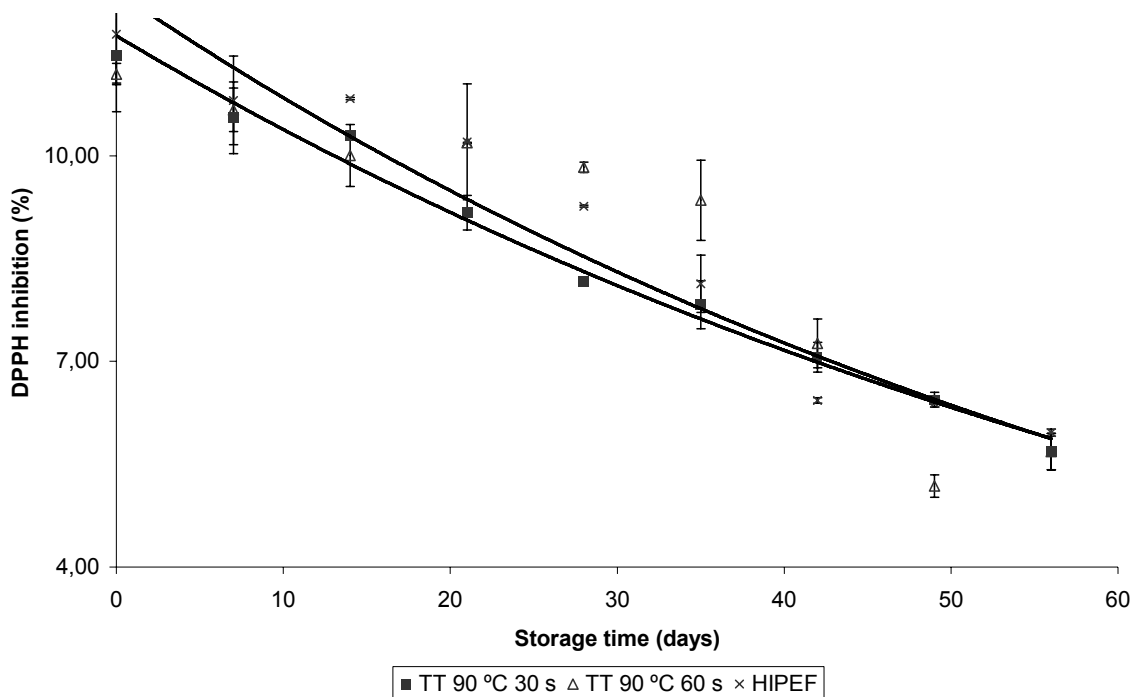


Figure 4 – Effects of HIPEF treatment and heat pasteurization on antioxidant capacity of carrot juice throughout storage at 4°C. TT = thermal treatment. Data shown are mean ± standard deviation.

Inhibition of DPPH at first day storage for untreated, mild pasteurized, high pasteurized and HIPEF-treated carrot juice was 12.87%, 11.46%, 11.19%, and 11.77% respectively. There were no significant differences ($p < 0.05$) (Table 1) between treated and fresh products. Therefore, the treatment did not affect the DPPH inhibition of carrot juices versus the fresh juice just after processing. The same results were obtained by Odriozola-Serrano et al (in press) in tomato juice after treating the juice by HIPEF or

thermal treatment taking a fresh tomato juice as a reference. Consistently, Elez-Martínez et al. (2006) found no statistically significant ($p < 0.05$) differences between the estimated means for DPPH inhibition of untreated and HIPEF-processed orange juice. The same results were reported by Sánchez-Moreno et al. (2005). Heat processing causes no change in the antioxidant capacity of fruit and vegetables due to the formation of novel compounds such as Maillard reaction products having antioxidant activity (Manzocco et al., 2001). Heat processing may form β -carotene from other carotenoids that have different antioxidant capacity (Marx et al., 2003). The formation of some compounds compensates for the depletion of others such vitamin C so that no change in antioxidant capacity occurs. Thus, according to the literature, just after processing vegetable both by heat or by HIPEF did not occur significant difference on antioxidant capacity.

The antioxidant capacity of carrot juice depleted ($p < 0.05$) with cold storage irrespective of the treatment applied (Figure 4). The same trend was found by Elez-Martínez et al. (2006) and Odriozola-Serrano et al (2007). In general, antioxidant capacity in treated carrot juice decreased from 11.8% to 5.5% of initial DPPH inhibition at 56 days of storage.

The first-order kinetic model predicted well the antioxidant capacity depletion as a function of storage time (Table 4).

Table 4 - First-order kinetic rate constants (k) and determination coefficients (R^2) for the degradation of antioxidant capacity of treated carrot juice during storage at 4°C for 56 days.

Treatment	C_0	k (days ⁻¹)	R^2	A_f
90°C/30 s	11.66 ± 0,17	0.012 ± 0.005	0.965	1.020
90°C/60 s	11.89 ± 0.49	0.011 ± 0.001	0.851	1.104
HIPEF	12.05 ± 0.32	0.012 ± 0.005	0.914	1.056

Values ± asymptotic standard error; R^2 = determination coefficient adjusted for degrees of freedom; A_f = fitting accuracy factor of the models.

The first-order kinetic model fitted the experimental data with good agreement ($R^2 > 0.851$ and accuracy factor was very close to 1). This result was according to observed by Odriozola-Serrano et al (2007) that obtained a first-order kinetic model to describe the decreased of antioxidant capacity in tomato juice as a function of storage time.

5.5 - CONCLUSIONS

HIPEF processing (35 kV/cm for 1500 μ s with 6- μ s bipolar pulses at 200 Hz) can produce stable carrot juice during storage at 4°C comparable to that achieved with two thermal processing (90°C/30s and 90°C/60 s). Moreover, carrot juice HIPEF-treated shows higher vitamin C content and similar values for β -carotene, antioxidant capacity, POD inactivation and total phenolic than carrot juice thermally processed. Based on depletion of vitamin C = 50%, the HIPEF-treated carrot juice shelf life can be set in 28 days, being lower in thermally pasteurized carrot juices. There was a rise of β -carotene just after processing for all treated carrot juice. Regarding to storage time, a depletion of B-carotene, antioxidant capacity and vitamin C of carrot juice was observed for HIPEF and thermal treatment. More information, as microbial inactivation is needed to establish a shelf life of carrot juice treated by HIPEF. In addition, further research dealing with the effects of HIPEF treatments on enzymes should be addressed to reach higher levels of inactivation, to study changes in aromatic compound and sensorial analysis on carrot juice for to make feasible a scale-up of HIPEF technology for this product in industrial processing.

5.6 – ACKNOWLEDGMENTS

This study has been carried out with financial support from the Commission of the European Communities, Framework 6, Priority 5 'Food Quality and Safety', Integrated Project NovelQ FP6-CT-2006-015710.

We thank to “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES)/Brazil that awarded the author Luciano José Quintão Teixeira a pre-doctoral sandwich grant.

5.7 - REFERENCES

Alasalvar, C.; Al-Farsi, M.; Quantic, P.C.; Shahidi, F.; Wiktorowicz, R. (2005). Effect of chill storage and modified atmosphere packagin (MAP) on antioxidant activity,

anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, 89, 69-76.

Amiot, M.J., Fleuriet, A., Cheynier, V., & Nicolas, J. (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruits and vegetables. In F.A. Tomás-Barberán, & R.J. Robins, *Phytochemistry of fruit and vegetables* (pp. 51-85). Oxford: Science Publications

Aubert, S. (1981). La carrote. *Cahiers de Nutrition et Dietetique*, 16 (3), p. 173-188.

Barsotti, L.; Dumay, E.; Mu, T.H.; Fernández, M.D.; Cheftel, J.C. (2002). Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends in Food Science Technology*, 12, 136-144.

Block, G.; Norkus, E.; Hudes, M.; Mandel, S. and Helzlsouer, K. (2001). Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? *American Journal of Epidemiology*, 154, 1113–1118.

Bramley, P.; Teuliers, C.; Blain, I.; Bird, C.; Schuch, W. (1992). Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoids synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to p TOM5. *Plant J.* 1992, 2, 343–349.

Bruemmer, J.H.; Roe, B.; Bowen, E.R. (1976). Peroxidase reactions and orange juice quality. *Journal of Food Science*, 41, 186-189.

Chen, C. S.; Shaw, P.E.; Parish, M.E. (1993). Orange and tangerine juices. In Nagy, S.; Chen, C. S; Shaw, P.E (eds.) *Fruit juice processing technology* (110-165 p.)

Cortés, C., Esteve, M.J., Rodrigo, F., Torregrosa, F., & Frígola, A. (2006). Changes of colour and carotenoids contents during high-intensity pulsed electric field treatment in orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 44(11), 1932-1939.

De Ancos, B.; Sgroppo, S.; Plaza, L.; Cano, M.P. (2002). Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 790-796.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., & Liu, R. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing the total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014.

Dumas, Y.; Dadomo, M.; Di Lucca, G.; and Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 369-382.

Elez-Martínez, P.; Soliva-Fortune, C.; Martín-Belloso, O. (2006). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment. *European Food Research Technology*, 222, 321-329.

Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. (2007). Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102, 201-209.

Espachs-Barroso, A. G., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín-Belloso, O. (2003). Microbial and enzymatic changes in fruit juice by high intensity pulsed electric fields. *Food Reviews International*, 19, 253–273.

Fraga, C.G.; Motchnik, P.A.; Shigenaga, M.K.; Helbock, H.J.; Jacob, R.A.; Ames, B.N. (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceeding of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 88, 11003-11006.

Gardner, P.T. White, T.A.C. McPhail, D.B. and Duthie, G.G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68, 471–474.

Hornero-Méndez, D. and Minguez-Mosquera, M.I. (2007). Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 407-412.

Lima, K.S.C.; Grossi, J.L.S.; Lima, A.L.S. ; Alves, P.F.M.P. (2001). Efeito da irradiação ionizante γ na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota* L.) cv. Nantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(2), 202-208, 2001.

Ling, A.C. and Lund, D.B. (1978). Determination kinetic parameters for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isoenzymes from thermal destruction curves. *Journal of Food Science*, 43, 1307-1310.

Kim, H.; Gerber, I.E. (1998). Influence of processing on quality of carrot juice. *Journal of Food Science*, 20(5): 683-690.

Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.C.; Lerici, C.R. (2001). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9-10), 340-346.

Martín, O.; Qin, B.L.; Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20, 317-336.

Marx, M.; Stuparic, M.; Schieber, A.; Carle, R. (2003). Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, 83, 609-617.

Mawele S.; Timothy, D.; Benoit, G. (1996). Water Blanching Effects on Headspace Volatiles and Sensory Attributes of Carrots. *Journal of Food Science*, 61(6), 1191-1195.

Min, S.; Jin, Z.T.; Zhang, Q.H. (2003). Commercial scale pulsed electric field processing of tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3338-3344.

Morales-Blancas, E.F.; Chandia, V.E.; Cisneros-Zevallos, L. (2002). Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science*, 67, 146-154.

Nagy, S.; Chen, C.S.; Shaw, P.E. (1993). Fruit juice processing technology. Florida: Auburndale, Agscience.

Odriozola-Serrano, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso. (2007) Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.07.009.

Olson, J.A. (1989). Biological actions of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 128, 94-95.

Polydera, A.C.; Stoforos, N.G.; Taoukis, P.S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice, *Journal of Food Engineering*, 60, 21-29.

Qin, L.; Xu, S.; Zhang, W. (2005). Effect of enzymatic hydrolysis on the yield of cloudy carrot juice and the effects of hydrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 505-512.

Quintão-Teixeira, L.J.; Aguiló-Aguayo, I.; Ramos, A.M.; Martín-Belloso, O. (2007). Inactivation of oxidative enzymes by high-intensity pulsed electric field for retention of color in carrot juice. *Food Bioprocess Technology*, DOI: 10.1007/s11947-007-0018-x

Ramos, A.M.; Teixeira, L.J.Q.; Stringheta, P.C.; Chaves, J.B.P.; Gomes, J.C. (2006). Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. *Ceres*, 53(308), 425-438.

Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A.; Barbosa-Cábricas, G.V.; Rodrigo, M. (2006). Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *LWT*, 39, 1163-1170.

Rodrigo, D.; Arrans, J.I.; Koch, S.; Frígola, M.C.; Rodrigo, M.C.; Esteve, M.J.; Calvo, C.; Rodrigo, M. (2003). Physicochemical characteristics and quality of refrigerated spanish Orange-carrot juices and influence of storage conditions. *Journal of Food Science*, 68 (6), 2111-2116.

Roos, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriol*, 81, 501-508.

Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Ancos B. and Cano, P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 430-439.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., de Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant capacity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403-4409.

Selman, J.D. (1994). Vitamin retention during blanching of vegetables. *Food Chemistry*, 49, 137-147.

Shaw, P.E. (1992). Shelf-life and aging of citrus juices, juice drinks and related soft drinks. In J.B. Redd, P.E. Shaw, Jr. C.M. Hendrix, D.L. Hendrix, Quality control manual for citrus processing plants (173-199). Florida: Auburndale, Agscience.

Singleton, V.L., Orthofer, R.M., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Soysal, Ç. and Söylemez, Z. (2005). Kinetics and inactivation of carrot Peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 68, 349-356.

Tijskens, L.M.M.; Rodis, P.S.; Hertog, M.L.A.T.; Waldron, K.W.; Ingham, I.; Proxenia, N.; van Dijk, C. (1997). Activity of peroxidase during blanching of peaches, carrots and potatoes. *Journal of Food Engineering*, 34, 355-370.

Thomas, C.K. and Irwin, L.G. (2005). Relationship of carotenoids and tocopherols in a sample of carrot root-color accessions and carrot germplasm carrying *rp* and *rp* Alleles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 325-331.

Tonucci, L.H.; Holden, J.M.; Beecher, G.R.; Khachik, F.; Davis, C.S.; Mulokozi, G. (1995). Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43 (24), 579-586.

Torregrosa, F.; Cortés, C.; Esteve, M.J.; Frígola, A. (2006). Effect of high-intensity pulsed electric fields processing and conventional heat treatment on orange-carrot juice carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24), 9519-9525.

Zanatta, C.L.; Zotarelli, M.F.; Clemente, E. (2006). Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3): 705-708.

Zhang, Q.; Tan, S.; McKay, A.; Yan, G. (2005). Carrot browning on simulated market shelf and during cold storage. *Journal of Food Science and Agriculture*, 85, 16-20.

CAPÍTULO 6 – AVALIAÇÃO DURANTE A ESTOCAGEM DO SUCO DE CENOURA PROCESSADO POR CEPAI E POR TRATAMENTO TÉRMICO

6.1 - RESUMO

Neste trabalho foi comparada a eficiência dos CEPAI com relação a dois tratamentos térmicos distintos, tendo o suco fresco de cenoura como referência. Os diferentes tratamentos foram analisados quanto à inativação da pectinesterase, quanto à aceitação sensorial do suco logo após os tratamentos e também quanto à estabilidade físico-química do suco de cenoura tratado durante 56 dias de armazenamento a 4°C. Quanto a lipoxigenase, não houve atividade residual no suco fresco, bem como nos demais tratamentos aplicados. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e nem variação ao longo do tempo de armazenamento para os valores de pH, sólidos solúveis e viscosidade. A estabilidade quanto à turbidez do suco, bem como a avaliação sensorial foi melhor para o suco de cenoura tratado via CEPAI do que aqueles pasteurizados termicamente. Todos os tratamentos aplicados foram suficientes para inativar completamente a pectinesterase. Conclui-se que, para as variáveis estudadas, os CEPAI conferem melhor qualidade ao suco de cenoura do que os tratamentos térmicos, visto que o suco tratado via CEPAI apresentou melhor aceitação sensorial e melhor estabilidade da turbidez do que os submetidos ao tratamento térmico. Para as demais variáveis testadas (pH, sólidos solúveis e viscosidade), os resultados foram análogos em todos os tratamentos.

Palavras-chave: suco de cenoura, pulsos elétricos, estabilidade

6.2 - ABSTRACT

In this work, the efficiency of high intensity pulsed electric field (HIPEF) treatment or two different heat treatments was compared taking the fresh carrot juice as a reference. The different treatments were analyzed for pectin methyl esterase inactivation, acceptance sensory analysis of carrot juice just after processing, as well as physical-chemical stability of carrot juice treated during 56 days of storage at 4°C. As lipoxigenase there was no residual activity in fresh carrot juice as well on treated juices. There was no significant difference ($p < 0.05$) between treatments just after processing and did not change throughout storage time was observed for the values of pH, soluble solids and viscosity. Cloud stability as well as acceptance sensory analysis was better in the carrot juice treated by HIPEF than that pasteurized thermally. All treatments were sufficient to completely inactivate the pectin methyl esterase. Therefore, for studied variables, carrot juice processed by HIPEF attempt high quality than that submitted to heat treatment, because HIPEF treated juices presented better acceptance sensorial analysis and higher cloudy stability. For other tested parameters (pH, soluble solids and viscosity) the results were similar to thermal treatments.

Key words: carrot juice, electric fields, stability

6.3 - INTRODUÇÃO

Atualmente, tem crescido muito a demanda por produtos que sejam minimamente processados, que possuam sabor e aroma próximos do produto natural, que tenham alto valor nutritivo e que possa ser armazenado por um período suficiente para ser distribuído e consumido (Dede et al., 2007). Devido ao seu alto valor nutricional e reduzido valor calórico, o consumo de frutas e hortaliças vem aumentando significativamente nos últimos anos (Branco et al., 2007; Teixeira et al., 2006). Além disso, o consumo de frutas e hortaliças reduz o risco de incidência de certas doenças tais como doenças do coração, diabete do tipo 2, obesidade e câncer (Amiot et al., 1997; Block et al., 2001; Sánchez-Moreno et al., 2003). Por isso, a produção de sucos refrigerados de frutas e hortaliças, bem como suas misturas, tais como o suco de cenoura com laranja tem aumentado muito nesta última década, principalmente nos países industrializados (Rodrigo et al., 2003). Consequentemente está havendo grande expansão da agroindústria de frutas e hortaliças,

principalmente na indústria de sucos, a qual tem uma expressiva importância econômica no Brasil (Branco et al., 2007).

A cenoura é rica em compostos bioativos benéficos à saúde, tais como compostos fenólicos e carotenóides, principalmente o β -caroteno (Howard et al., 1995). Ela também é uma boa fonte de fibras e minerais (Qin et al., 2005). Industrialmente, ela pode ser processada em vários produtos como cenoura em conserva, congelada, desidratada, cenourete, e suco. Dentre as hortaliças, ela desempenha um papel importante na geração de renda no campo. Além disso, o suco de cenoura é um dos mais populares entre os sucos de hortaliças (Marx, 2003). Por isso, este pode ser um nicho de mercado a ser explorado pelo Brasil.

O suco de cenoura é um produto perecível e por isso precisa ser estabilizado. O tratamento térmico tem sido o método empregado para promover a estabilização de sucos de frutas e hortaliças (Servili et al., 2000). O tratamento térmico é, sem dúvida, um método eficiente na conservação dos alimentos. Contudo, uma série de alterações indesejáveis ocorre nos alimentos tratados pelo calor, surgindo assim vários subprodutos de reações ativadas pela enorme quantidade de energia transferida ao alimento. Tais alterações devem-se ao cozimento do produto e suas conseqüências nos aspectos físicos, sensoriais e nutritivos do alimento tais como alterações no sabor, na aparência, na textura e a destruição de vitaminas e outros compostos bioativos que sejam termolábeis (Mawele et al., 1996; Espachs-Barroso et al., 2003; Rivas et al., 2006). Assim, tem crescido a procura por tecnologias de processamento alternativas que não necessitem do emprego do calor.

A aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI) para o tratamento de alimentos é uma promissora alternativa não-térmica aos tratamentos tradicionais (Martín et al., 1997; Ramos et al., 2006). A tecnologia CEPAI pode complementar o tratamento térmico ou substituí-lo completamente, sem o inconveniente da degradação das propriedades nutricionais e sensoriais causadas pelo tratamento térmico, uma vez que se pode trabalhar com CEPAI à temperatura ambiente ou a temperaturas de refrigeração, e ainda assim conseguir uma eficiente redução microbiológica quanto a inativação enzimática (Barbosa-Cánovas et al., 1999). Com isso, minimizam-se as alterações causadas nos alimentos durante o seu processamento.

Pectinesterase (PE; EC 3.1.1.11) é uma enzima que está presente em várias frutas e hortaliças, incluindo a cenoura. Ela atua hidrolisando as ligações éster-metílicas na molécula da pectina (desesterificação), formando metanol e ácido péctico. A atuação da pectinesterase inicia uma série de eventos que conduz a uma precipitação de substâncias que estavam em suspensão com conseqüente perda de turbidez (Kim et al., 2001). Assim, a existência PE ativa, causa perda de estabilidade, ocasionando assim, a formação de precipitado e diminuindo a turbidez do suco de cenoura. A turbidez é juntamente com a cor, um dos principais atributos de qualidade que influencia a escolha do consumidor no momento da compra (Simon, 1985). A cenoura possui cerca de 1% de pectina (Massiot et al., 1987). Dessa forma, a inativação da PE em suco de cenoura é importante no sentido de se obter um suco estável quanto à turbidez durante o armazenamento deste produto.

A lipoxigenase (LOX) é uma enzima que catalisa a oxidação de ácidos graxos insaturados ocasionando assim, perdas no valor nutricional e produzindo sabores e aromas estranhos como o hexanal e o pentanal (Kim et al., 1987).

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência da aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade com dois tratamentos térmicos de referência na estabilização do suco de cenoura quanto às características físico-químicas, atividade enzimática e atributos sensoriais logo após serem processados e ao longo do tempo de armazenamento.

6.4 - MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 - Obtenção do suco de cenoura

Foram utilizadas cenouras (*Daucus carota*) da variedade nanteza compradas no mercado local da cidade de Lleida/Espanha. As cenouras foram selecionadas, cuidadosamente lavadas e cortadas transversalmente com o auxílio de uma faca de aço inoxidável. O suco foi extraído utilizando-se uma centrífuga extratora de sucos vegetais “tipo doméstica” (Bifinett, KompernaB GmbH, Bochum, Germany), obtendo um rendimento de aproximadamente 50% (p/p) de suco em relação ao peso de cenoura.

Imediatamente após a extração, o pH do suco de cenoura foi determinado por leitura em pHmetro (2001 pH meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain). O valor de $\text{pH} = 6,20 \pm 0,02$, obtido no suco, foi ajustado pela adição de ácido cítrico

concentrado (50% p/p), segundo prática industrial para valor de pH = 3,8. Após a acidificação, o suco de cenoura foi filtrado por meio de um aparato provido de filtro de tecido fino, quitasato e uma bomba de vácuo.

Finalmente o suco de cenoura passou por uma etapa de desaeração que foi realizada com a finalidade de se retirar todas as bolhas de ar presente do suco para minimizar a ocorrência do fenômeno de ruptura dielétrica na câmara de aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade durante o processamento. A desaeração foi realizada com auxílio de uma bomba de vácuo e um agitador magnético por um período de 5 minutos. Após esta etapa, o suco foi armazenado a 4°C por um período de no máximo duas horas antes de seguir para a aplicação dos tratamentos seja com pulsos elétricos ou tratamento térmico.

6.4.2 - Aplicação dos campos elétricos pulsados

A aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI) foi realizada em um equipamento OSU-4F HIPEF unit (The Ohio State University, Columbus, Ohio) de fluxo contínuo. O sistema de aplicação dos CEPAI inclui o gerador de alta voltagem; câmara de tratamento; uma bomba peristáltica (model 75210-25 Cole Palmer, Vernon Hills, III); banho de água e gelo para manter o produto tratado em temperaturas inferiores a 40°C; termostatos para indicação correta da temperatura na entrada e saída da câmara de tratamento; painel de controle para introdução dos parâmetros de tratamento e osciloscópio para controle das propriedades elétricas do tratamento tais como: frequência, intensidade do campo elétrico aplicado e comprimento dos pulsos elétricos.

Foi utilizado um campo elétrico de 35 kV/cm de intensidade e pulsos elétricos bipolares de 6 μ s de comprimento aplicados a uma frequência de 200 Hz. O tempo total de tratamento realizado foi de 1500 μ s. Estes parâmetros elétricos foram selecionados em trabalhos prévios (Quintão-Teixeira et al., 2007) como sendo aqueles que garantem uma maior inativação enzimática da enzima peroxidase e melhor manutenção da cor em suco de cenoura estabilizado via CEPAI.

6.4.3 - Tratamento térmico

As amostras dos sucos de cenoura foram submetidas a um trocador de calor tubular de bancada provido de bomba peristáltica com controle de fluxo, sistema de aquecimento, sistema de resfriamento e termopares para controle da temperatura (Universitat de Lleida, Lleida, Spain). Foram aplicados dois tratamentos térmicos: (90°C/30 s) e (90°C/60 s). Estes valores foram escolhidos baseados na literatura (Nagy et al., 1993), segundo a qual sucos vegetais são submetidos a tratamentos térmicos de 90 a 95°C por um período de 15 a 60 s. Os parâmetros de tratamento térmico empregados neste trabalho são os mesmos adotados por Odriozola-Serranos et al. (2007) para suco de tomate e também empregados por Eléz-Martínez et al. (2006) em suco de laranja.

6.4.4 – Estabilidade durante o armazenamento

Amostras de suco de cenoura fresco, tratadas por CEPAI e pasteurizadas termicamente em duas condições diferentes foram envasadas em potes de polietileno de 100 mL e armazenadas em ambiente escuro à temperatura de 4°C. As análises foram realizadas imediatamente após o processamento, e, posteriormente, a cada semana durante o tempo de armazenamento. A análise sensorial foi feita apenas no primeiro dia.

6.4.5 - Análise sensorial

A análise sensorial para este experimento foi realizada no laboratório de análise sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos (Lleida/Espanha). As amostras foram servidas individualmente em copos descartáveis de 50 mL codificados com três números escolhidos ao acaso. O teste foi realizado em cabines individuais de acordo com as recomendações sugeridas por Chaves e Sproesser (1999).

Foram analisados, por 30 provadores não treinados, os atributos de cor e aroma conforme ilustrado na Figura 1.

Foi utilizada a escala não estruturada de 9 cm para os atributos de aroma e cor. A posição marcada pelos provadores foi medida com uma régua transformando assim, cada resposta em um número, sendo que o valor zero corresponde a desgostei extremamente e 9 a gostei extremamente.

Nome: _____ data: ____/____/2007 sexo: M () F ()
 Por favor, avalie a amostra de suco de cenoura utilizando a escala abaixo, para cada um dos atributos apresentados marcando um traço na vertical na posição que melhor reflita o seu julgamento, descrevendo assim o quanto você gostou ou desgostou do produto.
 Código da amostra: _____

Cor: Desgostei extremamente nem gostei nem desgostei gostei extremamente

|-----|-----|

Aroma: Desgostei extremamente nem gostei nem desgostei gostei extremamente

|-----|-----|

Comentários: se necessário utilize o verso para fazer os seus comentários.

Figura 1 – Ficha de análise sensorial utilizada no teste de aceitação.

6.4.6 - Estabilidade do suco quanto à turbidez

Foi utilizado o método proposto por Qin et al. (2005). Uma amostra de 10 mL de suco de cenoura foi centrifugada a 1200 x g durante 30 minutos utilizando uma centrífuga (Centrifuge AVANTI™ J-25, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). A estabilidade foi definida como sendo a absorvância a 660 nm do sobrenadante lida diretamente em um espectrofotômetro CECIL CE 2021 spectrophotometer (Cecil Instruments Ltd, Cambridge, UK). Quanto maior a absorvância apresentada, maior foi a opacidade (turbidez) do suco e, portanto, maior a sua estabilidade.

6.4.7 - Pectinesterase (PE)

A atividade da pectinesterase foi medida por meio do método descrito por Eléz-Martínez et al. (2007) com algumas adaptações. Os reagentes pectina, cloreto de sódio e NAOH foram adquiridos na Scharlab Chemie, SA (Barcelona, Spain).

Alíquota de 10 mL de suco de cenoura a 30°C foi misturado a 20 mL de uma solução salina de pectina (1% de pectina e 1,5% de NaCl) e incubado a 30°C. A solução resultante foi então ajustada para pH = 7,0 com o auxílio de uma solução de NaOH (2 N) e em seguida elevou-se o pH para 7,7 utilizando uma solução de NaOH (0,05 N). Depois de estabelecido estas condições (pH = 7,7 e temperatura de 30°C), adicionou-se 0,10 mL de NaOH (0,05 N). O tempo para o pH retornar a 7,7 foi então medido.

A atividade de PE (A) expressa em unidades de PE foi calculada de acordo com a equação 1:

$$A = \frac{[NaOH]V_{NaOH}}{V_{suco}.t} \quad (1)$$

Onde [NaOH] é a concentração de NaOH (0,05 N), V_{NaOH} é o volume de NaOH (0,10 mL), V_{suco} é o volume de suco usado (10 mL) e t é o tempo (em minutos) necessário para o valor de pH retornar a 7,7.

A atividade residual de PE em porcentagem foi definida pela equação 2

$$AR = 100 \cdot \frac{A_t}{A_0} \quad (2)$$

Onde A_t é a atividade enzimática após o tratamento do suco e A_0 é a atividade enzimática inicial, ou seja, do suco fresco.

6.4.8 - Lipoxigenase

A atividade da lipoxigenase (LOX) foi medida baseada no método proposto por Kim et al. (1987) com algumas modificações. Todos os reagentes foram adquiridos do

Scharlab Chemie, SA (Barcelona, Espanha). O extrato enzimático foi obtido centrifugando a 10.000 x g por 10 minutos, 20 mL de suco de cenoura com 5 mL de tampão triton (pH = 6,5). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº 1), constituindo assim o extrato enzimático.

A atividade da LOX foi analisada espectrofotometricamente. Em uma cubeta de quartzo adicionou-se 2 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH = 6), 40 µL de solução de ácido linoléico (60%), e 100 µL de extrato enzimático. A absorvância foi medida a 234 nm e o seu valor anotado a cada 5 s durante 2 minutos.

Uma unidade de atividade de LOX foi definida como sendo a variação da absorvância por mL de extrato por minuto ($\Delta_{\text{absorbância}}/\text{mL}\cdot\text{min}$).

6.4.9 - Viscosidade

A viscosidade cinemática foi medida em um Viscosímetro Capilar de Rotina: Cannon-Fenske, da marca SCHOTT-GERATE, Hofheim adquirido da empresa AFORA SA (Barcelona, Espanha, 2007). Utilizou-se um capilar N° 5354/2 (serie 50) escolhido por meio de procedimentos recomendados pelo fabricante. Mediu-se o tempo de escoamento do fluido e a viscosidade foi calculada conforme descrito no manual do fabricante (SCHOTT-GERATE GmbH). A temperatura foi mantida a $25 \pm 0,8^\circ\text{C}$. A viscosidade dinâmica foi obtida multiplicando-se a viscosidade cinemática a 25°C pela densidade do suco de cenoura também a 25°C .

6.4.10 - pH e sólidos solúveis

O valor de pH do suco de cenoura foi determinado em um pHmetro (2001 pH meter, Crison Instruments SA, Alella, Barcelona, Spain).

O teor de sólidos solúveis do suco de cenoura foi medido diretamente em um refratômetro de bancada (Atajo RX-100 refractometer, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan) e o resultado expresso em °Brix que representa a % (m/m) de sacarose solúvel em uma solução a 20°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A temperatura da amostra foi mantida a 20°C durante a análise.

6.4.11 - Análise estatística

Para avaliação das variáveis dos atributos sensoriais (cor e aroma), pH, sólidos solúveis, viscosidade, turbidez, atividade residual das enzimas (pectinesterase e lipoxigenase) após o processamento, os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições e as análises foram realizadas em duplicata. Os dados foram interpretados por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Os ensaios para avaliar o comportamento das variáveis descritas acima, exceto para os atributos sensoriais das amostras de suco de cenoura estocados sob refrigeração, procedeu-se no esquema de parcela subdividida, sendo os tratamentos alocados na parcela e o tempo de estocagem na subparcela. Os dados foram interpretados por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de probabilidade.

Os dados foram analisados por regressão não-linear utilizando o modelo de 1ª ordem Fracional (Eq. 3) proposto por Soliva-Fortuny et al. (2006) para descrever o comportamento da turbidez do suco de cenoura durante o tempo de armazenamento a 4°C.

$$E = E_{\infty} + (E_0 - E_{\infty}).Exp(-k.t) \quad (3)$$

Onde, E é a estabilidade quanto a turbidez do suco de cenoura (dada pela absorvância a 660 nm) depois de um tempo t (em dias); E_{∞} é a estabilidade do suco depois de um tempo muito grande; E_0 é a estabilidade no tempo zero (primeiro dia de armazenamento); k é uma constante de regressão (dia^{-1}).

Para avaliar se o modelo de regressão não linear se ajustou bem aos dados obtidos foi utilizado o coeficiente de determinação R^2 e o fator de acurácia F_a . O fator de acurácia foi proposto por Ross (1996) para avaliar o desempenho do ajuste de modelos e é calculado de acordo com a Equação (4).

$$F_a = 10^{\frac{\sum_{j=1}^J \left| \log \left(\frac{\text{valor-calculado}_j}{\text{valor-observado}_j} \right) \right|}{J}} \quad j = 1, 2, 3, \dots J \quad (4)$$

Onde F_a é o fator de acurácia calculado para J observações experimentais e J valores calculado através do modelo matemático obtido. Quanto mais próximo de 1 for o fator de acurácia, mais acurado é o modelo significando que ele apresentou bom ajuste. Todos os procedimentos foram realizados utilizando o programa Statgraphics Plus v.5.1 Windows package (Statistical Graphics Co., Rockville, Md).

6.5 - RESULTADO E DISCUSSÃO

Os dados obtidos após o processamento do suco de cenoura, ou seja, dados relativos ao primeiro dia (tempo de armazenagem = 0) referentes às análises físico-químicas, atividade enzimática e teste de aceitação sensorial estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeito dos parâmetros estudados no suco de cenoura fresco processado via CEPAI e por dois tratamentos térmicos distintos (90°C/30 s e 90°C/60 s).

Parâmetros	Suco fresco	CEPAI	(90°C/30 s)	(90°C/60 s)
pH	3,85 a	3,85 a	3,83 a	3,84 a
SS (°Brix)	8,25 a	8,15 a	8,05 a	8,20 a
PE residual (%)	100 a	0 b	0 b	0 b
Viscosidade (mPa.s)	1,21 a	1,21 a	1,21 a	1,23 a
Turbidez	0,190 a	1,471 b	0,502 c	0,491 c
Análise sensorial				
Cor	6,81 a	7,41 b	6,75 a	6,83 a
Aroma	7,02 a	6,64 a	6,67 a	5,58 b

SS = Sólidos solúveis

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

6.5.1 - Análise sensorial

Quanto à cor, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o suco fresco e os sucos pasteurizados termicamente (Tabela 1). Por outro lado, o suco de cenoura estabilizado via CEPAI teve melhor aceitação do que o suco fresco e do que aqueles estabilizados termicamente. Isto pode ser explicado pelo fato de que a aplicação dos CEPAI conferiu maior estabilidade quanto à turbidez. Isto parece ter dado um aspecto mais homogêneo à cor do suco de cenoura, influenciando positivamente os provadores.

Quanto ao aroma, os provadores não perceberam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o suco fresco, o tratado termicamente por $90^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ e aquele tratado via CEPAI. Contudo, O suco que recebeu o tratamento térmico mais rigoroso ($90^{\circ}\text{C}/60\text{s}$) foi o que apresentou menos aceitação ($p < 0,05$).

Na literatura encontra-se descrito que produtos tratados via aplicação dos CEPAI possuem melhor aceitação sensorial do que aqueles tratados termicamente (Rivas et al., 2006; Min et al., 2003). Os resultados encontrados foram análogos aos da literatura para a avaliação da cor e do aroma.

6.5.2 - Estabilidade quanto à turbidez do suco

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, os tratamentos melhoraram a estabilidade do suco de cenoura quando comparados com o suco fresco, sendo que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois tratamentos térmicos. Nota-se também que os CEPAI conferiram estabilidade muito superior aquela proporcionada pelo tratamento térmico. Esta diferença foi visível como ilustrado na Figura 2.



Figura 2 – Suco de cenoura após uma semana de armazenamento a 4°C. Da esquerda para a direita tem-se: suco fresco de cenoura; pasteurizados (90°C/30s e 90°C/60 s); tratado via CEPAI.

Quanto ao tempo de armazenamento, a estabilidade apresentou diminuição exponencial no início e tendeu a um valor constante depois de algumas semanas Figura 3. Por isso, os dados foram ajustados para o modelo de regressão não linear de primeira ordem fracional.

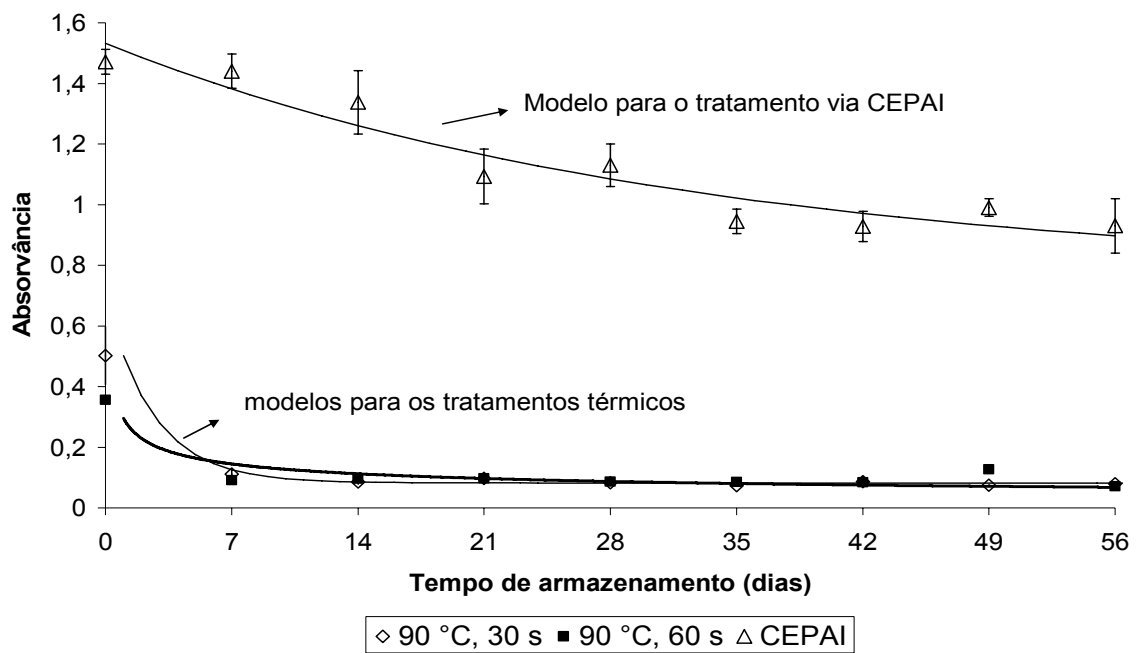


Figura 3 – Estabilidade (turbidez) do suco de cenoura, durante o armazenamento a 4°C, tratado via CEPAI e por dois distintos tratamentos térmicos.

O modelo ajustou-se adequadamente (Tabela 2), apresentando R^2 superior a 0,891 e fator de acurácia muito próximo a 1. Conforme o modelo apresentado, verificou-se que o tratamento via CEPAI conferiu maior estabilidade ao suco de cenoura do que os tratamentos térmicos, tanto logo após o tratamento (observe o valor de E_0) como durante o armazenamento (observe o valor de E_{∞}).

Tabela 2 – Parâmetros de regressão para o modelo que descreve o comportamento da estabilidade do suco de cenoura com o tempo de armazenamento.

Tratamentos	E_{∞}	E_0	k	R^2	F_a
CEPAI	$0,768 \pm 0,141$	$1,532 \pm 0,041$	$0,031 \pm 0,01$	0,891	1,052
90°C/30 s	$0,082 \pm 0,007$	$0,502 \pm 0,008$	$0,377 \pm 0,094$	0,963	1,055
90°C/60 s	$0,071 \pm 0,006$	$0,356 \pm 0,010$	$0,371 \pm 0,087$	0,960	1,051

Para cada parâmetro está apresentado o valor estimado \pm erro padrão; R^2 é o coeficiente de determinação do modelo; F_a é o fator de acurácia do modelo.

A atuação da pectinesterase provoca perda de estabilidade quanto à turbidez em sucos de cenoura (Vora et al., 1999). No presente trabalho, esta enzima foi totalmente inativada, o que contribuiu para a manutenção da turbidez em níveis superiores ao do suco fresco. O suco de cenoura possui muitas partículas em suspensão incluindo células, fragmentos destas e macropartículas. Estas partículas se depositam com o tempo devido ao efeito da gravidade ocasionando perda de estabilidade (Qin et al., 2005). Isto explica a perda de estabilidade durante o armazenamento. Cabe ressaltar que caso a pectinesterase não fosse inativada a perda seria muito mais rápida. A turbidez do suco de cenoura fresco, medido em absorvância, caiu de 0,190 (valor inicial) para 0,044 em duas semanas (dados não mostrados). Este valor é a metade do apresentado nos sucos tratados termicamente e apenas 4% do valor apresentado pelo suco tratado via CEPAI no mesmo período.

No que se refere ao aumento da estabilidade logo após os tratamentos, Riva et al. (2006) encontraram resultados similares ao deste trabalho, ou seja, suco processado tanto por CEPAI quanto termicamente apresentaram maior estabilidade, medida pela absorvância, do que o suco fresco. Por outro lado, estes autores encontraram maior estabilidade para suco misto de cenoura com laranja processado termicamente do que o processado via CEPAI e, no presente estudo, os CEPAI conferiram estabilidade muito maior do que aqueles apresentados pelos sucos pasteurizados. Contudo, a matéria-prima e

condições de processamento foram diferentes. Riva et al. (2006) empregaram 25 kv/cm durante 280 μ s, neste estudo foi utilizado 35 kV/cm durante 1500 μ s. Isto pode explicar as diferenças encontradas.

6.5.3 - Inativação enzimática

O suco de cenoura fresco não apresentou atividade de lipoxigenase (LOX), portanto, não foi possível estudar o efeito dos CEPAI sobre esta enzima no suco de cenoura. Vários autores (Morales-Blancas et al., 2002; Gune e Bayindirli, 1993; Baardseth, 1979) também não encontraram atividade de LOX em cenoura. Por outro lado, Park, et al. (2002) observaram atividade desta enzima em suco de cenoura. A discrepância dos dados normalmente deve-se às diferenças nas variedades e no estágio de maturação das cenouras utilizadas nos estudos. De qualquer forma, pode-se depreender que, se há atividade de lipoxigenase em cenoura, ela é muito pequena e, portanto, não deve ter grande importância no processamento de derivados de cenoura.

O suco de cenoura fresco exibiu atividade de pectinesterase (Tabela 1). Observa-se que todos os tratamentos empregados, ou seja, tanto a aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI) quanto os dois tratamentos térmicos utilizados inativaram 100% da pectinesterase presente no suco de cenoura. No mais, a atividade da pectinesterase permaneceu nula durante todo o tempo de armazenamento o que indica que a inativação ocorreu de forma irreversível. A PE normalmente é uma enzima bastante termoresistente, porém existe diferentes isoformas desta enzima e dependendo da matéria-prima estas isoformas podem apresentar atividade e resistência diferentes. Vora et al. (1999) analisando pectinesterase em 4 diferentes variedades de cenoura encontrou diferenças de até 60% na atividade enzimática dependendo da variedade empregada. Estes mesmos autores conseguiram inativar 100% da pectinesterase presentes em diferentes variedades de cenoura utilizando 90°C durante 1 minuto. Dessa forma, os resultados deste trabalho estão de acordo com o reportado por aqueles autores. Não foi encontrado na literatura trabalho algum sobre inativação de PE via CEPAL em suco de cenoura puro. Porém, em outros produtos há trabalhos referentes à inativação desta enzima. Rodrigo et al. (2003b) utilizando 25 kV/cm durante 340 μ s obtiveram 81,4% de inativação de pectinesterase em suco de laranja com cenoura. Eléz-Martínez et al. (2007) obtiveram 80% de inativação de PE em suco de laranja após tratá-lo a 35 kV/cm durante 1500 μ s com pulso bipolar de 4 μ s de comprimento aplicados a 200 Hz. Já os autores Giner et al. (2000)

obtiveram 94% de inativação de PE em suco de tomate tratado a 24 kV/cm durante 8000 μ s. Yeom et al. (2000) obtiveram bons resultados em suco de laranja ao inativar 88% da PE presente aplicando 35 kV/cm durante 59 μ s. Dessa forma, depreende-se que a PE do suco de cenoura é mais sensível aos CEPAl do que as isoformas presentes em outros produtos. De fato, a inativação enzimática depende do tipo de isoenzimas e da concentração presente (Castro et al., 2001). Portanto, as diferenças encontradas podem ser atribuídas às diferentes fontes das enzimas e também porque os tratamentos empregados são distintos em cada um dos estudos relatados.

6.5.4 - Viscosidade

Para o suco de cenoura fresco foi encontrado um valor de viscosidade dinâmica de $1,21 \pm 0,03$ mPa.s. Estes valores são semelhantes ao encontrado na literatura para suco de cenoura. Sharma et al. (2005) observaram viscosidade variando de 1,09 a 1,46 mPa.s para sucos de cenoura obtidos por diferentes tipos de tratamento enzimático. Qin et al. (2005), ao estudar a hidrólise enzimática para melhorar o rendimento do suco de cenoura, encontrou valores de viscosidade variando entre 0,90 a 0,99 mPa.s. Reiter et al. (2003), ao analisar diferentes níveis de acidificação para obtenção do suco de cenoura, determinou que este exibe um comportamento Newtoniano e que sua viscosidade variou de 1,10 a 1,23 mPa.s dependendo do tratamento empregado. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no valor da viscosidade para os diferentes tratamentos logo após serem processados (Tabela 1). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o valor de viscosidade durante o tempo de armazenamento. A figura 4 ilustra os valores de viscosidade obtidos durante o armazenamento do suco de cenoura.

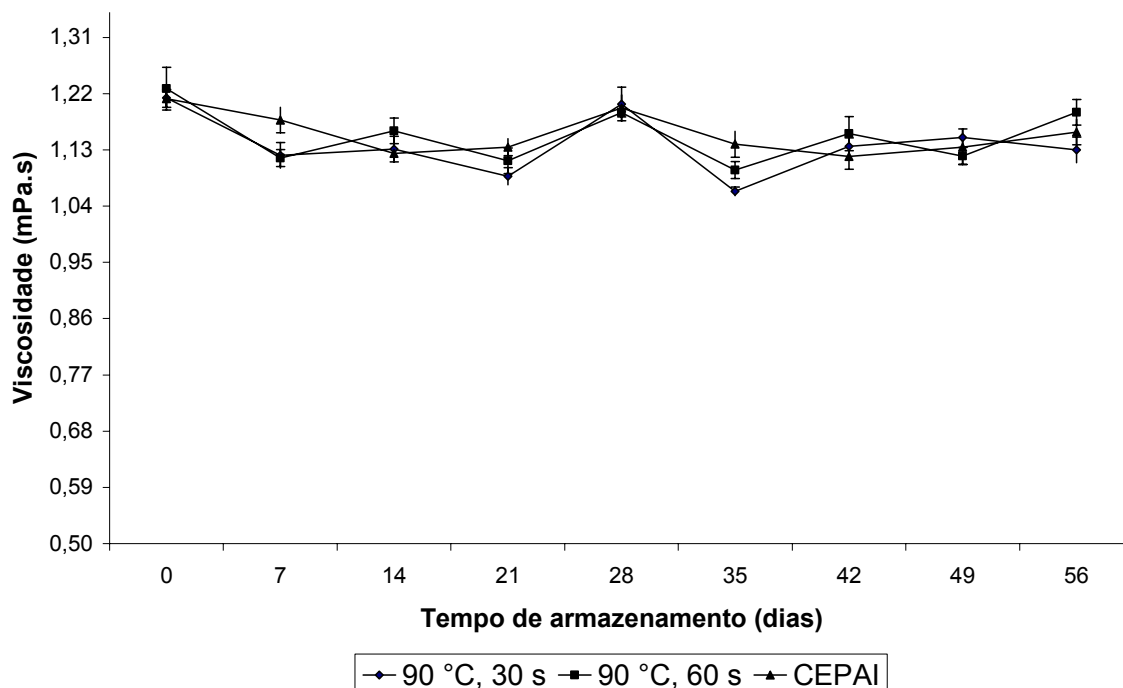


Figura 4 – Variação da viscosidade do suco de cenoura tratado via CEPAl e por dois tratamentos térmicos distintos durante o armazenamento a 4°C. Média ± desvio padrão.

6.5.5 - pH e sólidos solúveis

O valor médio de pH do suco de cenoura foi de $3,80 \pm 0,05$ após o processamento (Tabela 1), não apresentando diferença significativa entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$). Também não houve mudanças significativas ($p < 0,05$) no valor de pH durante os 56 dias de armazenamento do suco de cenoura (Figura 5). Isto é mais um indicativo de que tanto os CEPAl quanto os tratamentos térmicos foram capazes de estabilizar o suco de cenoura. Resultados observados na literatura são análogos aos obtidos neste estudo. Yeom et al. (2000) não encontraram mudanças do valor de pH dos sucos de cenoura armazenados durante 112 dias a 4 e 12°C e estabilizados via CEPAl (35 kV/cm durante 59 μ s). Da mesma maneira, Riva et al. (2006) não observaram mudança no valor de pH em sucos misto de cenoura com laranja estabilizados por pasteurização térmica e via CEPAl.

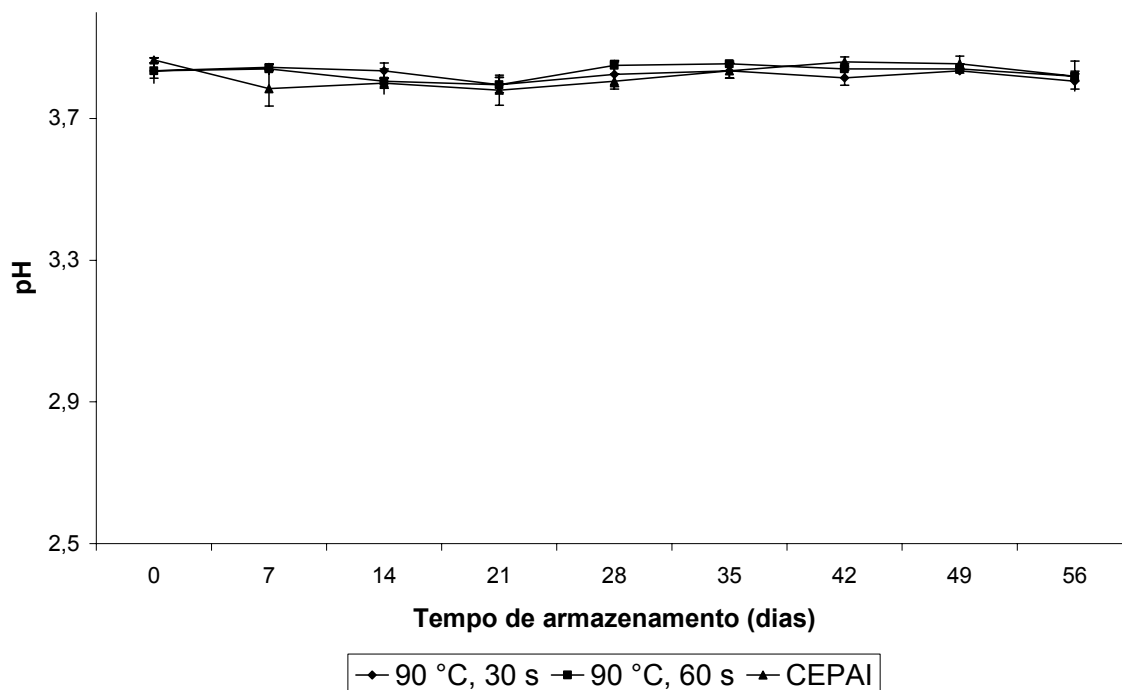


Figura 5 – Variação do valor do pH do suco de cenoura tratado via CEPAl e por dois tratamentos térmicos distintos durante o armazenamento a 4°C. Média ± desvio padrão.

O teor médio de sólidos do suco de cenoura foi de $8,25 \pm 0,07$ °Brix após processamento (Tabela 1), não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. O valor encontrado foi ligeiramente superior ao reportado na literatura para esta hortaliça. Cabe ressaltar que o teor de sólidos solúveis varia em função da variedade, condições de cultivo, ponto de colheita e tempo de armazenamento da cenoura. Qin et al. (2005) observaram valores próximos a 4,4 °Brix. Branco et al. (2007) obtiveram 6,3 °Brix para o teor de sólidos solúveis em cenoura. Por outro lado, Carrasco e Cisnero-Zevallos (2002) encontraram 7,1 °Brix em cenoura. Quanto ao tempo de armazenamento, não houve mudança significativa ($p < 0,05$) do teor de sólidos solúveis para nenhum dos tratamentos estudados (Figura 6). Resultado análogo foi encontrado por Riva et al. (2005) que não observaram diferença significativa ($p < 0,05$) no teor de sólidos solúveis do suco de laranja processado tanto termicamente quanto por CEPAl em relação ao suco fresco. Estes mesmos autores também não observaram mudança no teor de sólidos solúveis durante as primeiras 8 semanas de armazenamento do suco.

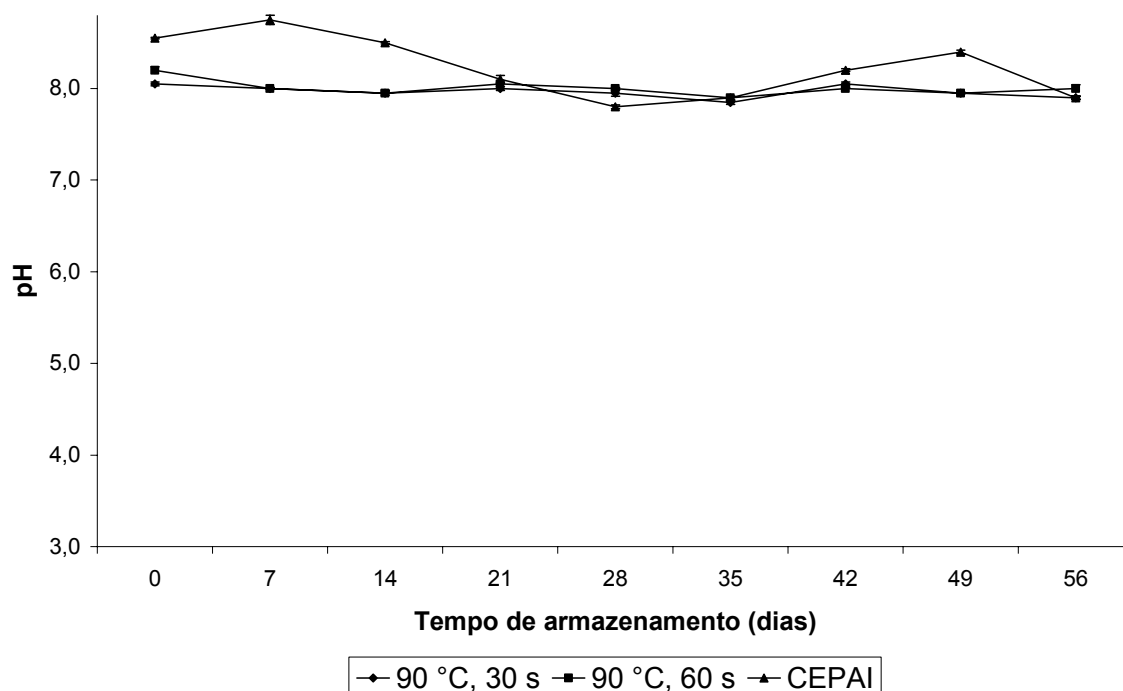


Figura 6 – Variação no teor de sólidos solúveis para suco de cenoura tratado via CEPAI e por dois tratamentos térmicos distintos durante o armazenamento a 4°C. Média ± desvio padrão.

6.6 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o suco de cenoura apresentou boa estabilidade durante o armazenamento. Não houve diferença entre os tratamentos após o processamento nem variação com o tempo de armazenamento para os valores de pH, sólidos solúveis e viscosidade. O suco de cenoura não apresentou atividade de lipoxigenase e todos os tratamentos aplicados foram suficientes para inativar completamente a pectinesterase. A estabilidade quanto à turbidez e a aceitabilidade sensorial quanto à cor foi melhor no suco estabilizado via CEPAI do que naqueles pasteurizado termicamente. Quanto ao aroma do suco, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sucos frescos, tratado por CEPAI e aquele submetido à pasteurização térmica por 90°C/30s. Entretanto, o aroma foi mais preservado ($p < 0,05$) no CEPAI quando comparado à pasteurização de 90°C/60s. Conclui-se que os CEPAI mantêm as características sensoriais quanto à aceitabilidade da cor e do aroma do suco de cenoura, apresenta a mesma eficiência na inativação enzimática que os tratamentos térmicos

empregados e conferem melhor estabilidade quanto à turbidez do suco de cenoura do que os tratamentos térmicos.

6.7 - AGRADECIMENTOS

À coordenação da CAPES pela bolsa de estudo no Brasil e também pela bolsa de estágio de doutorado no exterior que possibilitou que o experimento fosse realizado na universidad de Lleida/Espanha. Agradecemos ainda Ao Commission of the European Communities, Framework 6, Priority 5 'Food Quality and Safety', Integrated Project NovelQ FP6-CT-2006-015710 que financiou os experimentos realizados.

6.8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amiot, M.J., Fleuriet, A., Cheynier, V., Nicolas, J. (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruits and vegetables. In F.A. Tomás-Barberán, & R.J. Robins, Phytochemistry of fruit and vegetables (pp. 51-85). Oxford: Science Publications

Baardseth, P. (1979). Enzymatically induced quality changes in fresh and frozen carrot. Acta horticulturae, 93, 67-75.

Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. (1999). Conservación no Térmica de Alimentos. Zaragoza: Acribia, 280p.

Branco, G.; Sanjinez-Argandoña, E.J.; Silva, M.M.; Paula, T.M. (2007). Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um blend de laranja e cenoura. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21(1), 7-12.

Block, G.; Norkus, E.; Hudes, M.; Mandel, S. and Helzlsouer, K. (2001). Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? American Journal of Epidemiology, 154, 1113–1118.

Branco, I.G.; Sanjinez-Argandoña, E.J.; Silva, M.M.; Paula, T.M. (2007). Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um blend de laranja e cenoura. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 27(1), 7-12.

Carrasco, E.U.; e Cisneros-Zevallos, L. (2002). Efecto del escaldado y recubrimiento higroscópico sobre la calidad de zanahorias (*Daucus carota* var. Chantenay) pre-cortadas durante el almacenamiento. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 52(2), 187-192.

Castro, A.J.; Swanson, B.G.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Zhang, Q.H. (2001). Pulsed electric field modification of milk alkaline phosphatase activity. In Barbosa-Cánovas, G.V.; Zhang,

Q.H. (Eds.) Pulsed electric field in food processing. Fundamental aspects and applications (pp 65-82). Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, USA.

CHAVES, J. B. P., SPROESSER, R. L. (1999). Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas. Viçosa: UFV, 81p.

Dede, S.; Alpas, H.; Bayindirli, A. (2007). High hydrostatic pressure treatment and sorage of carrot and tomato juices: antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 773-782.

Elez-Martínez, P.; Soliva-Fortune, C.; Martín-Belloso, O. (2006). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment. *European Food Research Tecnology*, 222, 321-329.

Elez-Martínez, P.; Suárez-Recio, M.; Martín-Belloso, O. (2007). Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 78, 184-193.

Espachs-Barroso, A.G.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martín-Belloso, O. (2003). Microbial and enzymatic changes in fruit juice by high intensity pulsed electric fields. *Food Reviews International*, 19, 253–273.

Giner, J.; Gimeno, V.; Espachs, A.; Elez, P. Barbosa-Cánovas, G.V.; Martín, O. (2000). Inhibition of tomato (*Licopersicon esculentum* Mill) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 57-67.

Gunes, B. e Bayindirli, A. (1993). Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. *LWT*, 26, 406-410.

Howard, L.R., Braswell, D., Heymann, H., Lee, Y., Pike L.M., and Aselage, J. (1995). Sensory attributes and instrumental analysis relationships for strained processed carrot flavour. *Journal of Food Science*, 60, 145-148.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1985). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo: Adolfo Lutz, v.1, 332p.

Kim, Y.M.; Lee, C.W.; Park, K.H. (1987). Purification and thermal inactivation of 2 lipoxygenase isoenzymes from potato tubers. *Korean Jounarl of Food Science and Technology*, 19(5), 397-402.

Martín-Belloso, O.; Qin, B.L.; Chang, F.J.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Swanson, B.G. (1997). Inactivation of escherichia coli in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20, 317-336.

Massiot, P.; Rouau, X.; Thihaut, J.F. (1987). Characterization of cell wall polysaccharides of carrots. *Food Hydrocolloid*, 1, 541-547.

Marx, M.; Stuparic, M.; Schieber, A.; Carle, R. (2003). Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, 83, 609-617.

Min, S.; Jin, Z.T.; Yeom, H.; Min, S.K.; Zhang, Q.H. (2003). Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice. *Food Chemistry and Toxicology*, 68(4), 1265-1271.

Morales-Blancas, E.F.; Chandia, V.E.; Cisceros-Zevallos, L. (2002). Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from broccoli, green asparagus and carrots. *Journal of Food Science*, 67(1), 146-154.

Mawele, S.; Timothy, D.; Benoit, G. (1996). Water blanching effects on headspace volatiles and sensory attributes of carrots. *Journal of Food Science*, 61(6), 1191-1195.

Nagy, S.; Chen, C.S.; Shaw, P.E. (1993). *Fruit juice processing technology*. Florida: Auburndale, Agscience.

Odriozola-Serrano, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso. (2007) Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.07.009.

Park, S.J.; Lee, J.I.; Park, J. (2002). Effects of a combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. *Journal of Food Science*, 67(5), 1827-1834.

Qin, L.; Xu, S.Y.; Zhang, W.b. (2005). Effect of enzymatic hidrolisis on the yield of cloud carrot juice and the effects of hidrocolloids on color and cloud stability during ambient storage. *Journal of Food Science and Agriculture*, 85, 505-512.

Quintão-Teixeira, L.J.; Aguiló-Aguayo, I.; Ramos, A.M.; Martín-Belloso, O. (2007). Inactivation of oxidative enzymes by high-intensity pulsed electric field for retention of color in carrot juice. *Food Bioprocess Technology*, DOI: 10.1007/s11947-007-0018-x.

Ramos, A.M.; Teixeira, L.J.Q.; Stringheta, P.C.; Chaves, J.B.P.; Gomes, J.C. (2006). Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. *Ceres*. 53(308) 425-438.

Reiter, M. Stuparié, M.; Neidhart, S.; Carle, R. (2003). The role of process technology in carrot juice cloud stability. *LWT*, 36, 165-172.

Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Rodrigo, M. (2006). Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie- Food Science and Technology*, 39, 1163-1170.

Rodrigo, D.; Arazns, J.I.; Koch, S.; Frígola, A.; Rodrigo, M.C.; Esteve, M.J.; Calvo, C.; Rodrigo, M. (2003). Physicochemical characteristics and quality of refrigerated Spanish

orange-carrot juices and influence of storage conditions. *Journal of Food Science*, 68(6), 2111-2116.

Rodrigo, D.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martínez, A.; Rodrigo, M. (2003b). Pectin Methyl esterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 66(12), 2336-2342.

Roos, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriol*, 81, 501-508.

Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Ancos B. and Cano, P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 430-439.

Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Begliomini, A. L.; Montedoro, G. (2000). Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters. *Food Chemistry*, 71, 407-415.

Sharma, A.K.; Sarkar, B.C.; Sharma, H.K. (2005)> Optimization of enzymatic process parameters for increased juice yield from carrot (*Daucus carota* L.) using response surface methodology. *European Food Research and Technology*, 221, 106-112.

Simon, P.W. (1985) Carrot flavor: Effect of genotype, growing conditions, storage and processing. In: Eskin, E. (ed) *Evaluation of quality of fruits and vegetables*, pp 315-328. AVI Publishing Co., Westport, CT.

Soliva-Fortuna, R.; Bendicho-Porta, S.; Martín-Belloso, O. (2006). Modeling high-intensity pulsed electric field inactivation of a lipase from *pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 89, 4096-4104.

Teixeira, L.J.Q.; Pereira, J.M.A.T.K.; Silva, N.M.; Reis, F.P. (2006). Hábitos de consume de frutas entre estudantes da Universidade Federal de Viçosa. *Ceres*, 53(307), 366-373.

Vora, H.M.; Kyle, W.S.A.; Small, D.M. (1999). Activity, localization and thermal inactivation of deteriorative enzymes in Australian carrot (*Daucus carota* L) varieties. *Journal of the Science of Food agriculture*, 79, 1129-1135.

Yeom, H.W.; Streaker, C.B.; Zhang, Q.H.; Min, D.B. (2000). Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice. *Journal of Food Science*, 65(8), 1359-1363.

CAPÍTULO 7 – DISCUSSÃO GERAL

O principal objetivo do primeiro experimento (capítulo 3) foi verificar o efeito da frequência, do comprimento e da polaridade dos campos elétricos pulsados de alta intensidade (CEPAI) aplicados na estabilização do suco de cenoura. Foi escolhido como variável resposta a inativação da enzima peroxidase (POD) e a avaliação de cor pelo método CIELab e também pelo index Brown. A enzima polifenoloxidase (PPO) causa escurecimento enzimático em derivados de produtos vegetais e por isso, o efeito dos CEPAI sobre a PPO também seria estudado neste experimento. Contudo, em ensaios prévios foi verificado que a redução do valor de pH na fase de elaboração do suco foi suficiente para inativar a PPO, assim, neste primeiro experimento estudou-se o efeito dos parâmetros supracitados na inativação da POD e na manutenção da cor do suco de cenoura tratado. Neste experimento foi feita uma caracterização físico-química do suco de cenoura dando destaque para a condutividade elétrica, pois este parâmetro influencia a eficiência da aplicação dos CEPAI. Quando um alimento é submetido aos CEPAI ocorre um aumento de temperatura. Contudo, o objetivo da aplicação dos CEPAI é substituir o tratamento térmico, por isso as câmaras de tratamentos possuem um sistema de refrigeração para controlar a temperatura, que no nosso caso, foi mantida abaixo de 40°C em todos os experimentos. Na literatura há experimentos que estudam o efeito combinado dos CEPAI aplicados a temperaturas moderadas, normalmente até 65°C. Por estas razões fez-se um estudo da condutividade elétrica em função da temperatura utilizando a escala de zero até 65°C, pois estes resultados podem ser de interesse em estudos futuros. Foi verificado que a condutividade elétrica do suco de cenoura aumenta linearmente com o aumento da temperatura e este comportamento está de acordo com o relatado na literatura para sucos de frutas e hortaliças (Malek et al., 2006; discutido no capítulo 3).

Todos os parâmetros estudados neste experimento exerceram grande influência na inativação da POD. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para estabelecer o tratamento que garanta maior inativação enzimática. Os pulsos bipolares são mais

eficientes que os monopulares. Resultados análogos foram encontrados na literatura (Giner et al., 2002; Elez-Martínez et al., 2006). Utilizando estes dados foi possível, por meio de regressão não linear, encontrar as equações para a atividade residual de POD no suco de cenoura após ser tratado por CEPAL. A Inativação máxima foi obtida quando foram aplicados pulsos bipolares resultando em 27% de atividade residual enquanto no modo monopolar obteve-se 47,8% de atividade residual. Para valores de frequência baixos, perto do limite inferior utilizado (50 Hz) a inativação enzimática foi muito pequena. À medida que se aumenta a frequência de aplicação dos pulsos, obteve-se maior inativação. Porém depois de certo valor, o aumento da frequência provoca uma redução da inativação enzimática, ou seja, existe um valor ótimo para a frequência. O mesmo comportamento ocorreu para o valor de comprimento de pulsos. Assim, foi possível obter os valores para estes parâmetros que maximizam a inativação da peroxidase. A frequência que maximiza a inativação enzimática foi de 200 Hz que é o mesmo valor encontrado por Elez-Martínez et al. (2006) para inativação de POD em suco de laranja. Estes mesmos autores encontraram 4 μ s como comprimento de pulso que maximiza a inativação de POD no suco de laranja e no presente trabalho encontrou-se 6 μ s. A diferença pode ser explicada pelo fato de que as matérias primas usadas foram distintas e, portanto, possui características distintas como a condutividade elétrica, isoenzimas presentes, etc.

Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nas coordenadas de cor entre o suco fresco e o suco tratado via CEPAL. Quanto ao índice Brown, houve diferença ($p < 0,05$) entre o suco fresco e o tratado com pulsos monopulares. Porém, não houve diferença ($p < 0,05$) quando aplicados pulsos bipolares. Assim, os pulsos bipolares além de ser mais eficientes na inativação da POD, não causaram mudança de cor no suco de cenoura.

Este primeiro experimento cumpriu seus objetivos, pois foi possível estabelecer a frequência (200 Hz), a polaridade (bipolar) e o comprimento do pulso (6 μ s) que garanta a máxima inativação da peroxidase em suco de cenoura sem afetar significativamente a sua cor. Os valores aqui obtidos, para os parâmetros supracitados foram utilizados nos experimentos seguintes.

No segundo experimento (capítulo 4), estudou-se a influência da intensidade do campo elétrico aplicado e do tempo de tratamento na inativação da POD em suco de cenoura. Portanto, manteve-se constante a frequência, o comprimento e a polaridade do pulso elétrico aplicado. De posse dos dados, foi possível ajustar vários modelos que

explicam a inativação enzimática em função dos parâmetros estudados. Foram selecionados vários modelos encontrados na literatura para descrever a inativação enzimática em função do campo elétrico, do tempo de tratamento e da energia fornecida.

Ao avaliar a atividade residual de POD em função do tempo de tratamento verificou-se um decrescimento exponencial da atividade residual para cada um dos campos testados (20, 25, 30 e 35 kV/cm). Quanto menor for a atividade residual, significa que maior foi a inativação enzimática. Foram utilizados três modelos para ajustar estes dados, o modelo de primeira ordem, o modelo de primeira ordem fracional e o modelo de Weibull. O modelo de primeira ordem fracional é usado quando ocorre um decrescimento exponencial no início e depois de um tempo prolongado o valor fica constante. Observou-se também que para o maior valor de campo (35 kV/cm) a atividade residual para os tempos de 1500 ou 2000 μ s é a mesma, com isso concluímos que a partir 1500 μ s não vale mais a pena prolongar o tratamento e, portanto, selecionou-se este valor para tempo de tratamento que foi utilizado no terceiro experimento. Para estes parâmetros, 35 kV/cm durante 1500 μ s aplicando pulsos de 6 μ s de comprimento a 200 Hz de frequência obtiveram-se aproximadamente 7% de atividade residual de POD, ou seja, 93% de inativação enzimática que foi o máximo de inativação obtido e estes foram, portanto, os parâmetros selecionados como sendo os que garantem maior eficiência na estabilização do suco de cenoura via CEPAL.

No capítulo 4 também foi estudada as constantes para as equações de regressão não linear para os modelos de primeira ordem e de primeira ordem fracional. Assim, obteve-se uma equação para cada um dos 4 campos elétricos estudados. Notou-se que os dois modelos possuíam bons ajustes sobre tudo para o campo de maior valor (35 kV/cm) que é o de maior interesse já que é para este valor de campo elétrico que se obtém maior inativação. Para 35 kV/cm obteve-se R^2 de 0,978 para o modelo de primeira ordem e R^2 de 0,983 para o modelo de primeira ordem fracional, sendo este portanto, o mais indicado. Em seguida plotou-se as constantes de cada um destes modelos em função do campo aplicado. Assim, foi possível descrever estas constantes em função do campo. Substituiu-se o valor destas constantes em função do campo no modelo de primeira ordem e de primeira ordem fracional, obtendo uma equação geral para a inativação enzimática em função do tempo de tratamento e do campo aplicado que são as equações 14 e 15 do capítulo 4.

O mesmo procedimento foi feito para o Modelo de Weibull que também apresentou bom ajuste, porém inferior ao modelo de primeira ordem fracional. Desta forma foram empregados três modelos para explicar o decrescimento da atividade enzimática em função do tempo de tratamento para cada um dos campos sendo que o modelo de primeira ordem fracional foi o que apresentou melhor ajuste (considerando o R^2 e a acurácia).

O modelo de Fermi foi usado para descrever a inativação enzimática em função do campo elétrico aplicado. Assim o gráfico para este modelo tem atividade residual no eixo y e campo elétrico no eixo x. A equação que apresenta maior interesse é a utilizada para o tratamento de 1500 μ s, já que esse foi o tempo selecionado como sendo o mais efetivo. Quanto maior o campo aplicado, maior é a inativação enzimática. O equipamento utilizado permite trabalhar com campo elétrico máximo de 35 kV/cm. Este foi, portanto, o campo utilizado no experimento seguinte. Outra informação importante que é possível retirar do modelo de Fermi é o valor de campo elétrico que inativa 50% da enzima para dado tempo de tratamento. Observou-se que este valor de campo elétrico é o mesmo para os tempos de 1500 e 2000 μ s confirmando que não vale a pena estender o tratamento para além do valor de 1500 μ s. Também foi possível encontrar um modelo para inativação enzimática em função da energia fornecida. De todos os modelos apresentados, os de maior interesse são o de primeira ordem porque é normalmente usado em cinética de inativação para tratamento térmico e o de primeira ordem fracional, pois este se ajustou um pouco melhor que o de primeira ordem.

Os resultados dos dois primeiros experimentos permitiram definir os parâmetros de maior eficiência para estabilização do suco de cenoura via CEPAl. Assim, realizou-se um terceiro experimento para comparar a eficiência dos CEPAl com dois tratamentos térmicos de referência. Este experimento está relatado com detalhes nos capítulos 5 e 6.

Dentre as diversas variáveis respostas estudadas, observou-se que a aplicação dos CEPAl foi significativamente ($p < 0,05$) melhor do que os dois tratamentos térmicos estudados no que se refere à aceitação sensorial, retenção de Vitamina C e estabilidade quanto à turbidez. Nas demais variáveis, os CEPAl exerceram efeito análogo aqueles conferidos pelos tratamentos térmicos.

Logo após os tratamentos serem realizados, o suco de cenoura tratado via CEPAl apresentou melhor aceitação sensorial quanto à cor do que aqueles pasteurizados

termicamente. A retenção de vitamina C, no tempo zero foi de 89,9% para os CEPAI e de 71,6% para o suco submetido a tratamento térmico moderado e somente de 62,9% para o suco de cenoura estabilizado com o tratamento térmico mais intenso. Outro fator importante é que a degradação da vitamina C ao longo do tempo de armazenamento ocorreu de maneira muito menos intensa no suco tratado via CEPAI do que naqueles tratados termicamente. Outro fator de grande importância foi a expressiva melhora em relação à estabilidade (quanto a turbidez) do suco de cenoura tratado via CEPAI em relação a suco fresco e também em relação aos sucos pasteurizados termicamente.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no teor de β -caroteno, e capacidade antioxidante entre o suco estabilizado via CEPAI e aqueles pasteurizados termicamente quando comparados no tempo zero, ou seja, logo depois de realizados os tratamentos. Todas estas variáveis apresentaram um decréscimo exponencial em função do tempo de armazenamento conforme mostrado no capítulo 5.

O valor de pH, a viscosidade e o teor de sólidos solúveis bem como o teor de fenóis totais não sofreram variações significativas ($p < 0,05$) nem após o tratamento nem durante o tempo de armazenamento. No que se refere à inativação enzimática, os CEPAI apresentaram uma eficiência análoga a aplicação dos tratamentos térmicos utilizados.

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES

Os resultados observados no presente trabalho permitiram concluir que:

- A condutividade elétrica do suco de cenoura aumenta linearmente com o aumento da temperatura no intervalo estudado (0 a 65°C);
- A redução do valor de pH adotado na elaboração do suco de cenoura foi suficiente para inativar a polifenoloxidase;
- A aplicação de pulsos bipolares de 6 μ s de comprimento e frequência de 200 Hz é a que garante maior eficiência na inativação da peroxidase;
- A aplicação de pulsos bipolares não causou alteração de cor no suco de cenoura tratado via CEPAI quando comparado com o suco fresco;
- A inativação máxima da enzima peroxidase foi obtida quando aplicado um campo elétrico de 35 kV/cm durante 1500 μ s usando pulsos de 6 μ s de comprimento no modo bipolares aplicados a uma frequência de 200 Hz;
- Os modelos de primeira ordem e de primeira ordem fracional se ajustaram bem e podem ser usados para descrever a inativação da peroxidase em função do tempo de tratamento para vários campos elétricos aplicados;
- Logo após ser processado, o suco de cenoura tratado via CEPAI apresentou maior retenção de vitamina C e melhor aceitação sensorial quanto á cor do suco de cenoura do que aqueles estabilizados termicamente;
- Durante o armazenamento a degradação da vitamina C ocorreu de forma menos intensa no suco estabilizado via CEPAI do que naqueles tratados termicamente;
- Após o processamento, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no teor de β -caroteno, e na capacidade antioxidante, sendo que estas variáveis decresceram exponencialmente em função do tempo de armazenamento;
- O valor de pH, a viscosidade e o teor de sólidos solúveis bem como de fenóis totais não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes

tratamentos logo após serem processados e se mantiveram constantes ao longo do tempo de armazenamento;

- O suco tratado via CEPAI apresentou estabilidade quanto à turbidez superior ao suco fresco e superior aos sucos pasteurizados termicamente tanto após serem processados, quanto durante o tempo de armazenamento;
- A pectinesterase foi totalmente inativada por todos os tratamentos utilizados;
- A peroxidase apresentou baixa atividade residual após o processamento e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a atividade residual do suco de cenoura tratado via CEPAI e aqueles tratados termicamente;
- O suco de cenoura não apresentou atividade enzimática quanto a lipoxigenase.

Finalmente, ressalta-se o fato de que esta é uma tecnologia nova e este foi o primeiro trabalho de aplicação dos CEPAI em sucos de cenoura. Contudo, este campo é promissor e alguns avanços foram obtidos nos últimos anos como a criação da legislação para os CEPAI nos EUA e o surgimento da primeira empresa, também nos EUA, a utilizar esta tecnologia em escala comercial (empresa de sucos GENESIS juice cooperative). Assim, este trabalho cumpriu seu papel de oferecer mais informações nesta linha de pesquisa.

8.1 - TRABALHOS FUTUROS

A partir das observações e resultados obtidos neste trabalho, sugerem-se os seguintes itens para futuros estudos em aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade em suco de cenoura e também em outros sucos de frutas e hortaliças.

- Estudar o efeito da condutividade elétrica na eficiência da inativação enzimática;
- Fazer um estudo de vida útil considerando a inativação de microorganismos;
- Estudar a viabilidade econômica da implantação de unidades de processamento de sucos de frutas e hortaliças estabilizados via CEPAL;
- Estudar o mecanismo de indução de formação de β -caroteno tanto pela aplicação do calor quanto pela aplicação dos CEPAL;
- Estudar os mecanismos estruturais que levam a inativação das enzimas em suco de cenoura via aplicação dos CEPAL.