



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112018009870-1 B1**



**(22) Data do Depósito:** 17/11/2016

**(45) Data de Concessão:** 11/10/2022

---

**(54) Título:** PROCESSO PARA AQUECIMENTO RÁPIDO E HOMOGÊNEO DE UM PRODUTO LÍQUIDO

**(51) Int.Cl.:** A23L 3/005; A23C 3/033; A23L 2/48; A23B 5/01; C02F 1/48.

**(30) Prioridade Unionista:** 05/07/2016 EP 16177902.0; 17/11/2015 US 62/256,497.

**(73) Titular(es):** STICHTING WAGENINGEN RESEARCH.

**(72) Inventor(es):** RIAN ADRIANA HENDRIKA TIMMERMANS; RICARDO ERMIRIO DE MORAES; HENDRIKUS CORNELIS MASTWIJK.

**(86) Pedido PCT:** PCT NL2016050799 de 17/11/2016

**(87) Publicação PCT:** WO 2017/086784 de 26/05/2017

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 15/05/2018

**(57) Resumo:** PROCESSO PARA PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS LÍQUIDOS UTILIZANDO TRATAMENTO DE CAMPO ELÉTRICO PULSADO. A presente invenção refere-se a um processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo. De acordo com a invenção, a inativação microbiana suficiente e eficaz é alcançada aplicando uma intensidade de campo elétrico entre 0,1 - 5,0 kV/cm durante um período de tempo prolongado, selecionando, assim, uma intensidade de campo elétrico relativamente baixa e uma duração de pulso de pelo menos 10 microssegundos, enquanto a temperatura máxima do produto líquido permanece autonomamente abaixo de 92°C durante o aquecimento resistivo. O processo da invenção é eficiente a um pH neutro e a um pH inferior a 7. Além disso, o processo da invenção é eficiente na inativação de um vasto conjunto de micro-organismos relevantes. A presente invenção refere-se adicionalmente ao referido processo em que o produto líquido é pré-aquecido antes de submeter o produto líquido ao processo. A presente invenção também se refere ao produto líquido obtível pelo processo de acordo com a invenção.

## PROCESSO PARA AQUECIMENTO RÁPIDO E HOMOGÊNEO DE UM PRODUTO LÍQUIDO

### CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a um processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo. A presente invenção refere-se, adicionalmente, ao referido processo em que o produto líquido é pré-aquecido antes de submeter o produto líquido ao processo.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Campos elétricos pulsados (CEP) são usados como uma tecnologia para induzir a eletroporação de uma membrana celular por aplicação de pulsos de um curto período de tempo por um campo elétrico externo de alta intensidade. A teoria mais amplamente aceita para este fenômeno é que por aplicação de um campo elétrico externo a uma membrana biológica, instabilidades locais na bicamada lipídica são induzidas, eventualmente, levando a formação de poros. A formação de poros (eletroporação) aumenta a permeabilidade através da membrana (eletro-permeabilização) que, dependendo da intensidade do campo elétrico aplicado, é um processo reversível ou quando aplicado com tensões elevadas, é irreversível, conduzindo à morte celular.

[003] Em um sistema de tratamento de CEP de fluxo contínuo, tempos críticos diferentes têm que ser considerados (Mastwijk *et al.*, 2007), incluindo a duração de um pulso, o tempo entre dois pulsos (tempo de pausa), o tempo de residência de um elemento fluido na região de campo elétrico elevado e o tempo de trânsito, o tempo para deixar a região de campo elétrico elevado antes de entrar na seção de arrefecimento. O tempo total de tratamento (efetivo) é definido como o produto do número de pulsos e o tempo por pulso que é

recebido por um elemento de fluido em condições de campos elétricos elevados quando bombeado através do dispositivo de tratamento. Atualmente, o tempo total de tratamento e a intensidade de campo elétrico são conhecidos como fatores críticos que determinam a eficiência para eletroporação irreversível (Saulis e Wouters, 2007). A eletroporação irreversível é eficaz em microrganismo vegetativo a intensidades de campo no intervalo de 10-20 kV/cm, quando usando pulsos de duração de 2 microssegundos para um tempo total de tratamento de 100-400 microssegundos (Fig. 1). Reynard e colaboradores (1998) investigaram o efeito crítico sobre a duração do pulso de um único pulso para a transferência de genes. Eles descobriram que um tempo mínimo de pulso é necessário para a orientação de  $\approx 1$  milissegundo e indicaram tempos de resposta críticos para permeabilização de 3 a 5 milissegundos, utilizando os pulsos de duração de 24 milissegundos a uma intensidade de campo elétrico de 1-2,7 kV/cm.

[004] Contrariamente aos pulsos de corrente direta (DC), as correntes de corrente alternada (AC) são usadas para invocar condições de campos elétricos elevados em um líquido. Embora correntes AC com uma frequência fixa ( $f$ ) possam ser vistas como pulsos com uma duração de  $1/f$ , a forma de pulso característica considerada aqui é retangular, o que significa que a frequência de repetição de pulsos é menor do que a largura de banda ( $1/\text{duração do pulso}$ ). Correntes AC a frequências superiores a 1 MHz (ou durações de pulsos inferiores a 1 microssegundo) têm sido consideradas em US 2010/0297313.

[005] A escolha para as condições específicas de tratamento está relacionada com as diferentes aplicações e propósitos da eletroporação. A eletroporação reversível é um procedimento utilizado regularmente na biologia molecular e biotecnologia clínica para introduzir pequenas ou grandes moléculas para dentro da célula, isto é, fármacos, oligonucleotídeos, anticorpos e

plasmídeos no citoplasma, com o objetivo de manter as células vivas. A eletroporação irreversível pode ser usada para extrair moléculas a partir da célula ou para inativar células. Nesta invenção, o nosso objetivo é a eletroporação irreversível como um método de preservação não-térmico, onde a temperatura máxima obtida pelo processamento de CEP e o tempo de retenção sejam menores do que por pasteurização térmica convencional. Isso resulta em, por exemplo, entre outros aspectos benéficos, uma preservação melhor do sabor fresco e valores nutricionais de um produto.

[006] As condições de processamento que são selecionados para tratamento elétrico pulsado quando destinada a inativação microbiana é dependente de vários fatores, mas podem ser classificados em três grupos: parâmetros de processamento, características microbianas e características do meio de tratamento.

[007] Em adição à intensidade do campo elétrico e o tempo de tratamento, a temperatura é considerada como crítica para a eficácia da inativação microbiana por CEP (Raso *et al.*, 2014). Aumento da intensidade do campo elétrico e duração do tratamento irá levar a um aumento da letalidade de CEP. Como um resultado destas condições, mais energia será aplicada por unidade de massa, levando a um maior aquecimento do produto. As condições de processo típicas utilizadas para a eletroporação irreversível estão no intervalo de pulsos curtos de microssegundos a uma alta tensão (5-80 kV/cm).

[008] A extensão da inativação microbiana por CEP é melhorada através do aumento da temperatura do meio, por exemplo, o produto alimentar líquido, antes do tratamento por CEP, mesmo no intervalo de temperaturas que não são letais para os microrganismos. Sem pretender ser limitado pela teoria, este efeito de pré-aquecimento tem influência sobre a estrutura de bicamada de fosfolipídio da membrana celular, tornando as células mais vulneráveis para o

processo de CEP (Wouters *et al.*, 1999).

[009] As características do microrganismo têm influência sobre a eficácia da inativação microbiana por CEP. De um modo geral, tem sido relatado que microrganismos relativamente grandes são mais sensíveis à CEP do que microrganismos menores, e os microrganismos Gram-negativos são mais sensíveis à CEP do que microrganismos Gram-positivos.

[0010] A eficácia do tratamento CEP é frequentemente estudada em meios de suspensão líquidos com microrganismos. As características deste meio de tratamento têm sido investigadas e o pH foi relatado como sendo de grande importância para a eficácia do tratamento. Ou seja, CEP é muito mais eficaz em meios com pH baixo do que em meios com pH neutro.

[0011] Aplicação comercial de processamento CEP irreversível tem como objetivo a inativação de microrganismos em fluxo contínuo por uma única passagem através de um dispositivo de tratamento. Loops de circulação proporcionando mais do que uma passagem através do dispositivo de tratamento por mistura do produto tratado com o produto não tratado, como descrito em US 2012/0103831 são evitados devido à complexidade do processo.

[0012] Conforme mencionado anteriormente, a aplicação de pulsos externos para o produto introduz energia para o produto, o que resulta em um aumento de temperatura do produto. Este incremento de temperatura é dependente das condições de processo escolhidas e as características do produto (Heinz *et al.*, 2002). Para evitar um aquecimento excessivo do produto, uma seção de arrefecimento foi colocada entre duas câmaras de tratamento em algumas aplicações (Sharma *et al.*, 2014.); no entanto, mais energia elétrica e energia para o arrefecimento é necessária nesta abordagem. Outra possibilidade descrita para evitar o excesso de aquecimento é introduzir pausas após a aplicação de pulsos ou depois de uma sucessão de pulsos (El Zakhem *et al.*,

2006); no entanto, isto não é possível em aplicações comerciais, uma vez que o tempo total de tratamento aumentou para 5200 s - 7800 s neste estudo (El Zakhem *et al.*, 2007) enquanto tempos típicos para pasteurização térmica em linha estão no intervalo de segundos a minutos. As pausas entre os pulsos ou entre as séries de pulsos de, pelo menos, um minuto também são aplicadas no sistema de lote descrito em CA 2758678.

[0013] Condições de tratamento comercialmente aplicadas são tais que o CEP é conduzido com intensidades de campo elétrico de entre 10 e 30 kV/cm, porque a aplicação de intensidades de campo elétrico mais elevadas tem limitações técnicas e pode causar a ruptura dielétrica do material alimentar.

[0014] As condições de processo aplicadas são adequadas para produtos alimentares líquidos com pH baixo, ou seja, suco de fruta altamente ácido, com um pH abaixo de cerca de 4,6. Estas condições do processo aparecem em várias aplicações como sendo adequadas para a inativação de microrganismos de tamanhos maiores em produtos alimentares líquidos. Além disso, os microrganismos Gram-negativos podem ser inativados de forma mais eficaz do que os microrganismos Gram-positivos. Especialmente, a inativação de bactérias Gram-positivas de tamanho pequeno é, na maioria dos casos, complicada com as condições do processo CEP atualmente conhecidas. Além disso, as condições de corrente de processo de baixo pH não são aplicáveis de uma forma eficaz para produtos alimentares que têm um pH superior a cerca de 4,6.

[0015] Os processos de CEP atuais para produtos alimentares líquidos engloba as intensidades do campo elétrico que são relativamente altas, isto é, 5 kV/cm e superior, tipicamente 10-30 kV/cm. Estas intensidades relativamente altas de campos elétricos geralmente dificultam o escalonamento do processamento CEP até grandes volumes por requisitos de potência de pico e limitações na duração de um pulso único pela máxima energia de pulso

armazenada. Estes limites tecnológicos limitam o rendimento máximo de uma única linha para a conservação de sucos de fruta ácida de baixa condutividade a 5000 L/h.

[0016] Assim, há uma necessidade de condições de processamento de CEP que são:

- eficientes na inativação de bactérias Gram-positivas e/ou de micróbios com um tamanho relativamente pequeno, preferencialmente, sem perda da eficácia em relação a inativação de bactérias Gram-negativas e/ou inativação de micróbios que tenham um tamanho relativamente grande; e/ou

- inativação de microrganismo e/ou esporos em produtos alimentares líquidos que têm um pH superior a cerca de 4,6 e um pH inferior a 4,6; e/ou

- tecnologias de inativação economicamente mais rentáveis do que as existentes; e/ou

- aplicável e tenha a possibilidade de adaptar-se para volumes maiores de rendimento usando uma única linha, diferente do estado atual das condições da técnica usadas.

#### SUMARIO DA INVENÇÃO

[0017] A invenção atual refere-se a um processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo para obter o produto líquido aquecido, compreendendo:

- (a) proporcionar um produto líquido;

- (b) proporcionar um aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo;

- (c) fornecer continuamente o produto líquido para a entrada do aparelho e fluir o produto líquido através do aparelho;

(d) gerar continuamente uma corrente elétrica através do produto líquido que flui no aparelho, em que o mínimo de um pulso é aplicado sobre cada elemento do fluido durante a passagem com uma duração de pulso de, pelo menos, 10 microssegundos e em que a intensidade do campo elétrico é de 0,1 a 5 kV/cm; e

em que a temperatura máxima do produto líquido autonomamente permanece abaixo de 92°C durante o aquecimento resistivo.

[0018] É parte da presente invenção que a duração do pulso de um único pulso seja um fator crítico, em vez do tempo de tratamento total efetivo. Na duração do pulso de 2 microssegundos ( $\tau$ ) e as intensidades de campo elétrico (E) de 10 kV/cm, os inventores descobriram que a inativação não foi eficiente, apesar de o tempo total de tratamento eficaz calculado como  $E^2 \cdot \tau$  ter sido 4 vezes mais alto do que a 20 kV/cm onde tratamento convencional de CEP é empregue. Em condições de 0,1-5 kV/cm, a inativação mostrou ser eficaz apenas para durações de pulsos em excesso de 10 microssegundos, por exemplo entre 100 e 1000 microssegundos.

[0019] O processo da invenção é aplicável para produtos alimentares líquidos e produtos de alimentação líquidos, e as condições de processamento do CEP da invenção são igualmente eficazes na inativação de bactérias Gram-negativas, bem como bactérias Gram-positivas. As condições de processamento do CEP são aplicáveis para produtos alimentares líquidos e produtos de alimentação líquidos, cujas condições são eficazes em ambas inativações de micróbios relativamente grandes e inativação de micróbios relativamente pequenos. Além disso, os inventores verificaram, surpreendentemente, as condições de processamento do CEP agora aplicável em condições atualmente aplicadas de pH relativamente baixo, bem como aplicável em condições de pH mais elevado. Finalmente, os inventores descobriram as condições de



processamento aplicáveis para rendimentos mais elevados de produtos alimentares líquidos ou produtos de alimentação líquidos do que os rendimentos que eram anteriormente possíveis com o processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo conhecidos na técnica.

[0020] Um segundo aspecto da invenção atual refere-se a um produto líquido obtível pelo processo de acordo com a invenção.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0021] **Figura 1A., Figura 1B.** Redução de contagens viáveis de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella Senftenberg*, *Saccharomyces cerevisiae* em suco de laranja a um pH de 3,8 após várias condições de tratamento por CEP. Os painéis da esquerda representam condições de CEP atualmente utilizadas, e painéis da direita mostram as condições de CEP da invenção. Referência às várias condições de tratamento por CEP relacionadas com cada painel é feita abaixo dos painéis da Figura 1B. Triângulos sólidos pretos: 10 kV/cm, 2 microssegundos; diamantes sólidos cinzas: 15 kV/cm, 2 microssegundos; círculos abertos brancos: 20 kV/cm, 2 microssegundos; círculos sólidos cinzas: 0,9 kV/cm, 1000 microssegundos; diamantes sólidos pretos: 2,7 kV/cm, 1000 microssegundos; diamantes abertos brancos: 2,7 kV/cm, 100 microssegundos; Linha em tracejado: limites de detecção.

[0022] **Figura 2.** Perfil de temperatura-condutividade de suco de laranja (pH 3,8), água de coco (pH 5,0) e suco de melancia (pH 6,0).

[0023] **Figura 3.** Redução de contagens viáveis de *E. coli* e *L. monocytogenes* em suco de laranja, água de coco e suco de melancia após tratamento por CEP a 2,7 kV/cm, 1000 microssegundos.

[0024] **Figura 4.** Análise microbiana (n = 6) de suco de laranja não tratado e

tratado com CEP, onde algumas análises foram qualitativas (Figura 4B) e outras quantitativas (Figura 4A).

[0025] **Figura 5.** Avaliação sensorial das amostras de suco de laranja armazenadas a 7°C e à temperatura ambiente durante o período de tempo indicado, onde as amostras foram indicadas como 'bom' quando é comparável ao suco de laranja recentemente espremido e 'não bom' se não sendo comparável a suco de laranja recentemente espremido.

[0026] **Figura 6.** A quantidade de sólidos solúveis (°Brix) em suco de laranja antes do tratamento com CEP e após o tratamento com CEP durante 3 meses de armazenamento a 7°C e à temperatura ambiente.

[0027] **Figura 7.** A acidez do suco de laranja antes de tratamento com CEP e após o tratamento com CEP durante 3 meses de armazenamento a 7°C e à temperatura ambiente.

[0028] **Figura 8.** pH do suco de laranja antes de tratamento com CEP e após o tratamento com CEP durante 3 meses de armazenamento a 7°C e à temperatura ambiente.

[0029] **Figura 9.** Teor de óleo de suco de laranja antes de tratamento com CEP e após o tratamento com CEP durante 3 meses de armazenamento a 7°C e à temperatura ambiente.

[0030] **Figura 10.** O teor de vitamina C do suco de laranja antes de tratamento com CEP e após o tratamento com CEP durante 3 meses de armazenamento a 7°C e à temperatura ambiente.

[0031] **Figura 11.** Atividade de pectinesterase antes do tratamento com CEP e após o tratamento com CEP durante 3 meses de armazenamento a 7°C e à temperatura ambiente.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0032] Os inventores encontraram agora condições de processamento de

CEP aplicáveis para produtos alimentares líquidos e produtos de alimentação líquidos, cujas condições são igualmente eficazes na inativação de bactérias Gram-negativas, bem como as bactérias Gram-positivas. Os inventores também descobriram as condições de processamento de CEP aplicáveis para produtos alimentares líquidos e produtos de alimentação líquidos, cujas condições são eficazes em ambas inativações de micróbios relativamente grandes e inativação de micróbios relativamente pequenos. Além disso, os inventores verificaram, surpreendentemente, as condições de processamento de CEP agora aplicável em condições de pH relativamente baixo, bem como aplicável em condições de pH mais elevado. Finalmente, os inventores descobriram condições de processamento de CEP aplicáveis a volumes maiores de processamento de produtos alimentícios líquidos e produtos de alimentação líquidos do que os volumes que eram anteriormente possíveis com os processos atualmente disponíveis.

[0033] Com isto, os inventores fornecem um processo que resolve muitos dos problemas relacionados com os processos conhecidos atualmente para o aquecimento de um produto líquido para se obter um produto líquido com uma carga microbiana diminuída.

[0034] A invenção atual refere-se a um processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo, para obter o produto líquido aquecido, compreendendo:

- (a) proporcionar um produto líquido;
- (b) proporcionar um aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo;
- (c) fornecer continuamente o produto líquido para a entrada do aparelho

e fluir o produto líquido através do aparelho;

(d) gerar continuamente uma corrente elétrica através do produto líquido que flui no aparelho, em que o mínimo de um pulso é aplicado sobre cada elemento do fluido durante a passagem, com uma duração de pulsos de, pelo menos, 10 microssegundos e em que a intensidade do campo elétrico é de 0,1 a 5 kV/cm; e

em que a temperatura máxima do produto líquido autonomamente permanece abaixo de 92°C durante o aquecimento resistivo.

[0035] De acordo com a invenção, o processo aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura de aquecimento por meio de aquecimento resistivo proporciona um produto líquido aquecido com uma carga microbiana diminuída.

[0036] O aquecimento de um produto líquido a uma temperatura acima de uma certa temperatura máxima, por exemplo, uma temperatura máxima predeterminada, pode causar redução indesejada de sabores frescos, vitaminas e nutrientes e desnaturação das proteínas presentes no produto fresco (não tratado). O grau de redução e desnaturação dos componentes está relacionado com a temperatura e tempo que o produto é exposto ao tratamento. Variados produtos líquidos são expostos a diferentes combinações tempo-temperatura para obter o grau desejado de inativação enzimática e microbiológica. Processos não-térmicos alternativos com uma temperatura e/ou tempo de exposição ao produto reduzidos estão, portanto, ganhando um grande interesse, uma vez que eles podem reter melhor as características frescas do produto. Quando a temperatura ou o tempo de exposição pode ser reduzido, uma melhor qualidade do produto pode ser esperada. No processo da invenção, o tempo de exposição ao calor é tremendamente reduzido e, devido às condições de processo escolhidas, a temperatura máxima do produto líquido permanece

autonomamente abaixo de cerca de 92°C durante o aquecimento resistivo. Preferencialmente, a temperatura máxima do produto líquido permanece autonomamente abaixo de uma temperatura crítica durante o aquecimento resistivo de acordo com o processo da invenção, a qual temperatura o produto líquido não sofre redução dos componentes sensíveis ao calor ou desnaturação das proteínas, se estiver presente no produto, enquanto que ao mesmo tempo a carga microbiana no produto líquido é reduzida para um nível aceitável direcionado. É agora, devido ao processo da atual invenção que as condições de processamento tenham se tornado aplicáveis as quais ambas previnem o superaquecimento do produto líquido enquanto ainda efetivamente e eficientemente baixa a carga microbiana do produto líquido.

[0037] No processo de acordo com a invenção, a duração do pulso de um único pulso é um fator crítico, em vez do tempo de tratamento total efetivo. Ao aplicar os tempos de duração de pulso de dois microssegundos e intensidades de campo elétrico de 10 kV/cm, determinou-se que a inativação de microrganismos não foi eficiente, apesar de o tempo de tratamento eficaz total ter sido quatro vezes maior do que a 20 kV/cm, que é a intensidade do campo elétrico a qual tratamento de CEP convencional é empregue. Sem pretender ser limitado pela teoria, a explicação é que com a intensidade do campo elétrico reduzida a 10 kV/cm o efeito de eletroporação é comprometido.

[0038] Os inventores verificaram agora, surpreendentemente, que em condições de baixas intensidades de campo elétrico de 0,1-5 kV/cm combinados com durações de pulsos prolongados de 100 e 1000 microssegundos, a inativação microbiana era eficaz para alcançar inativação em combinações tempo-temperatura menos intensivas do que o requerido por pasteurização térmica convencional ou tratamento por CEP a 10 kV/cm. Sem pretender ser limitado pela teoria, estes resultados indicam que a duração do pulso se tornou

o fator crítico no processo, de acordo com a invenção.

[0039] Sem querer estar limitado pela teoria, um campo elétrico externo aplicado a um produto tem uma influência sobre os canais de proteína na membrana celular, e/ou o domínio lipídico da membrana celular de um microrganismo presente no produto, resultando em mudanças conformacionais nos canais e/ou no domínio. Os canais proteicos da membrana abrem a um potencial de membrana de 50 mV, o que é consideravelmente inferior aos 150-400 mV necessários para a formação de poros na dupla camada lipídica (Tsong, 1992).

[0040] Como a abertura e fechamento de muitos canais de proteína é dependente de potenciais transmembranas, é tido como hipótese que quando o tratamento elétrico é aplicado, os canais de proteínas sensíveis à voltagem irão ser abertos. Uma vez que estes canais forem abertos, eles iriam conduzir corrente mais elevada do que a atual para as quais esses canais são projetados. Como resultado, estes canais podem se tornar irreversivelmente desnaturados por aquecimento Joule e/ou ocorrer a modificação elétrica dos seus grupos funcionais (Tsong, 1992). A abertura/fechamento de um canal de proteína ocorre no intervalo de tempo de sub-microsegundos, enquanto que a desnaturação de uma proteína leva de milissegundos a segundos (Tsong, 1992).

[0041] Isto sugere que os canais de proteína podem ser afetados em intensidades de campo elétrico de 3 a 8 vezes menores do que as intensidades dos campos elétricos em que camadas duplas lipídicas são afetadas; isto é, uma intensidade de campo elétrico de entre 2,5 kV/cm e 7 kV/cm para a inativação do canal de proteína em comparação com os 20 kV/cm necessários para danos irreversíveis por eletroporação da dupla camada lipídica (isto é, condições de CEP convencionais). De acordo com a invenção, uma intensidade de campo elétrico de entre 0,1 kV/cm e 5 kV/cm, em combinação com uma duração de

pulso de 10-1000 microssegundos, é suficiente e eficaz no que diz respeito ao estabelecimento de inativação eficiente de micróbios em um produto líquido. Por exemplo, o processo da invenção é aplicável para um produto líquido em um aparelho de CEP de 1 L/h ('sistema CEP'). Para exemplificar o referido produto líquido, a duração do pulso foi ajustada para 100 microssegundos ou 1000 microssegundos e a intensidade do campo elétrico selecionada, ou 'intensidade do campo elétrico', foi tanto de 0,9 kV/cm quanto 2,7 kV/cm. O número de pulsos aplicados para o produto líquido variou entre 0 e 35, o lapso de tempo entre dois pulsos consecutivos variou entre 0,6 milissegundos e 199 milissegundos, e, como um resultado, as temperaturas máximas obtidas variaram entre 36°C e 92°C. Ver, para uma descrição mais detalhada dos exemplos que demonstram a eficiência do processo da invenção, o Exemplo 1 abaixo.

[0042] Os inventores verificaram agora que a inativação microbiana foi, em particular, eficiente para as células vegetativas. Muito provavelmente, com base neste efeito do processo da invenção, o processo de acordo com a invenção proporciona um mecanismo eficiente de inativação também de esporos. Esporos contêm proteínas essenciais para a germinação na membrana interna e no córtex dos esporos que são alvos para a estímulos elétricos externos.

[0043] Como um exemplo adicional da aplicação do processo da invenção, por exemplo um lote de produto líquido é processado no processo da invenção, aplicando um aparelho de CEP de 1200 L/h para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio do aquecimento resistivo. A duração do pulso é 1000 microssegundos e a intensidade de campo elétrico é 2,0 kV/cm. O número de pulsos aplicados ao produto líquido é de cerca de 5 pulsos e o lapso de tempo entre dois pulsos consecutivos é 3,8 milissegundos. Ver, também, o exemplo 3, abaixo, para a

modalidade detalhada da invenção.

[0044] Uma modalidade da invenção é o processo de acordo com a invenção em que o pH do produto líquido está entre pH 1,5 e 9,0, preferencialmente acima de 4,6, preferencialmente entre 4,8 e 9,0, mais preferencialmente entre 5,5 e 8,0, mais preferencialmente entre 6,0 e 7,5. Uma modalidade da invenção é um processo da invenção em que o pH está acima de cerca de 5,0, preferencialmente cerca de 6,0.

[0045] Além disso, em uma modalidade a invenção refere-se ao processo de acordo com a invenção, em que o pH do produto líquido é menor do que 4,6, preferencialmente entre 1,5 e 4,6, mais preferencialmente entre cerca de 1,5 e cerca de 3,8.

[0046] Em uma modalidade adicional da presente invenção, no processo de acordo com a invenção, o pH do produto líquido é maior do que 4,6, preferencialmente entre 4,6 e 9,0. Uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção, em que o pH do produto líquido está entre 5,0 e 9,0, preferencialmente entre 6,0 e 9,0.

[0047] É agora, devido à aplicabilidade do processo da invenção, que os produtos líquidos com um amplo intervalo de pH são processados em um e o mesmo processo de acordo com a invenção. Uma vez que o processo da invenção é aplicável para o processamento de produtos líquidos com esse pH variando amplamente, a diversidade de produtos líquidos para os quais o processamento CEP é desejável e que são selecionáveis para processamento no processo da invenção, é muito grande. Virtualmente, qualquer produto líquido, ingrediente ou produto semiacabado aplicado, por exemplo, para processamento de alimento está agora adequado para o aquecimento rápido e homogêneo pelo processo da invenção. Devido à surpreendente descoberta dos inventores de que o seu processo de CEP é eficaz e eficiente em uma tal largo



intervalo de pH, o processamento de produtos alimentares com um processo que incorpora CEP de acordo com a invenção tem, agora, se tornado mais largamente acessível do que antes.

[0048] Além disso, uma modalidade da invenção é o produto líquido de acordo com a invenção, em que o produto líquido tem uma condutividade elétrica entre 0,01 e 10 S/m, medida a 20°C, mais preferencialmente entre 0,1 e 3 S/m, medida a 20°C, mais preferencialmente entre 0,2 S/m e 0,8 S/m, medida a 20°C.

[0049] A condutividade elétrica dentro destes limites indicados é, geralmente, preferida uma vez que tais condutividades elétricas auxiliam o aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido de acordo com o processo da invenção. Uma vez que a maioria dos produtos alimentares líquidos têm uma condutividade elétrica dentro dos limites aplicáveis para a aplicação do processo da invenção com os referidos produtos alimentares líquidos, o processo da invenção é aplicável para o processamento de numerosos produtos alimentares líquidos para as quais baixa carga microbiana é desejada. Por exemplo, a condutividade elétrica, a 20°C foi medida para vários lotes de produtos alimentares líquidos e foi, por exemplo, de 0,1 S/m para um suco de *cranberry*, de 0,15 S/m, para uma cerveja, 0,2 S/m para um suco de maçã, 0,4 S/m para um leite achocolatado, 0,45 S/m para um leite integral, 0,4 S/m para leite de soja, 0,25 S/m para leite de amêndoas, 1,0 S/m para suco de cenoura, e 1,8 S/m para o molho de tomate. Assim, o processo da invenção é aplicável a uma grande variedade de produtos alimentares líquidos amplamente variados.

[0050] Sem pretender ser limitado pela teoria, parece que as condições de processamento de CEP da invenção atual abrem uma forma de um novo mecanismo de inativação microbiana.

[0051] Os inventores verificaram agora que os produtos alimentares

líquidos são eficazmente pasteurizados, isto é, os micróbios foram inativados de forma eficaz e eficientemente, quando aplicada condições de processamento de CEP da invenção compreendendo uma intensidade de campo elétrico surpreendentemente baixa de 0,1-5 kV/cm, preferencialmente de 4 kV/cm ou inferior, mais preferencialmente de 3 kV/cm ou mais baixa, em combinação com uma duração de pulso de 10-1000 microssegundos, preferencialmente cerca de 1,000 microssegundos, mais preferencialmente cerca de 100 microssegundos, e a uma temperatura máxima do produto alimentar líquido de entre 40°C e 92°C, preferencialmente entre 50°C e 92°C, mais preferencialmente entre cerca de 60°C e 85°C.

[0052] De acordo com a invenção, a pasteurização mediante a aplicação do processo da invenção é particularmente eficiente e eficaz quando o número de pulsos aplicados para o produto líquido que flui continuamente é, pelo menos, 1, preferencialmente 1 a 100, mais preferencialmente 5-50 para cada elemento fluido durante passagem no interior da zona de tratamento.

[0053] O número de pulsos é dado pela equação 1, em que  $n$ , é o número de pulsos,  $V$  é o volume da câmara de tratamento (L),  $f$  é a frequência de pulso utilizada (Hz), e  $\phi$  é a taxa de fluxo (L/h):

$$n = \frac{V \cdot f}{\phi} \quad (\text{equação 1})$$

[0054] O número de pulsos não é uma etapa crítica na concepção do processo, desde que pelo menos um pulso seja aplicado a cada elemento de fluido que flui através das câmaras de tratamento do aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido, de acordo com a invenção. Para garantir que, pelo menos, um pulso para cada elemento do fluido seja aplicado, o sistema tem de ser concebido com a finalidade de que o tempo de residência na câmara de tratamento seja maior do que  $1/f$ . O número de pulsos aplicados será o resultado da concepção do processo, com base no rendimento desejado

de produto líquido ( $\phi$ , L/h), a condutividade do produto líquido ( $\sigma$ , S/m), a capacidade de calor específico do produto ( $c_p$ , kJ/kg.K), a densidade do produto ( $\rho$ , kg/m<sup>3</sup>), força de campo elétrico aplicada ( $E$ , V/m), duração do pulso ( $\tau_{pulse}$ , s) e gradiente de temperatura ( $\Delta T$ , °C), obtido com o processo (diferença entre a temperatura de entrada do produto líquido e a temperatura de saída). Relação entre estes parâmetros é dada na equação 2.

$$\Delta T(\rho \cdot c_p) = \sigma \cdot E^2 \cdot n \cdot \tau_{pulse} \quad (\text{equação 2})$$

[0055] Conforme mencionado antes, e como ilustrado adicionalmente no Exemplo 1, abaixo, a duração do pulso é crítica para a eficácia do tratamento com CEP de acordo com o processo da invenção. Assim, a aplicação de um pulso relativamente longo pode ser mais eficaz do que a aplicação de pulsos mais curtos, com um tempo total de tratamento eficaz semelhante.

[0056] Por exemplo, para um produto líquido processado em um aparelho de CEP de 1L/h de fluxo contínuo a 1L/h, de acordo com o processo da invenção, tipicamente, a duração do pulso é de cerca de 100-1000 microssegundos, e a intensidade do campo elétrico é de cerca de 2,7 kV/cm. Tipicamente, o número de pulsos é, então, cerca de 1-25, e os lapsos de tempo entre dois pulsos consecutivos é de cerca de 0,6-39 milésimos de segundo, dependentes do aumento de temperatura desejado entre as câmaras de tratamento, sendo a diferença entre a temperatura de entrada e a temperatura máxima.

[0057] Por exemplo, para um lote de produto líquido processado em um aparelho de CEP de 1200 L/h de acordo com o processo da invenção, tipicamente, a duração do pulso é de 1000 microssegundos, e a intensidade do campo elétrico é de cerca de 2,0 kV/cm, no processo de acordo com a invenção. Tipicamente, o número de pulsos é, então, cerca de 5, e os lapsos de tempo entre dois pulsos consecutivos é de cerca de 3,8 milissegundos.

[0058] Tipicamente, o processo da invenção é aplicável para o

processamento de um produto líquido em um aparelho de CEP tendo uma taxa de fluxo de entre 30 L/h e 200 L/h, de acordo com a invenção.

[0059] Tipicamente, o processo da invenção é aplicável para o processamento de um produto líquido em um aparelho de CEP tendo um rendimento de cerca de 30,000 L/h, de acordo com a invenção.

[0060] Uma modalidade da invenção é o processo da invenção em que o aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada tem um rendimento de entre cerca de 1 L/h e cerca de 30.000 L/h, preferencialmente cerca de 1 L/h ou cerca de 30 L/h, ou de cerca de 200 L/h, ou de cerca de 1200 L/h, ou de cerca de 30.000 L/h.

[0061] Mais uma vez, sem desejar estar limitado pela teoria, estas condições de processamento de CEP da invenção resultam em inativação de micróbios seguindo o mecanismo teórico de inativação dos canais de proteína de membrana de células. Estas novas condições de processamento de CEP da invenção proporcionam novas oportunidades na inativação microbiana em comparação com as condições de tratamento atualmente utilizadas para o CEP. Com estas novas condições da presente invenção, todos os microrganismos vegetativos são inativados, sem preferência de inativação de microrganismos relativamente grandes e/ou por microrganismos Gram-negativos, em comparação com microrganismos relativamente menores e/ou os microrganismos Gram-positivos.

[0062] Assim, com o processo da invenção, os microrganismos Gram-negativos tais como, por exemplo, cepas de *Escherichia coli*, espécies de *Salmonella*, outras Enterobactérias e bactérias de ácido acético são inativadas em produtos líquidos. Além disso, com o processo da invenção, os microrganismos Gram-positivos tais como, por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, cepas de *Leuconostoc* e espécies de

*Streptococcus* são também inativadas em produtos líquidos. Com base no mecanismo teórico esperado, espera-se que as bactérias formadoras de esporos também possam ser inativadas, uma vez que sua membrana celular também contém canais sensíveis à voltagem, tais como bactérias *Alicyclobacillus* e bactérias *Clostridium*. Além disso, os esporos em si contêm proteínas essenciais para a germinação na membrana interna e no córtex dos esporos que podem ser alvo pelos pulsos externos aplicados.

[0063] Além disso, o processo da invenção é adequado para a inativação em produtos líquidos de microrganismos relativamente grandes, tais como, por exemplo, leveduras e bolores. O processo da invenção também é adequado para a inativação em produtos líquidos de microrganismos relativamente pequenos, tais como, por exemplo *L. monocytogenes*. Naturalmente, o processo da invenção é igualmente apropriado para a inativação em produtos líquidos de microrganismos com tamanhos de entre os tamanhos destes microrganismos exemplificados, mostrados no exemplo 1.

[0064] Em seguida, com estas novas condições da invenção, a inativação de microrganismos em todos os tipos de produtos (alimentos líquidos) é agora possível, uma vez que as condições de processamento CEP da invenção são igualmente eficazes na inativação de microrganismos em produtos alimentares líquidos tendo um pH relativamente baixo e em produtos alimentares líquidos possuindo um pH relativamente elevado.

[0065] Finalmente, devido à intensidade do campo elétrico inferior utilizado nas condições de processamento de CEP da invenção quando comparadas com as condições de CEP atualmente aplicadas, essas condições da presente invenção são facilmente ampliadas, como tensões de pico inferiores são usados na invenção, tornando as condições de processamento de CEP da presente invenção aplicáveis para implementação na indústria em volumes e

rendimento maiores. O processo da invenção é especialmente adequado para produtos alimentares líquidos submetidos ao processo da invenção em um aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura de aquecimento por meio de aquecimento resistivo, quando o tempo de residência do líquido na alta região de campo é de cerca de 17 milissegundos a 2 segundos. A frequência dos pulsos é restrita entre 1 kHz e 50 kHz, para evitar a liberação de metal dos eletrodos (Mastwijk, 2006). Tipicamente, de acordo com a invenção, no processo da invenção, a taxa de fluxo do produto líquido é, então, entre cerca de 1 L/h, e 5000 L/h, preferencialmente entre cerca de 1000 L/h e 30,000 L/h.

[0066] Uma modalidade adicional da invenção é um processo de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores da invenção, em que o produto líquido é um produto alimentar líquido ou um produto de alimentação líquido.

[0067] Além disso, uma modalidade da invenção é o processo de acordo com a invenção, em que o produto líquido é um ingrediente, produto semiacabado ou um produto líquido final, como suco de fruta, suco de vegetais, alimentos infantis, geleias, pastas ou batidas, uma bebida alcoólica ou não alcoólica, produto lácteo, produto de leite vegetal, de ovo líquido, uma sopa ou molho.

[0068] Uma modalidade da invenção é um processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo de acordo com a invenção, em que o produto lácteo é selecionado a partir de leite, um produto de leite ou uma composição líquida compreendendo um componente de leite ou uma fração do leite.

[0069] Além disso, uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção, em que o produto líquido é um produto lácteo que compreende leite, um produto lácteo, um componente de leite ou uma fração de leite.

[0070] Um aspecto importante da invenção é a constatação de que, durante o processamento de CEP, nenhuma seção de arrefecimento entre as câmaras de tratamento de um aparelho aplicado no processo de acordo com a invenção é necessária a fim de manter a temperatura do produto líquido abaixo de cerca de 92°C, ou abaixo de cerca de 85°C, ou abaixo de cerca de 70°C, ou abaixo de cerca de 60°C, de acordo com a invenção.

[0071] Conforme mencionado anteriormente, no estado atual dos processos da técnica, as seções de arrefecimento são adicionadas entre as câmaras de tratamento para evitar o sobreaquecimento do produto líquido. Como foi dito, é agora uma descoberta importante no âmbito da invenção atual que o arrefecimento durante o processo da invenção não é necessário, uma vez que o aquecimento a temperaturas críticas é muito rápido (sendo o tempo de permanência nas câmaras de tratamento, sendo menos do que 1 segundo) e o tempo de exposição à temperatura máxima é muito curto.

[0072] Para se ter um processo eficiente, apenas a exposição a temperaturas críticas (sendo a temperatura à qual a qualidade do produto será afetada) é obtido com energia elétrica, descrito na invenção. O domínio de temperatura não-crítico pode ser pré-aquecimento com aquecimento convencional. Assim, preferencialmente, no processo, o produto líquido é pré-aquecido a uma temperatura no intervalo de 20°C a 70°C antes de ser fornecido ao aparelho, preferencialmente entre 35°C a 65°C, mais preferencialmente de 40°C a 60°C. Uma modalidade da invenção é o processo de acordo com a invenção, em que o produto líquido é pré-aquecido antes de ser fornecido ao aparelho a uma temperatura no intervalo de 20°C a 70°C, preferencialmente de 35°C a 65°C, mais preferencialmente de 40°C a 60°C.

[0073] Para fins práticos, os produtos líquidos submetido ao processo de acordo com a invenção, tal como um produto alimentar líquido, são arrefecidos

até à temperatura ambiente ou imediatamente inferior, por exemplo, arrefecido a 2-8°C. Uma vez que não é necessário qualquer tempo de retenção, o arrefecimento de um produto líquido prossegue diretamente (preferencialmente, dentro de 3 segundos) depois de o produto líquido deixar a região de campo elevado. Na concepção de processo atual da invenção, os tubos de arrefecimento podem ser instalados a jusante de 0,5 m a partir da região de campo elevado. Para um sistema de 30,000 L/h (=8.3L/s) com 3" de diâmetro de tubagens, isto significa um volume de 2,2 L ou 0,27 segundos antes de entrar na primeira seção de arrefecimento e um valor aproximado de 1-5 segundos (dependendo da viscosidade) antes da temperatura crítica cair do primeiro 10°C da temperatura máxima ser estabelecida, seguido por arrefecimento (convencional) em direção à temperatura de saída desejada no intervalo de 4-7°C.

[0074] O termo "autonomamente" tem o seu significado normal, e aqui refere-se à temperatura do produto líquido que atinge um determinado valor no processo da invenção sem a ajuda de arrefecimento externo (ou aquecimento) durante o tratamento.

[0075] O produto líquido, tal como por exemplo um produto alimentar líquido selecionado a partir de suco de laranja, um produto lácteo, água de coco, suco de melancia, é por exemplo pré-aquecido a cerca de 40°C, cerca de 50°C ou cerca de 60°C. Por exemplo, para a inativação de microrganismos eficientes e eficazes em um produto líquido mediante aplicação do processo da invenção, o produto líquido é pré-aquecido até entre cerca de 30°C a 65°C, preferencialmente entre 36°C e 59°C.

[0076] Preferencialmente, a temperatura máxima do produto líquido permanece autonomamente abaixo de cerca de 85°C durante o aquecimento resistivo, mais preferencialmente, inferior a cerca de 70°C, ou abaixo de cerca



de 63°C, ou abaixo de cerca de 60°C, de acordo com a invenção. É parte da presente invenção que os parâmetros de processo do processo da invenção sejam selecionados de tal modo que a temperatura máxima do produto líquido permaneça autonomamente abaixo de uma temperatura selecionada. A ou abaixo da temperatura selecionada a morte de forma eficiente e eficaz dos microrganismos presentes no produto líquido é assegurada, ao passo que a redução indesejada de sabores frescos, vitaminas e os nutrientes e a desnaturação das proteínas presentes no produto líquido fresco (não tratado) é impedida, ou pelo menos impedida, em grande medida, na execução do processo da invenção.

[0077] Ao aplicar a intensidade de campo elétrico de acordo com a invenção, com uma duração de pulso de acordo com a invenção, os inventores verificaram, surpreendentemente, que a temperatura do produto líquido permanece abaixo de uma temperatura máxima de cerca de 92°C, ou cerca de 85 °, ou cerca de 70°C, ou cerca de 60°C, de acordo com a invenção, fazendo com que o processo da invenção seja particularmente adequado para aplicação em uma configuração em larga escala, por exemplo, um estabelecimento comercial. Um exemplo de uma aplicação comercial do processo da invenção é o processamento de um produto alimentar líquido em um aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo, em que o fluxo de produto alimentar líquido através do aparelho é entre cerca de 500 L/h para 30,000 L/h, por exemplo, cerca de 1200 L/h, de acordo com a invenção.

[0078] Portanto, uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção, em que a temperatura do produto líquido permanece autonomamente abaixo de 85°C durante o aquecimento resistivo, preferencialmente abaixo de 75°C, mais preferencialmente abaixo de 60°C.

[0079] Em uma modalidade, a invenção refere-se ao processo de acordo com a invenção em que a intensidade do campo elétrico é mais baixa do que cerca de 5 kV/cm.

[0080] Uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção, em que a intensidade do campo elétrico é de 0,5 a 5 kV/cm, mais preferencialmente 2,5 a 4 kV/cm. Em uma modalidade, a invenção refere-se ao processo da invenção em que a intensidade do campo elétrico é inferior a cerca de 3 kV/cm, preferencialmente cerca de 2,7 kV/cm ou inferior, mais preferencialmente entre cerca de 0,9 e cerca de 2,5 kV/cm.

[0081] Uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção, em que a duração do pulso é de, pelo menos, 10 microssegundos, mais preferencialmente de 10 a 2000 microssegundos, ainda mais preferencialmente de 50 a 500 microssegundos, mais preferencialmente de 50 a 100 microssegundos. Em uma modalidade, a invenção refere-se ao processo de acordo com a invenção, em que a duração do pulso é entre cerca de 100 microssegundos e cerca de 1000 microssegundos. Em uma modalidade adicional, a invenção refere-se a um processo de acordo com a invenção em que a duração do pulso é de 1000 microssegundos ou inferior, preferencialmente cerca de 100 microssegundos.

[0082] Uma modalidade da invenção é o processo de acordo com a invenção, em que os pulsos aplicados são pulsos bipolares. Assim, uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção em que o mínimo de um pulso aplicado ao produto líquido é um pulso aplicado em forma de pulso bipolar. É vantajoso aplicar um pulso bipolar para o produto líquido para evitar danos ao eletrodo (Loeffler, 1996). Claro, que é parte da invenção que também outros tipos de pulsos sejam igualmente aplicáveis no processo da invenção.

[0083] O processo da invenção é particularmente adequado para a inativação de microrganismos em produtos alimentares líquidos, tais como sucos, molhos, produtos lácteos. Ou seja, exemplos de tais produtos alimentares líquidos são um ingrediente, um produto semiacabado ou um produto líquido final, como um suco de fruta, um suco de vegetais, um alimento infantil, uma geleia, uma pasta ou uma batida, uma bebida alcoólica ou não alcoólica, um produto lácteo, um produto de leite vegetal, um ovo líquido, uma sopa ou molho.

[0084] Uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção, em que o processo é um processo para a inativação de microrganismos no produto líquido. Como foi dito antes, o processo da presente invenção tem muitas vantagens sobre os processos atuais para o aquecimento de um produto líquido por meio de aquecimento resistivo. Uma das principais vantagens atingíveis com o processo da invenção é o de pasteurização de um produto líquido, por exemplo um produto alimentar líquido, em que o microrganismo é pequeno ou grande, e em que o microrganismo é um micróbio Gram-negativo ou um micróbio Gram-positivo.

[0085] Para fins práticos, os produtos líquidos submetidos ao processo de acordo com a invenção, tal como um produto alimentar líquido, são arrefecidos até à temperatura ambiente ou inferior, por exemplo, arrefecidos a 2-8°C, imediatamente após o processo da invenção ser aplicado ao produto líquido.

[0086] Portanto, uma modalidade da invenção é um processo, onde o produto líquido aquecido é arrefecido imediatamente depois de correr através do aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio do aquecimento resistivo. Naturalmente, para finalidades práticas, o arrefecimento é aplicado apropriadamente imediatamente a partir do momento que o produto líquido

está fluindo através do instrumento, por exemplo o mais rápido possível, preferencialmente dentro de 3 segundos. Assim, também uma modalidade da invenção, é um processo de acordo com a invenção, em que o produto líquido aquecido é arrefecido após a transferência através do aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura de aquecimento por meio do aquecimento resistivo. É parte da invenção que o processo de acordo com a invenção seja apropriado para a aplicação com um instrumento para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura de aquecimento por meio do aquecimento resistivo, o qual instrumento funciona a uma taxa de fluxo de produto líquido entre cerca de 0,5 L/H a cerca de 2000 L/H, preferencialmente a cerca de 0,5 L/H a cerca de 2 L/H, mais preferencialmente a cerca de 1 L/H, ou igualmente preferencialmente cerca de 100 L/H a cerca de 2000 L/H, preferencialmente cerca de 1000 a 1500 L/H, mais preferencialmente a cerca de 1200 L/H. Preferencialmente, a taxa de fluxo é cerca de 30,000 L/H.

[0087] Como foi dito antes, foi previamente estabelecido que o pré-aquecimento de um produto líquido antes de se submeter o referido produto líquido a um processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo, melhora a eficiência de inativação durante o processo. No entanto, o arrefecimento do produto líquido durante o curso do processo era um pré-requisito, uma vez que o produto líquido aquecia a valores inaceitáveis mediante aplicação das condições de CEP conhecidas na técnica. Como foi dito, é agora uma descoberta importante no âmbito da invenção atual que o arrefecimento durante o processo da invenção não é necessário, desde que a temperatura do produto líquido não exceda um limite inaceitável. Portanto, no processo da invenção atual, o produto líquido é adequadamente pré-aquecido antes de

submeter o produto líquido ao processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo, sem a necessidade de resfriamento durante o processo. Assim, preferencialmente, no processo, o produto líquido é pré-aquecido a uma temperatura no intervalo de 20°C a 70°C antes de ser fornecido ao aparelho, preferencialmente de 35°C a 65°C, mais preferencialmente de 40°C a 60°C.

[0088] O processo de acordo com a invenção é muito eficaz e eficiente na inativação de microrganismos presentes no produto líquido submetido ao processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo de acordo com a invenção. Aplicando o processo da invenção a um produto líquido compreendendo microrganismos, a contagem microbiana é reduzida com pelo menos 2 log ufc/mL, mais preferencialmente de 6 log ufc/mL ou mais.

[0089] Assim, preferencialmente a invenção é um processo em que a contagem microbiana (unidade formadora de colônias; ufc) no produto líquido é reduzida em pelo menos 2 log ufc/mL, preferencialmente, pelo menos, 5 log Ufc/mL, mais preferencialmente de 6 log ufc/mL ou mais. Uma modalidade da invenção é um processo de acordo com a invenção em que a contagem microbiana no produto líquido é reduzida em, pelo menos, de 4 log ufc/mL, preferencialmente em pelo menos, 7 log ufc/mL.

[0090] Os inventores estabeleceram que tais reduções da contagem microbiana em produtos alimentares líquidos contribui em grande extensão para a preservação de medidas de qualidade do produto. Por exemplo, sabor, cheiro, cor e aparência são preservados durante um longo período de tempo para produtos alimentares líquidos submetidos ao processo da invenção, quando comparado com produtos alimentares líquidos não tratados. Por exemplo, com o processo da invenção, o sabor e cheiro do suco de laranja do

produto alimentar líquido são preservados durante cerca de 60 dias ou mais, após a aplicação do processo da invenção para o suco de laranja, quando o suco é armazenado a cerca de 7°C. Igualmente vantajoso é a consolidação da qualidade do suco de laranja durante cerca de 23 dias, quando mantido à temperatura ambiente, depois de se submeter o suco de laranja ao processo da invenção.

[0091] O processo da invenção revela-se igualmente aplicável para a inativação de microrganismos Gram-positivos em um produto líquido, e para a inativação de microrganismos Gram-negativos em um produto líquido. Além disso, o tamanho do microrganismo não desempenha um papel limitante, o que significa que os microrganismos de tamanho tanto pequeno ou maiores são inativados pelo processo de acordo com a invenção. Os vários aspectos e modalidades da invenção são, portanto, uma importante contribuição para a técnica, uma vez que até à presente invenção, pequenos microrganismos Gram-positivos não podem ser eficientemente inativados com processos conhecidos para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura de aquecimento por meio de aquecimento resistivo. Uma modalidade da invenção é, portanto, um processo de acordo com a invenção em que micróbios opcionalmente compreende microrganismos Gram-positivos.

[0092] Quando se aplica o processo de acordo com a invenção com um produto líquido, o pH do produto líquido é minimamente alterado durante o curso do processo, se alterado em alguma forma. Esta é uma característica adicional benéfica do processo de acordo com a invenção.

[0093] Em uma modalidade, a invenção refere-se assim a um processo, em que o pH do produto líquido no final do processo está dentro de 0,5 unidades de pH do pH no início do processo, preferencialmente dentro de 0,2 unidade de pH, mais preferencialmente dentro de 0,1 unidades de pH, mais preferencialmente

dentro de 0,05 unidades de pH.

[0094] O processo de acordo com a invenção é adequado para produtos líquidos, em particular produtos alimentares líquidos.

[0095] Um segundo aspecto da invenção refere-se a um produto líquido obtenível pelo processo de acordo com a invenção, tal como foi descrito acima.

[0096] A invenção é ilustrada adicionalmente pelos seguintes exemplos não limitativos, fornecidos abaixo.

#### EXEMPLOS

**Exemplo 1: Inativação microbiana de *E. coli.*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella* Senftenberg e *Saccharomyces cerevisiae*, a pH = 3,6 em suco de laranja (escala de 1 L/h)**

[0097] Microrganismos patogênicos e deteriorantes foram selecionados com base na sua morfologia e sua associação com e prevalência em suco de frutas. Além disso, a resistência ao calor ou resistência a CEP das cepas foi utilizado como um critério para a seleção das cepas. Microrganismos selecionados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas bacterianas e cepa de levedura utilizada neste exemplo

Espécies/Cepas usadas	Coleção de cultura	Bactéria/levedura	Estrutura da parede celular	Tamanho* (micrômetro)	Referência
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	Bactéria	Gram-negativa	1,1-1,5 x 2-6	Gurtler <i>et al.</i> (2011)
<i>Listeria monocytogenes</i> NV8		Bactéria	Gram-positiva	0,4-0,5 x 0,5-2	VanderVeen <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC14917	Bactéria	Gram-positiva	0,9-1,2 x 3-8	Campos e Cristianini (2007)
<i>Salmonella</i>	ATCC43845	Bactéria	Gram-negativa	0,7-1,5 x 2-5	Doyle e

<i>enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg					Mazzotta (2000)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1544	Levedura		3-15 x 2-8	Put <i>et al.</i> (1976)
CBS: Centraal Bureau voor Schimmelcultures (Centro de Biodiversidade de Fungos, Utrecht, Holanda); ATCC: American Type Culture Collection, EUA *Dimensões características retiradas de Bergey, 1986.					

[0098] Culturas frescas de todos os cinco microrganismos listados na Tabela 1 foram preparadas a partir de plaqueamento de estoque congelado em cultivos em meio e durante a noite. Cultura de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg, foi descrito em Timmermans *et al.*, 2014. Culturas frescas de *Lactobacillus plantarum* foram preparadas de modo semelhante, por plaqueamento de estoque congelado em meio MRS, contendo 52,2 g de MRS (De Man, Rosoga e Sharp broth, Merck) e 12 g de ágar por 1 L de água destilada. As placas foram incubadas durante a noite a 30°C. Uma única colônia foi utilizada para inocular um frasco de 100 mL com 10 mL de caldo de MRS e cultivada durante 24 h a 20°C em uma incubadora com agitação (180 rpm). A partir desta cultura, 200 microlitros foram usados para inocular 19,8 mL de caldo de MRS fresco, suplementado com glucose a 1% (100 mL frasco) e incubadas durante 24 h a 20°C e 180 rpm.

[0099] Após o cultivo, as células foram lavadas e suspensão do microrganismo selecionado foi adicionada ao suco de laranja (Minuto Maid®), a uma concentração final de cerca de  $1,0E + 8 - 1.0E + 9$  ufc/mL.

[00100] A suspensão inoculada foi bombeada através de um sistema de CEP de 1 L/h a uma taxa de fluxo de  $13,0 \pm 0,5$  mL/min e pré-aquecida a 36°C antes do tratamento elétrico. Em seguida, a suspensão entrou em duas câmaras de



tratamento co-lineares posicionadas verticalmente, onde o tratamento elétrico foi dado. Devido à variação na intensidade das condições de tratamento (intensidade de campo elétrico, duração do pulso e o número de pulsos aplicados) suco foi aquecido até temperaturas máximas variáveis de forma autônoma (a Tabela 2 ilustra as condições utilizadas). Nenhuma seção de retenção foi adicionada, de modo que diretamente após deixar as câmaras de tratamento (dentro de 3 segundos) o suco foi arrefecido por meio de uma espiral de aquecimento que foi imerso em um banho de água. Na saída, as amostras foram coletadas de forma asséptica. Devido à variação na frequência escolhida, o número de pulsos aplicados e consequente aumento da temperatura, levando a temperatura máxima variada (Tabela 2). Foram recolhidas amostras a diferentes temperaturas máximas, e cinéticas para a intensidade do campo e duração do pulso elétrico fixo foram determinados.

[00101] O número de células microbianas viáveis foi determinado através do plaqueamento de 100 µL de suco tratada com CEP diluído em série em diluente de sal fisiológico peptona estéril (PSDF) em placas de ágar adequadas suplementado com 0,1% de piruvato de sódio para aumentar o crescimento de células sub-letalmente danificadas (Timmermans *et al.*, 2014). Células sobreviventes foram enumeradas após 5 dias de incubação a 25°C (*S. cerevisiae*), 30°C (*L. monocytogenes*, *L. plantarum*) ou 37°C (*S. Senftenberg*, *E. coli*).

[00102] Temperatura antes e imediatamente após as câmaras de tratamento foi medida utilizando termopares Hyp-O tipo T (Omega). Além disso, a temperatura máxima foi medida indiretamente usando um NTC-resistor para monitorar a temperatura máxima. Pulsos bipolares de onda quadrada, tensão e corrente na câmara de tratamento foram registrados com um osciloscópio digital (Rigol DS1102E). A energia elétrica foi obtida por integração numérica da tensão e traços de corrente, e é igual à potência calórica dentro do erro

experimental (10%), de acordo com (Mastwijk, 2006) e (Timmermans *et al.*, 2014)

[00103] Todos os experimentos foram realizados em duplicado.

Tabela 2: Condições de CEP utilizados neste estudo

Intensidade do campo elétrico (kV/cm)	Duração do pulso (microsegundos)	Tempo de residência nas duas câmaras de tratamento (milissegundos)	Frequência (Hz)	Número de pulsos	Tempo calculado entre 2 pulsos consecutivos (milissegundos)	Temperatura máxima (°C)
20	2	14.5 ± 0.5	[0-964]	[0-14]	[1.0-5.5]	[36-54]
15	2	48.9 ± 1.9	[0-964]	[0-47]	[1.0-5.5]	[36-62]
10	2	227.3 ± 8.5	[0-964]	[0-204]	[1.0-5.5]	[36-70]
2,7	100	17.5 ± 0.7	[0-1400]	[0-25]	[0.6-2.7]	[36-70]
2,7	1000	17.5 ± 0.7	[0-210]	[0-4]	[4.7-39]	[36-87]
0,9	1000	695.9 ± 26	[0-50]	[0-35]	[19.0-199]	[36-92]

[00104] As condições testadas são fornecidas na Tabela 2. As dimensões da câmara de tratamento variaram para se obter uma intensidade de campo elétrico variável. Como um resultado desta dimensão variável, os tempos de residência dentro das câmaras de tratamento não foram os mesmos para todas as condições testadas. Para obter a temperatura máxima desejada, a frequência foi ajustada. Finalmente, o número de pulsos foi calculado tomando o produto do tempo de residência e de frequência utilizados. Tempo entre dois pulsos foi calculado dividindo-se o tempo de residência pelo número de pulsos, menos a duração do pulso.

[00105] A inativação é mostrada como o logaritmo do número de microrganismo sobreviventes em condições testadas,  $N$ , dividida pela concentração de partida de microrganismos,  $N_0$ , sendo  $\log_{10}(N/N_0)$ . Na Figura 1, a inativação é mostrada como uma função da temperatura máxima na saída da

câmara de tratamento para os microrganismos testados. No painel da esquerda, a inativação a diferentes intensidades de campo elétrico para pulsos curtos (2 microssegundos) é apresentada, demonstrando o estado atual da técnica, e no painel da direita, a inativação a diferentes intensidades de campo elétrico para pulsos longos (isto é, 100 ou 1000 microssegundos) é apresentada demonstrando o invento descrito neste pedido.

[00106] A inativação de *E.coli* em suco de laranja como uma função da intensidade do campo elétrico e duração da variação do pulso é mostrada na Figura 1.

[00107] Aumento da intensidade do campo elétrico a duração de pulsos constante resultou em mais inativação, a uma temperatura máxima escolhida, o que pode ser visto na Figura 1, tanto pelo painel da esquerda na Figura 1 (intensidade de campo elétrico é de 10 kV/cm, 15 kV/cm ou 20 kV/cm; duração de pulsos é de 2 microssegundos) quanto pelo painel da direita na Figura 1 (intensidade de campo elétrico é de 0,9 kV/cm ou 2,7 kV/cm; duração do pulso é de 1000 microssegundos).

[00108] Este efeito de aumento da intensidade do campo elétrico também pode ser observado para os outros microrganismos mostrados na Figura 1, que apresentam mais inativação a uma intensidade mais elevada do campo elétrico. Espera-se que um aumento adicional da intensidade do campo elétrico das condições descritas na presente invenção, até 5 kV/cm, reduza a temperatura máxima ainda mais, enquanto ainda inative o número desejado de microrganismos.

[00109] Sem pretender ser limitado pela teoria, isto é explicado pela ultrapassagem do campo elétrico externo aplicado (E) através da intensidade de campo elétrico crítico ( $E_c$ ) da membrana, levando a um maior dano e inativação (Alvarez *et al.*, 2006). O  $E_c$  varia para diferentes microrganismos, e existe um

consenso no campo técnico que a inativação microbiana requer intensidade de campo elétricas acima de 5 kV/cm (Raso *et al.*, 2014). No entanto, os inventores agora mostram pela primeira vez que também uma intensidade de campo elétrico de abaixo de 5 kV/cm, por exemplo, 2,7 kV/cm, é eficaz para alcançar a inativação de microrganismos a um nível suficiente de  $1.0E-7$  ( $N/N_0$ ) ou inferior, de acordo com a invenção. Comparando-se os painéis da esquerda da Figura 1, com os painéis da direita, vê-se que uma intensidade de campo elétrico de 2,7 kV/cm com uma duração de pulso de 100 microssegundos ou de 1000 microssegundos fornece inativação de microrganismos a um grau mais alto, em comparação com as intensidades de campo elétrico mais altas e duração de pulsos mais curtas comumente aplicadas no campo.

[00110] Sem pretender ser limitado pela teoria, é proposto que a duração do pulso desempenha um papel crítico na inativação do microrganismo, sugerindo um outro mecanismo para as condições descritas na presente invenção do que o usado hoje. Supõe-se que quando a duração do pulso for suficientemente longa, canais de proteínas sensíveis à voltagem irão ser abertos, e conduzirá uma corrente mais elevada do que a que se destinam. Como resultado, os canais se tornarão irreversivelmente desnaturados, e as células vão perder a sua viabilidade.

[00111] Os dados de inativação de *E. coli* não mostram nenhuma diferença no grau de inativação de 2,7 kV/cm, quando os pulsos de 100 ou 1000 microssegundos são utilizados, sugerindo que a duração crítica de um pulso é inferior a 100 microssegundos.

[00112] Além disso, pode ser visto que microrganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos podem ser inativados até  $1.0E-7$  ( $N/N_0$ ) usando estas novas condições de CEP. Também o tamanho dos microrganismos não desempenha um papel proeminente no grau de inativação (painel direito), como

fazem com as atuais condições do estado da técnica (painel esquerdo). Apesar de leveduras poderem ser inativadas a temperaturas máximas inferiores a 2,7 kV/cm que *L. plantarum* e *S. Senftenberg*, nenhuma grande diferença é encontrada entre *E. coli* e *L. monocytogenes*, nas novas condições de CEP, enquanto maiores diferenças são encontradas com condições atuais de CEP usadas (painéis da esquerda).

**Exemplo 2: Inativação microbiana de *E. coli* e *Listeria monocytogenes* em produtos com características variáveis (escala 1 L/h)**

[00113] *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Listeria monocytogenes* NV8 foram preparadas a partir de estoque congelado, e cultivadas em caldo de triptona de soja (*E. coli*) ou Caldo de Infusão de Brain Heart (*L. monocytogenes*), de acordo com o método descrito em (Timmermans *et al.*, 2014).

[00114] Após cultivo, as células foram lavadas e suspensas para atingir uma concentração de cerca de  $1,0 \times 10^8$  ufc/mL para suco de laranja (Minuto Maid®), água de coco (Healthy People) ou suco de melancia (espremido recentemente), tendo, cada, um pH diferente e condutividade (ver Figura 2). O mesmo sistema de aparelho de CEP e configuração foi usado como descrito no Exemplo 1, com uma taxa de fluxo de  $13,5 \pm 0,5$  mL/min. No entanto, apenas uma condição de processo é utilizada: intensidade do campo elétrico de 2,7 kV/cm e duração do pulso de 1000 microssegundos. Uma vez que a condutividade varia entre os três produtos (Figura 2), uma configuração de frequência diferente era necessária e o número de pulsos dados durante o tratamento para atingir uma temperatura máxima similar para cada produto foram diferentes. Na Tabela 3, o intervalo de frequências testado, o número de pulsos e as temperaturas máximas após o tratamento para os três sucos testados são apresentados.

[00115] A inativação é mostrada como o logaritmo do número de microrganismo sobreviventes em condições testadas, N, dividido pela

concentração de partida de microrganismos,  $N_0$ , sendo  $\log_{10}(N/N_0)$ .

Tabela 3: Condições de CEP utilizadas neste estudo

Produto	Intensidade do campo elétrico (kV/cm)	Duração do pulso (micro-ondas)	Tempo de residência nas duas câmaras de tratamento (milissegundos)	Frequência (Hz)	Número de pulsos	Temperatura máxima (°C)
Suco de laranja	2,7	1000	17,5 ± 0,7	[0-210]	[0-4]	[36-87]
Suco de melancia	2,7	1000	17,5 ± 0,7	[0-240]	[0-4]	[36-72]
Água de coco	2,7	1000	17,5 ± 0,7	[0-100]	[0-2]	[36-76]

[00116] Inativação de *E. coli* e *L. monocytogenes* em várias temperaturas máximas nos vários sucos são mostradas na Figura 3. Quando as curvas de inativação de *E. coli* (Figura 3 A) e *L. monocytogenes* (figura 3B) são comparadas para os vários meios líquidos, isto é, a produtos líquidos suco de laranja, água de coco e suco de melancia, vê-se que não há diferenças observadas para as temperaturas às quais inativação se inicia. Além disso, o grau de inativação é semelhante para suco de laranja, água de coco e suco de melancia. Isto mostra que a variação do pH da matriz do produto, ou seja, o suco de laranja, suco de melancia e água de coco de produtos líquidos, e a variação da condutividade elétrica têm nenhum efeito sobre o grau de inativação. Por outro lado, uma curva de inativação comparável mostrando inativação à temperatura similar é encontrada em bactérias Gram-negativas *E. coli* (com um tamanho de célula de bactéria de cerca de 0,7–1,5 micrômetros x 2,5 micrômetros) e para *L. monocytogenes* Gram-positiva (com um tamanho de célula de cerca de 0,4-0,5 micrômetros x 0,5-2 micrômetros), indicando nenhuma diferença para os microrganismos usados.

[00117] Isto mostra que o processo da invenção aplicado ao suco de laranja, água de coco e suco de melancia é igualmente eficaz e eficiente no que se refere à inativação de bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, em uma variedade de diferentes meios líquidos, isto é, diferentes produtos alimentares líquidos.

### **Exemplo 3: Validação microbiana a escala de 1200 L/h**

[00118] Um lote de laranjas (variedade: *Natal Folha Murcha*) foi comercialmente prensado para se obter 4,000 L de suco de laranja. O suco de laranja não foi inoculado com microrganismos, de modo que a população de microrganismos naturalmente presentes no suco de laranja foi estudada para validar as condições de processo previamente determinadas a 1 L/h a grande escala (1,200 L/h).

[00119] O suco de laranja foi bombeado a um fluxo de  $1,200 \pm 100$  L/h e pré-aquecido a  $59^\circ\text{C}$ . Os pulsos foram entregues em três câmaras de tratamento posicionadas verticalmente para atingir uma temperatura máxima de  $70^\circ\text{C}$ . O volume da zona de tratamento na câmara de meio de tratamento era menor (dimensões de comprimento: 14 mm, 8 mm de diâmetro) do que a zona de tratamento da primeira e terceira câmaras de tratamento (exterior) (dimensões comprimento 14 mm, diâmetro 12 mm). Devido às ligações das fontes de energia, isso resultou em uma intensidade de campo elétrico dupla na câmara de tratamento do meio em comparação com as câmaras de tratamento exteriores, sendo de 1,9 kV/cm no meio e 1,0 kV/cm na câmara de tratamento exterior. Os pulsos tiveram uma duração fixa de 1000 microssegundos. O tempo de residência na câmara de tratamento do meio foi de  $5,4 \pm 0,5$  milissegundos e nas câmaras de tratamento exteriores  $9,5 \pm 0,9$  milissegundos, o total de número de pulsos entregues durante o tratamento foi  $5,1 \pm 0,01$  a uma taxa de repetição de  $207 \pm 18$  Hz.

[00120] Suco foi arrefecido diretamente depois de deixar as câmaras de tratamento dentro de 3 segundos, então o tempo que prende foi minimizado, para reduzir a carga térmica no produto. Depois de arrefecer, o suco foi empacotado e assepticamente e armazenado.

[00121] Amostras microbianas de suco não tratado e tratado com CEP foram analisadas em duplicado em três laboratórios diferentes, possuindo um total de 6 amostras não tratadas e CEP a serem analisadas. Contagem total em placa de mesófilos, coliformes totais, o número de bolores e leveduras foram analisados de acordo com o método descrito por Dowes e ITO (2001). Bactéria ácido termofílica formadora de esporo (ATSB) foi analisada de acordo com o método de Eguchi *et al.*, (1999), *Salmonella* foi analisada de acordo com o método de AOAC (2000), *Listeria monocytogenes* foi analisada de acordo com o método ISO 11290-1 (1996) e as *bactéria de ácido láctico* foi analisada de acordo com o método de Silva *et al.*, (2007).

[00122] Resultados da inativação microbiana em suco de laranja não tratado e tratado com CEP são mostrados na Figura 4A e B. A carga microbiana inicial no suco de laranja não tratado é relativamente elevada, uma vez que cerca de  $1,0E+5$  ufc / mL de suco de laranja não tratado estavam presentes (Figura 4A). Após o tratamento do CEP do suco de laranja, nenhum microrganismo foi detectado nas placas (Contagem total em placa), e além disso, também nem moldes, nem leveduras, nem os coliformes foram detectados nas placas (todas as placas mostram  $<1$  ufc/mL; ver Figura 4A). Na Figura 4B, a partir dos dados qualitativos vê-se que, também todas as *bactérias de ácido láctico* e bactéria ácido termofílicas formadoras de esporo (ATSB) que estavam presentes no suco de laranja não tratado, foram inativados durante o Tratamento por CEP do referido suco de laranja.

#### **Exemplo 4: Impacto das condições de CEP da invenção para aspectos de**



### qualidade e tempo de armazenamento microbiana

[00123] Amostras de suco de laranja tratadas por CEP produzidas e descritas no Exemplo 3, foram analisadas todas as semanas, durante um estudo de tempo de prateleira com duração de 3 meses. Durante este período, foram analisados aspectos de qualidade e contagens microbianas. Análise microbiana foi semelhante aos métodos descritos no Exemplo 3. Para a análise de qualidade, de acordo com métodos comumente conhecidos na técnica, a quantidade de sólidos solúveis (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011-1), acidez (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011- 2), pH (FoodTech Citrus Sistemas JBT, 2011-3), o teor de óleo (FoodTech Citrus Sistemas JBT, 2011-4), o teor de vitamina C (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011-5) e a atividade pectinesterase (Rouse e Atkins, 1955 ) foi medido nos tempos indicados (Tabela 2). As amostras foram armazenadas tanto a 7°C, bem como à temperatura ambiente (temperatura ambiente a 20-25°C) para facilitar um estudo de tempo de prateleira acelerado.

[00124] Avaliação microbiana das amostras foi realizada, e os resultados estão apresentados na Tabela 2. As contagens microbianas das amostras tratadas com CEP mostraram-se abaixo do limite de detecção de 1 ufc / mL, durante todo o estudo com duração de tempo de prateleira durante 104 dias, ambos quando o suco de laranja foi armazenado a 7°C e quando o suco de laranja foi armazenado à temperatura ambiente.

Tabela 4. Resultados de análise microbiana de suco de laranja tratado com CEP durante a tempo de prateleira, quer armazenado a 7°C ou à temperatura ambiente.

	Armazenamento a 7°C					Armazenamento a temperatura ambiente				
Dia	Contagem de placa total	Levedura	Mofo	<i>Lactoba cillus</i>	ATSB	Contagem de placa total	Levedura	Mofo	<i>Lactoba cillus</i>	ATSB
Ufc/mL										

1	<1	<1	<1	<10	ausente	<1	<1	<1	<10	ausente
6	<1	<1	<1	<10	NA.	<1	<1	<1	<10	NA.
13	NA.	NA.	NA.	NA.	ausente	NA.	NA.	NA.	NA.	ausente
20	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
27	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
34	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
41	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
48	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
55	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
62	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
69	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
76	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
83	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
90	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
97	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.
104	<1	<1	<1	NA.	NA.	<1	<1	<1	NA.	NA.

N/A. Não analisado

[00125] A avaliação sensorial foi realizada por um painel treinado. As amostras foram avaliadas quanto à aparência geral, cor, cheiro e sabor. As amostras foram classificadas como "bom", quando as propriedades eram semelhantes ao suco de laranja espremido recentemente, e as amostras foram classificadas como "não é bom" quando não era mais a qualidade superior de suco espremido recentemente.

[00126] Resultados da avaliação sensorial durante o tempo de prateleira são mostradas na Figura 5. Amostras armazenadas a 7°C demonstraram ser semelhantes ao suco de laranja espremido recentemente até 64 dias de tempo de armazenamento. Após este tempo de armazenamento, o cheiro fresco e sabor são reduzidos, embora aparência e cor do suco tenham sido consideradas como "bom" até 90 dias de armazenamento a 7°C (Figura 5A). os sucos tratados

com CEP armazenados à temperatura ambiente foram apenas aceitáveis até 27 dias de armazenamento (Figura 5B). Após este tempo, não poderia ser considerado mais como o suco fresco.

[00127] Os aspectos de qualidade do suco de laranja foram monitorados também. Para estes aspectos, o suco não tratado foi avaliado antes do tratamento com CEP, bem como, para avaliar o impacto do processo sobre estes aspectos.

[00128] A quantidade de sólidos solúveis totais (°Brix) (Figura 6; curvas de experimentos realizados a 7°C e à temperatura ambiente coincidem para o dia 6 em diante no gráfico), acidez (Figura 7), pH (Figura 8), teor de óleo (Figura 9) e teor de vitamina C (Figura 10) não se alterou pelo tratamento por CEP e durante o armazenamento a 7°C e armazenagem à temperatura ambiente.

[00129] As diferenças são encontradas na atividade de pectinametilesterase (PME) antes e após o tratamento CEP (Figura 11). Devido à temperatura gerada durante o processo CEP, parte da enzima PME é inativada, o que leva a uma redução da atividade da enzima. Isto quer dizer, o calor gerado durante o processo de acordo com a invenção aumentou a temperatura do suco até 70°C. O suco submetido ao processo de CEP da invenção foi pré-aquecido a 59°C antes da sua introdução no aparelho de CEP sob fluxo contínuo. A inativação desta enzima é um dos objetivos da pasteurização, como a atividade remanescente da enzima pode conduzir à perda de nuvem e gelificação de suco de citrinos durante a armazenagem. A atividade destas enzimas é expressada como a liberação de ácido por mL (multiplicado por 1.0E+4) durante a hidrólise de pectina como uma função do tempo a pH 7,8 e 20°C. Geralmente, a maioria dos pasteurizadores de sucos fornece suco tendo atividade de pectinesterase expressada em unidades de pectinesterase (PEU) com valores entre 1,0E-6 até 1,0E-4.

## REFERÊNCIAS

[00130] AOAC (2000). Método Oficial AOAC 989.13-1998. Motile *Salmonella* in all foods. AOAC International, Método Oficial de Análise de AOAC Internacional.

[00131] Álvarez, G, Condón, S., Raso, J., (2006). Microbial inactivation by pulsed electric fields. Em: Raso, J., Heinz, V. (Eds). Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry, Fundamentals and Applications. Springer, New York.

[00132] Bergey, 1986. Manual of Systematic Bacteriology. Williams e Wilkins, Baltimore.

[00133] Campos, FP, Cristianini, M. (2007) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure pasteurisation. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8, 226-229.

[00134] Doyle, ME, Mazotta, AS (2000) Review studies on the thermal resistance of *Salmonella* (Estudos de revisão sobre a resistência térmica de *Salmonella*). Journal of Food Protection, 63, 779-795.

[00135] Dowes, FP, Ito, K., (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª edição. American Public Health Association, Washington, D C.

[00136] Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, M.E., Azuma, E., Variane, S.F. (1999). Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Relatório do projeto de pesquisa ABE Citrus, Campinas (SP), Brasil.

[00137] El Zakhem, H., Lanoiselle, JL, Lebovka, NI, Nonus, M., Vorobiev, E. (2006) Behavior of yeast cells in aqueous suspension affected by pulsed electric field. Journal of Colloid and Interface Science, 300, 553-563.

[00138] El Zakhem, H., Lanoiselle, JL, Lebovka, NI, Nonus, M., Vorobiev, E.

(2007) Influence of temperature and surfactant on *Escherichia coli* inactivation in aqueous suspensions treated by moderate pulsed electric fields. *Jornal Internacional de Microbiologia de Alimentos*, 120, 259-265.

[00139] Eynard, N., Rodriguez, F., Trotard, J., Teissie, J. (1998) Eletrooptics studies of *Escherichia coli* eletropulsation: orientation, permeabilization and gene transfer. *Biophysical Journal*, 75, 2587-2596.

[00140] Gurtler, JB, Bailey, RB, Geveke, DJ, Zhang, H P. (2011) Pulsed electric field inactivation of *E. coli* 0157:H7 and non-pathogenic surrogate *E. coli* in strawberry juice as influenced by sodium benzoate, potassium sorbate, and citric acid. *Food Control*, 22, 1689-1694.

[00141] Heinz, V., Alvarez, G, Angersbach, R., Knorr, D. (2002). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 103-111.

[00142] ISO 11290-1 (1996). Microbiologia de alimentos e rações para animais. Método horizontal para a detecção e contagem de *Listeria monocytogenes* - Parte 1: método de detecção.

[00143] JBT Food Tech Citrus Systems (2011-1). Total soluble solids by refractometer. Em: Procedures for analysis of citrus products. 6ª Edição, Lakeland.

[00144] JBT Food Tech Citrus Systems (2011-2). Total titratable acidity (industry method) m: Procedures for analysis of citrus products. 6ª Edição, Lakeland.

[00145] JBT Food Tech Citrus Systems (2011-3). pH. Em: Procedures for analysis of citrus products. 6ª Edição, Lakeland.

[00146] JBT Food Tech Citrus Systems (2011-4). Recoverable oil (Scott method). Em: Procedures for analysis of citrus products. 6ª Edição, Lakeland.

[00147] JBT Food Tech Citrus Systems (2011-5). Ascorbic acid by Iodine

titration. Em: Procedures for analysis of citrus products. 6ª Edição, Lakeland.

[00148] Loeffler, MJ (2006) Generation and application of high intensity pulsed electric fields. Em: Heinz, V., Raso, J. (Eds.) Pulsed electric field technology for the food industry- fundamentals and applications. Springer, New York.

[00149] Mastwijk, HC (2006) Pulsed Power systems for application of pulsed electric fields in the food industry. Em: Heinz, V., Raso, J. (Eds.) Pulsed electric field technology for the food industry- fundamentals and applications. Springer, New York.

[00150] Mastwijk, HC, Gulfo-van Beusekom, K., Pol-Hofstad, IE, Schuten, H., Boonman, H, Battels, VP (2007). Definitions and guidelines for reporting on pulsed electric field experiments. Em: Lelieveld, H.L.M., Notermans, S., de Haan, S.W.H. (Eds.). Food preservation by pulsed electric fields. From research to application. Publicação Woodhead.

[00151] Raso, J., Condon, S., Alvarez, G, (2014). Non-thermal processing. Pulsed Electric Field. Em: Batt, CA (Ed). Encyclopedia of Food Microbiology (segunda edição). Elsevier.

[00152] Put, HMC, De Jong, J., Sand, FEMJ, Van Grinsven, AM (1976) Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks. Journal of Applied Bacteriology, 40, 135-152.

[00153] Rouse, AH, e Atkins, CD. (1955) Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experiment station. Florida Agricultural Experiment Stations, 570, 3-19.

[00154] Saulis, G., Wouters, PC (2007). Probable mechanisms of microorganism inactivation by pulsed electric fields. Em: Lelieveld, HLM, Notermans, S., de Haan, SWH (Eds.). Food preservation by pulsed electric fields. From research to application. Publicação Woodhead.

[00155] Sharma, P., Bremer, P., Oey, I, Everett, D.W. (2014) Bacterial

inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. *International Dairy Journal*, 35, 49-56.

[00156] Silva, N., Junqueira, VCA, Silveira, NFA, Taniwaki, MH, Santos, RFS, Gomes, RAR, Okazaki, MM, (2007). *Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos*, terceira edição, São Paulo.

[00157] Timmermans, RAH, Nierop Groot, MN, Nederhoff, AL, van Boekel, majs, Matser, AM Mastwijk, HC (2014). Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*.

[00158] Tsong, TY (1992) Time sequence of molecular events in electroporation. Em: Chang, DC, Chassy, BM, Saunders, JA, Sowers, AE (Eds). *Guia para eletroporação e eletrofusão*. Academic Press

[00159] Van der Veen, S., Wagendorp, A., Abee, T., Wells-Bennink, MH (2009). Diversity assessment of heat resistance of *Listeria monocytogenes* strains in a continuous-flow heating system. *Journal of Food Protection*, 5, 999-1004.

[00160] Wouters, PC, Dutreux, N., Smelt, JPPM, Lelieveld, HLM (1999). Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5364-5371.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada, por meio de aquecimento resistivo, para obter produto líquido aquecido, **caracterizado** pelo fato de compreender:

(a) proporcionar um produto líquido;

(b) proporcionar um aparelho para aquecimento rápido e homogêneo de um produto líquido a uma temperatura predeterminada por meio de aquecimento resistivo;

(c) fornecer continuamente o produto líquido na entrada do aparelho e fluir o produto líquido através do aparelho;

(d) gerar continuamente uma corrente elétrica através do produto líquido em fluxo no aparelho, em que o número de pulsos aplicado sobre cada elemento do fluido durante a passagem é de 1 a 100, com uma duração de pulso de 10 a 2.000 microssegundos e em que a intensidade do campo elétrico é de 0,1 a 3 kV/cm; e

em que a temperatura máxima do produto líquido autonomamente permanece entre 40°C e 85°C durante o aquecimento resistivo.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o pH do produto líquido está entre pH 1,5 e 9,0, preferencialmente acima de 4,6, preferencialmente entre 4,8 e 9,0, mais preferencialmente entre 5,5 e 8,0, mais preferencialmente entre 6,0 e 7,5.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o produto líquido tem uma condutividade elétrica entre 0,01 e 10 S/m, medida a 20°C, preferencialmente entre 0,1 e 3 S/m, medida a 20°C, mais preferencialmente entre 0,2 S/m e 0,8 S/m, medida a 20°C.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o produto líquido é um produto alimentar líquido



ou um produto de alimentação líquido.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o produto líquido é um ingrediente, produto semiacabado ou um produto líquido final, como suco de fruta, suco ou batida de vegetais, uma geleia, uma pasta, uma bebida alcoólica ou não alcoólica, produtos lácteos, produtos de leite vegetal, ovo líquido, uma sopa ou um molho.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o produto lácteo é selecionado a partir de leite, um produto de leite ou uma composição líquida compreendendo um componente de leite ou uma fração de leite.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a temperatura do produto líquido permanece autonomamente abaixo de 75°C durante o aquecimento resistivo, preferencialmente abaixo de 60°C.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a intensidade do campo elétrico é de 0,9 a 2,7 kV/cm.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a duração do pulso é de 50 a 500 microssegundos, preferencialmente de 50 a 100 microssegundos.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que pulsos bipolares são aplicados.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o processo é um processo para a inativação de microrganismos no produto líquido.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que o produto líquido aquecido é arrefecido

imediatamente após fluir através do aparelho.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que o produto líquido é pré-aquecido antes de ser fornecido ao aparelho a uma temperatura no intervalo de 20°C a 70°C, preferencialmente de 35°C a 65°C, mais preferencialmente de 40°C a 60°C.

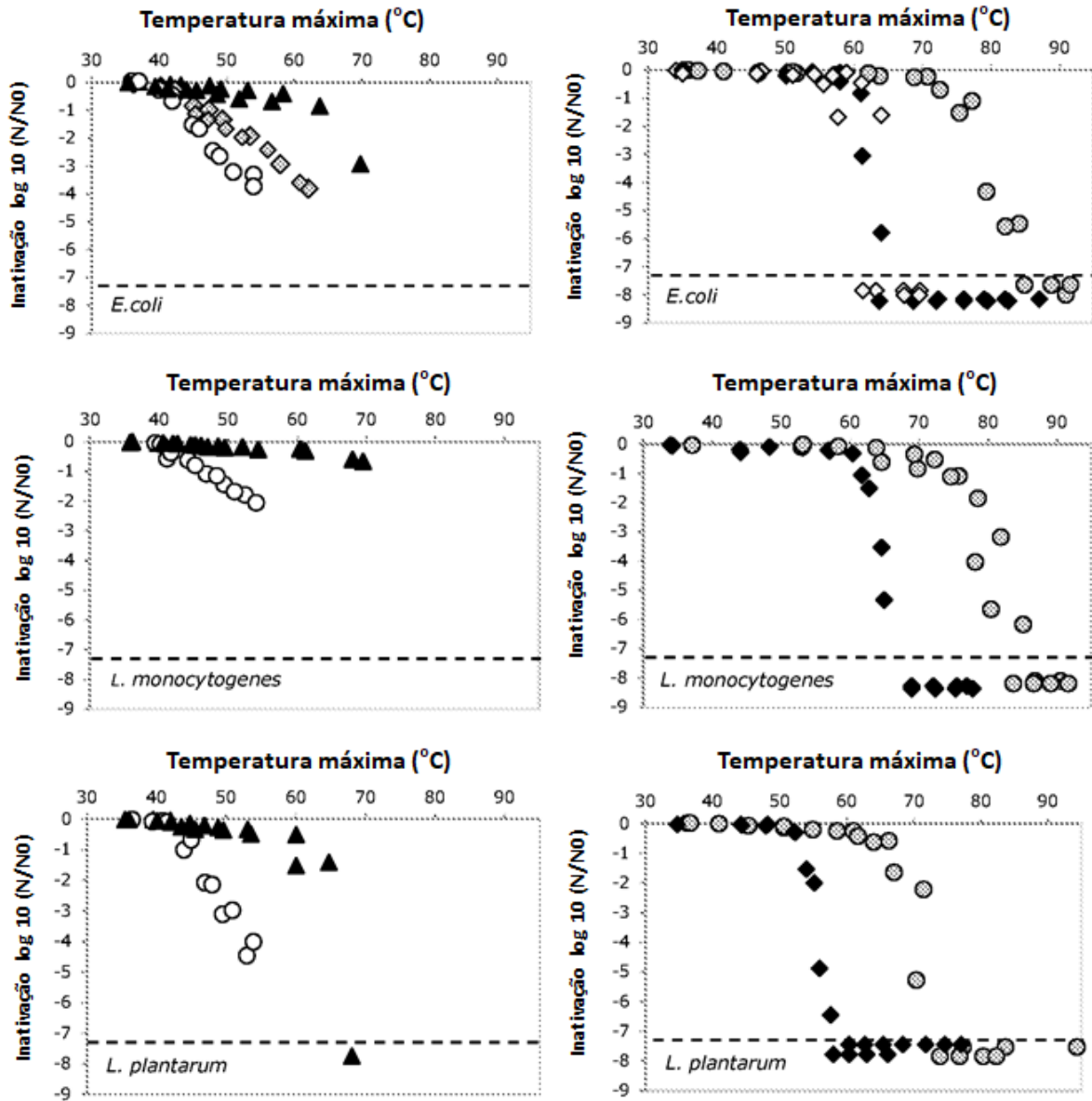


Figura 1A

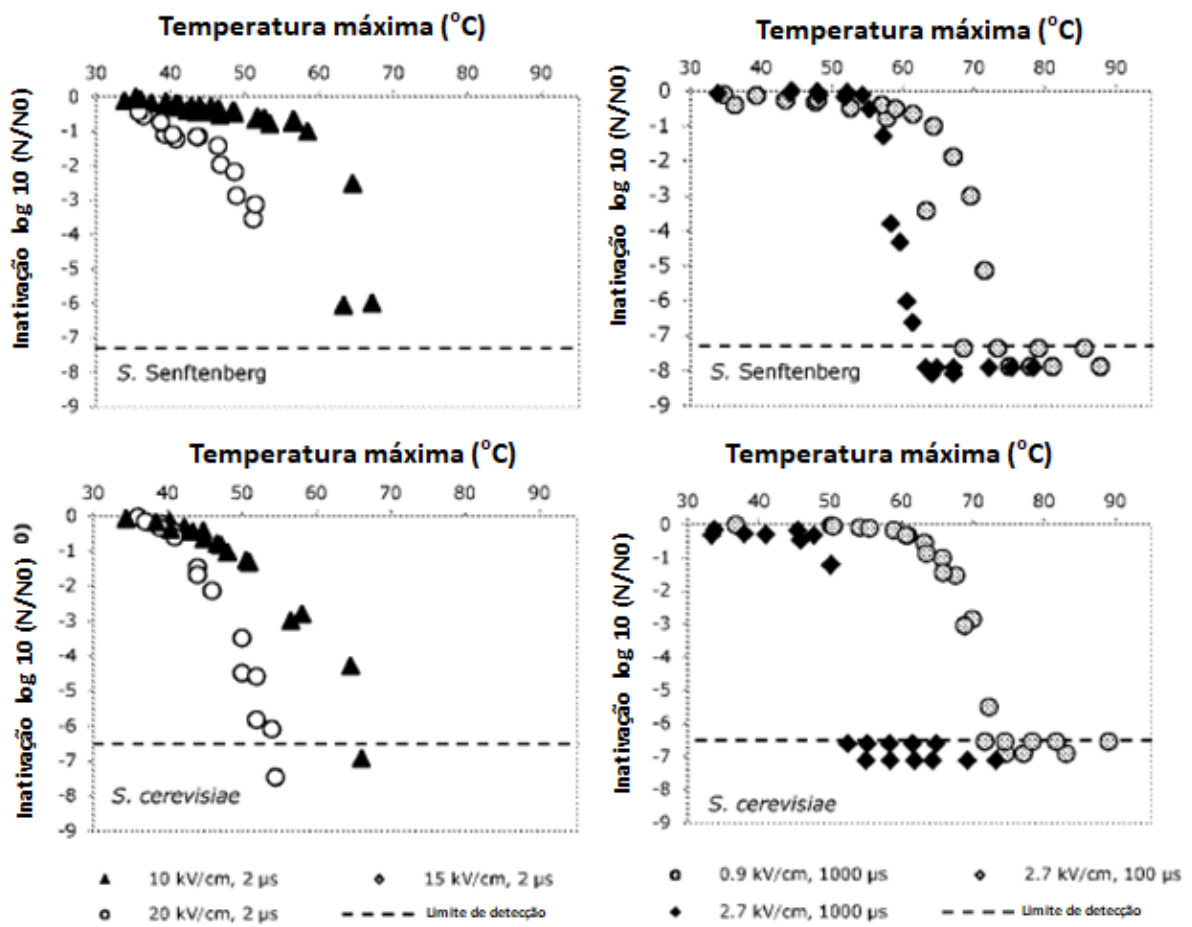


Figura 1B

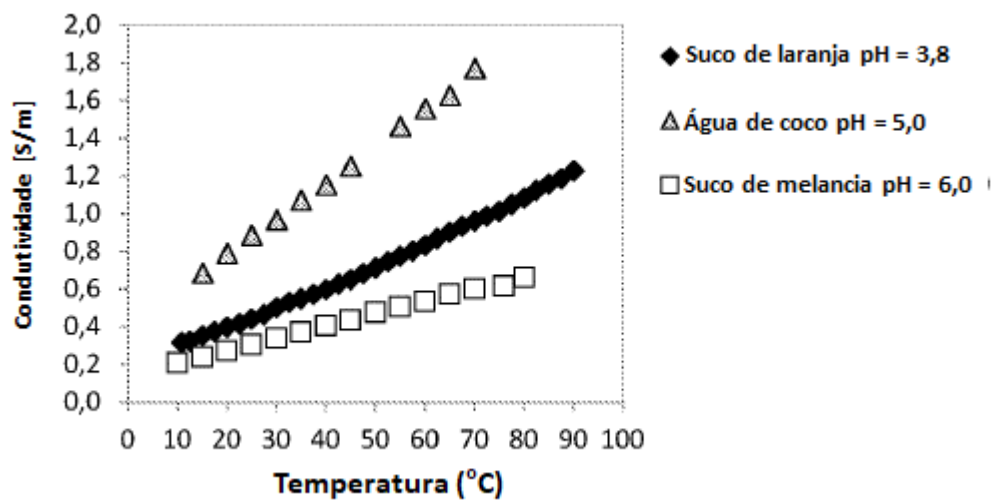


Figura 2

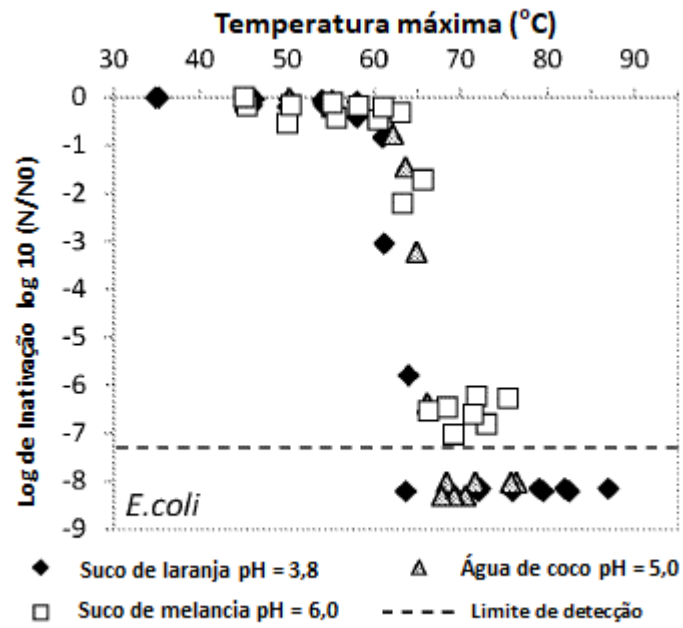


Figura 3A

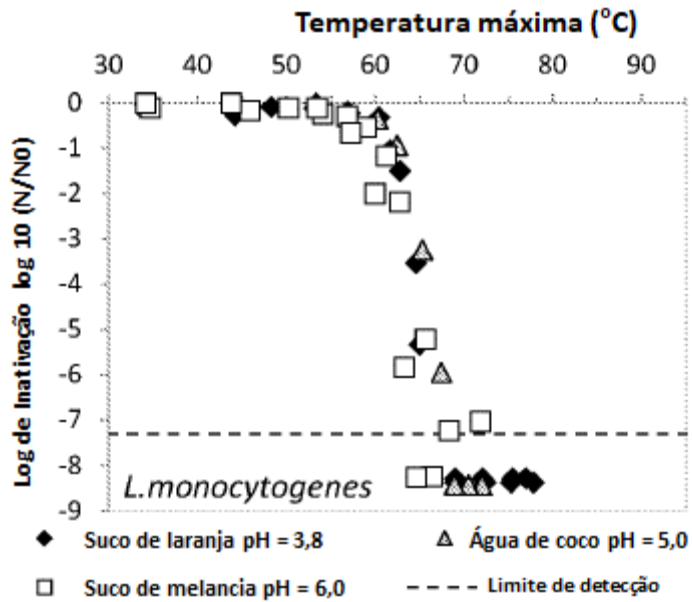


Figura 3B

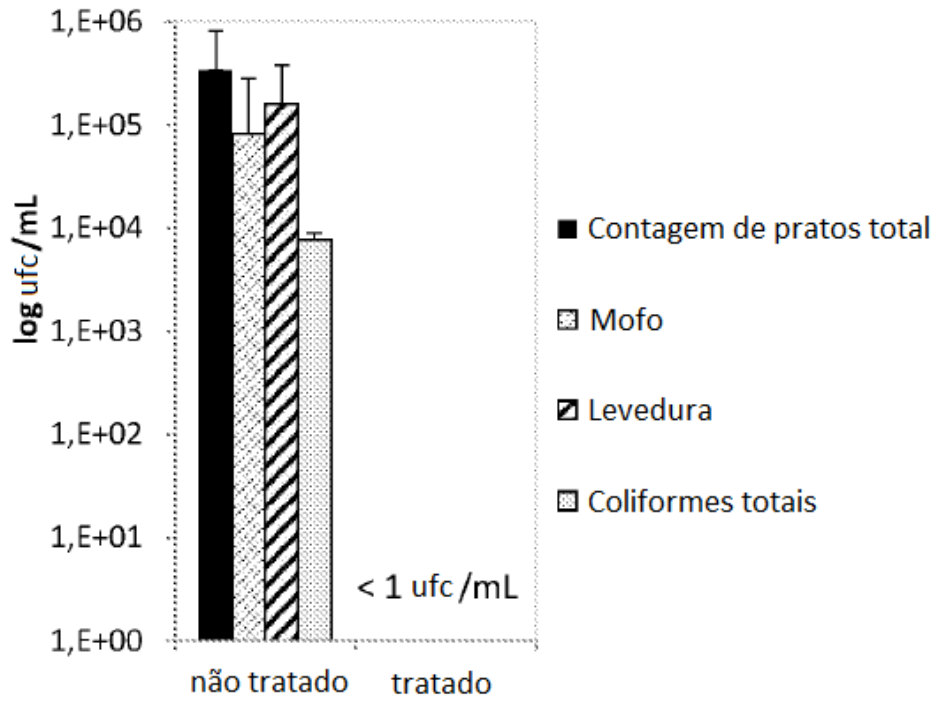


Figura 4A

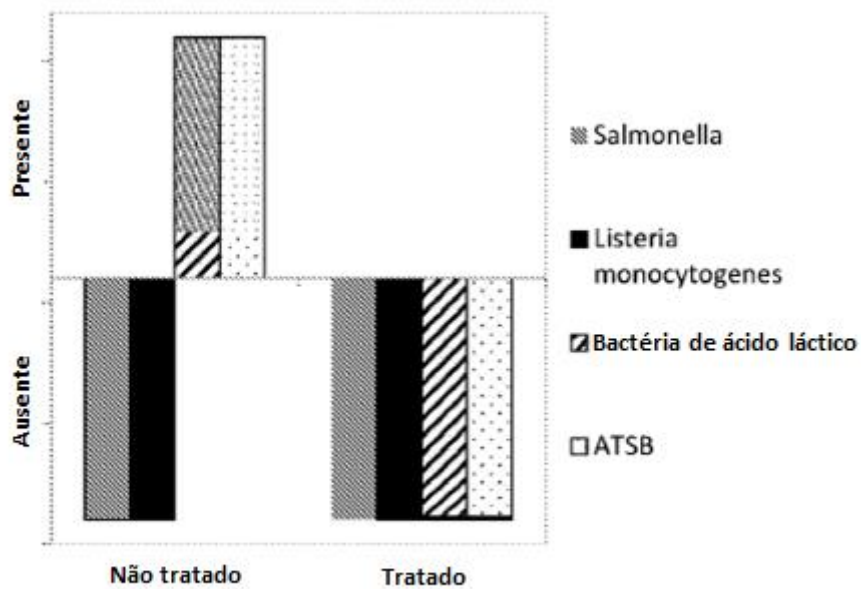


Figura 4B

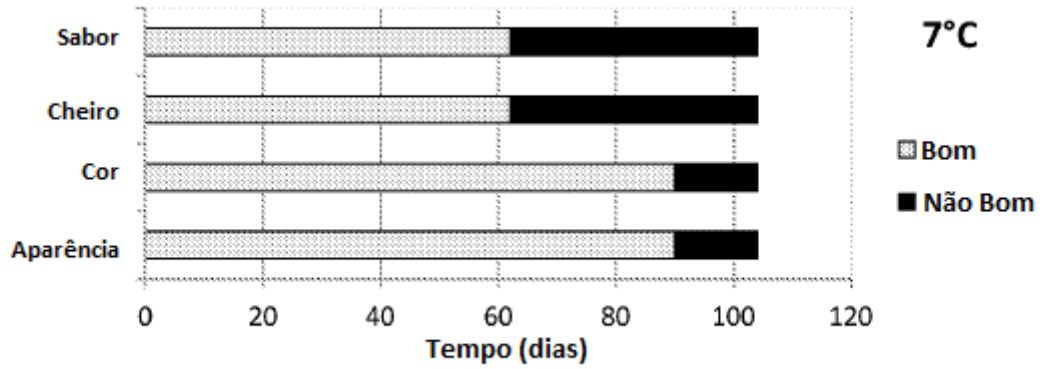


Figura 5A

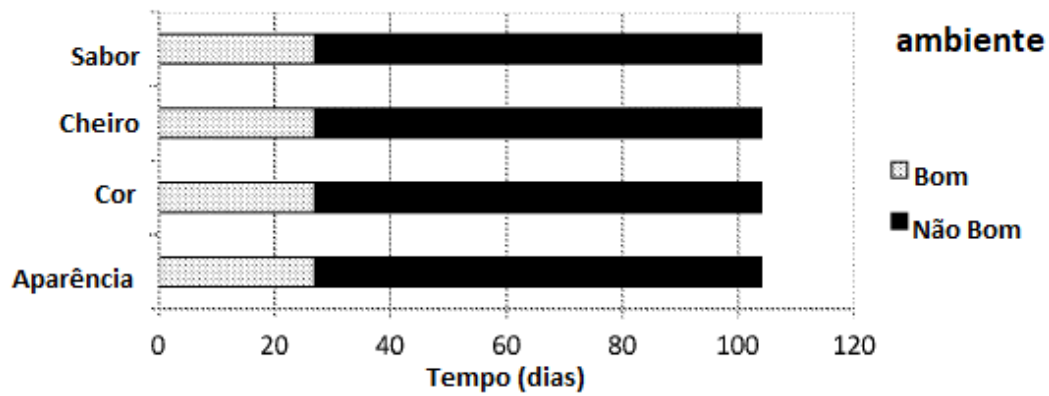


Figura 5B



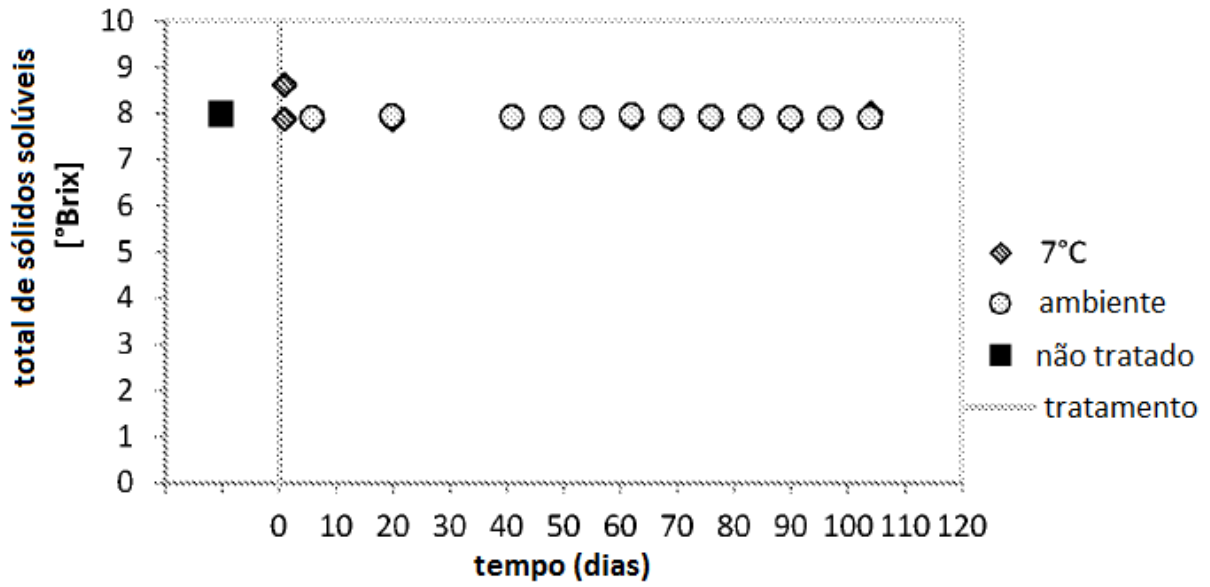


Figura 6

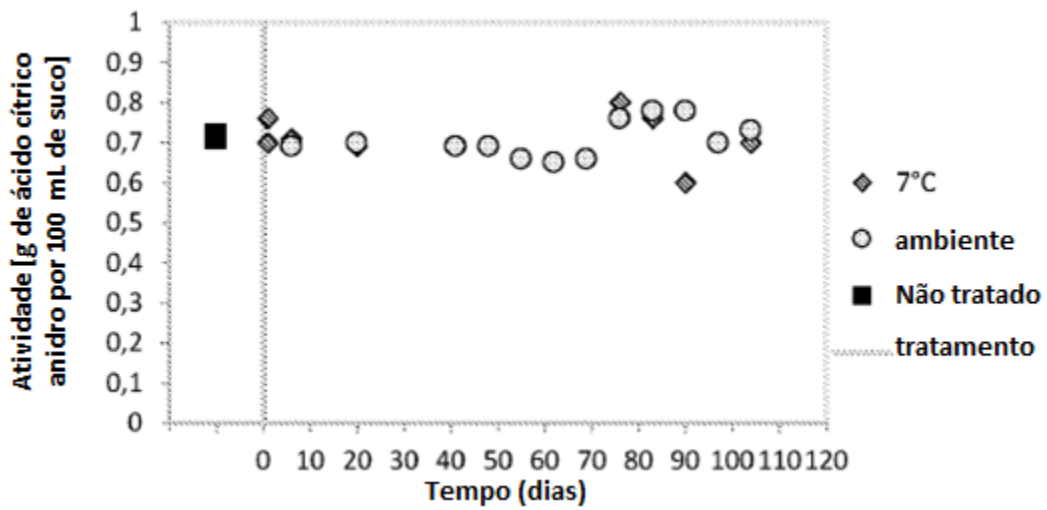


Figura 7

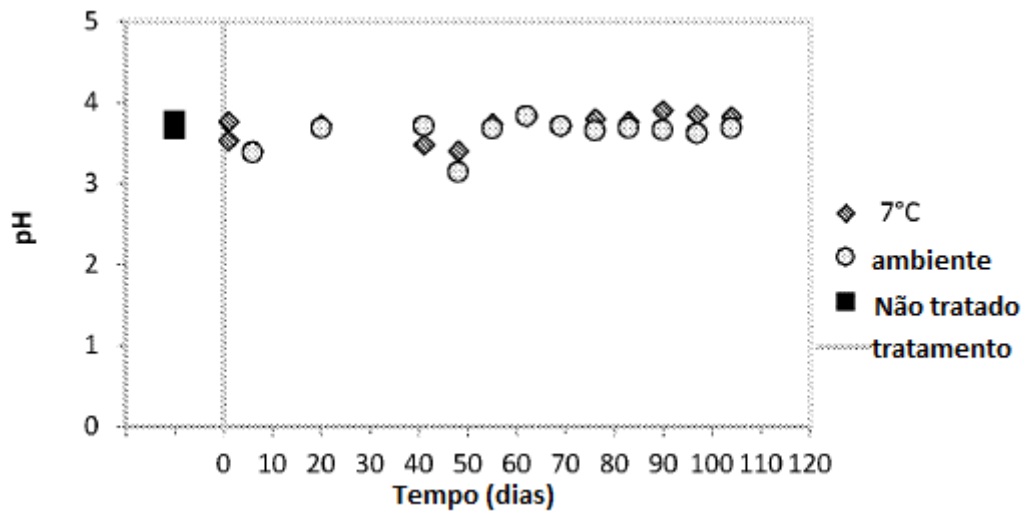


Figura 8

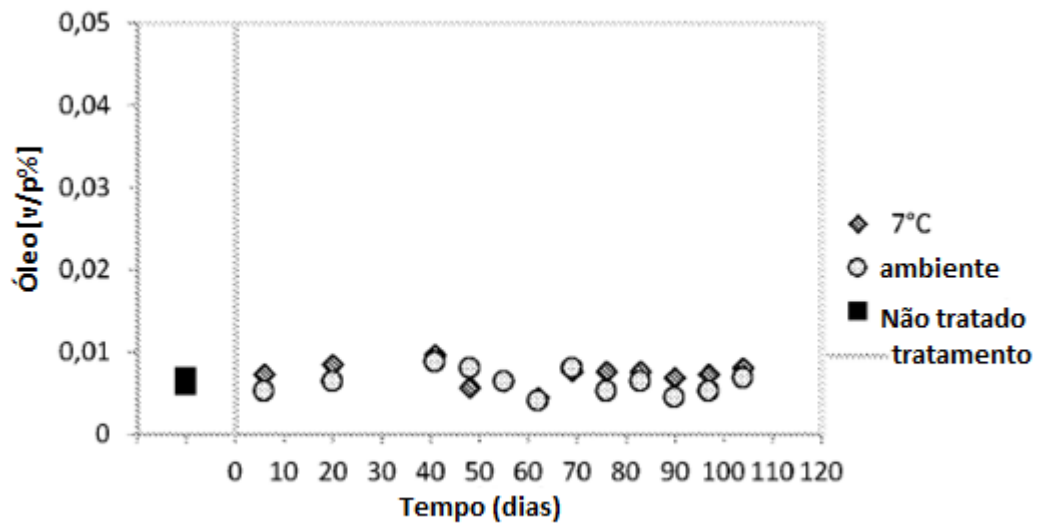


Figura 9

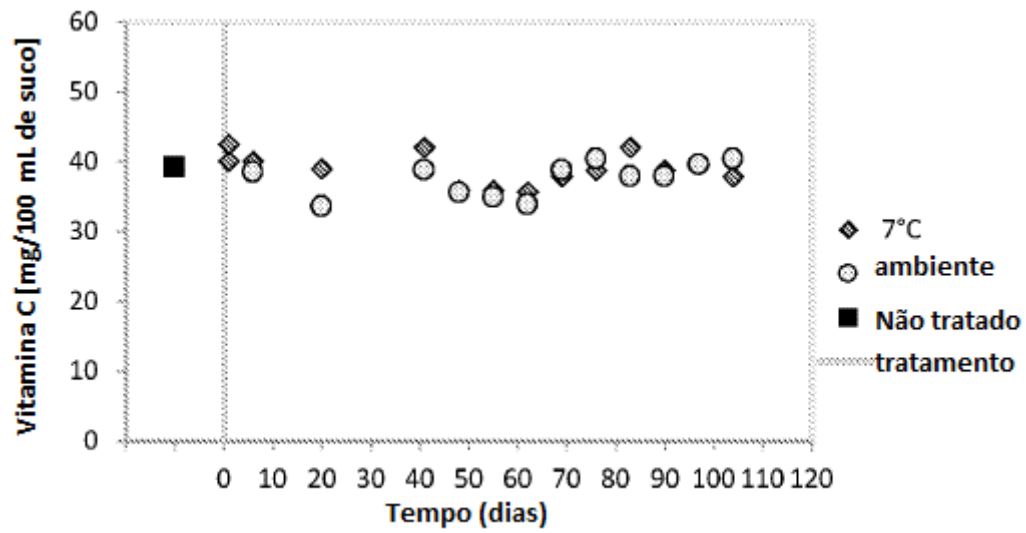


Figura 10

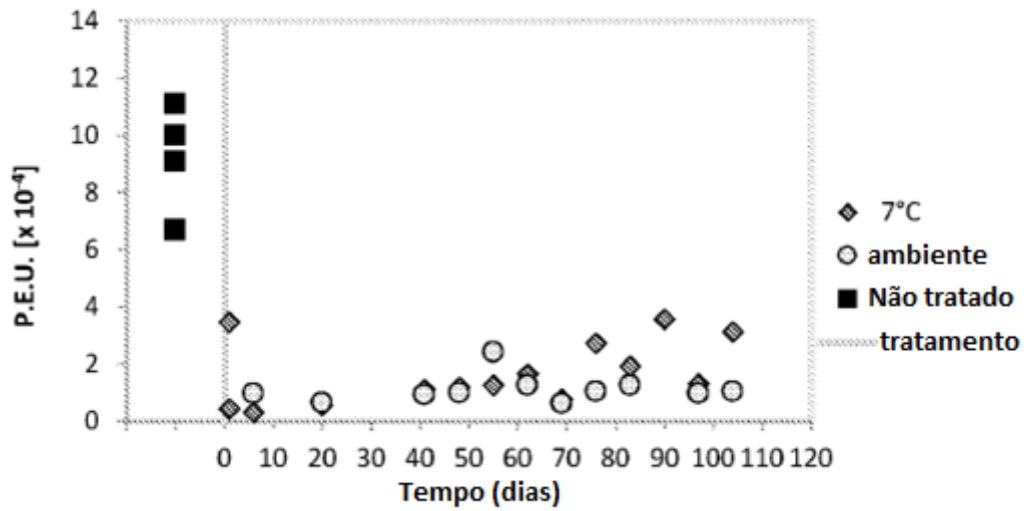


Figura 11