UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Construção de sistema de aquecimento ôhmico e verificação comparativa do comportamento da proteína verde fluorescente e da bacteriocina nisina quando sob aquecimento convencional e ôhmico

Marcos Camargo Knirsch

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo
2010

Marcos Camargo Knirsch

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação
Comparativa do Comportamento da Proteína Verde
Fluorescente e da Bacteriocina Nisina Quando Sob
Aquecimento Convencional e Ôhmico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
orientador/presidente

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, _____ de ____.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Thereza Christina Vessoni Penna, pela confiança, dedicação, auxílio e orientação durante todo o decorrer do trabalho.

Aos professores Adalberto Pessoa Jr e Bronislaw Polakwicz por todo o auxílio e incentivo.

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico pelo incentivo e colaboração.

À amiga Carolina Alves dos Santos por todo companheirismo, paciência, dedicação e incentivos constantes.

A amiga Ângela Faustino Jozala por todo auxílio e amizade.

Aos funcionários do departamento, por toda ajuda.

Aos amigos e companheiros de laboratório, da pós-graduação e iniciação científica pela amizade e companheirismo.

A todos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

As agências de fomento Capes, Fapesp e CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
TECNOLOGIA DE PROCESSAMENTO ÔHMICO	7
PRINCIPIO DE FUNCIONAMENTO	10
O AQUECIMENTO ÔHMICO FRENTE A OUTRAS TECNOLOGIAS	12
DE AQUECIMENTO POR RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA	
AQUECIMENTO POR INFRAVERMELHO	13
AQUECIMENTO POR MICROONDAS	13
AQUECIMENTO DIELÉTRICO	14
COMPARAÇÕES	15
PRINCÍPIOS FÍSICOS DA TÉCNICA	16
CAMPO ELÉTRICO	16
GERAÇÃO DE CALOR	17
APLICAÇÕES ATUAIS DO AQUECIMENTO ÔHMICO	20
PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE	22
BACTERIOCINA NISINA	24
CAPITULO I	
CONSTRUÇÃO DO AQUECEDOR ÔHMICO	25
1.0 INTRODUÇÃO	25
1.1 EQUIPAMENTO PARA REALIZAÇÃO DE AQUECIMENTO	27
ÔHMICO	
1.2 PONTOS CRÍTICOS OBSERVADOS NO EQUIPAMENTO	29
1.2.1 SISTEMA DE MEDIÇÃO DE TEMPERATURA	29
1.2.2 RELAÇÃO “ESPAÇOS-MORTOS”, DISTRIBUIÇÃO DO	33
CAMPO ELÉTRICO E VOLUME DE AMOSTRA	
1.2.3 ESTUDO DE PROCESSOS EM FLUXO	36
1.3 PROJETO DE NOVO EQUIPAMENTO	37

CAPITULO II	
AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE A METODOLOGIA	42
CONVENCIONAL E ÔHMICA DA PERDA DE FLUORESCENCIA DA	
GFP E DA PERDA DE ATIVIDADE DO PEPTÍDEO NISINA QUANDO	
SOB AQUECIMENTO CONVENCIONAL E OHMICO	
2.0 INTRODUÇÃO	42
2.1 OBJETIVOS	45
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.2.1 PRODUÇÃO DA GFP	45
2.2.2 PURIFICAÇÃO DA GFP	47
2.2.3 PREPARO DA AMOSTRA DE NISINA	47
2.2.3 DESCRIÇÃO DO SISTEMA UTILIZADO	48
2.2.4 TRATAMENTO TÉRMICO E COLETA DE DADOS	49
2.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GFP E DA	50
ATIVIDADE DE NISINA	
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
2.4 CONCLUSÃO	59
BIBLIOGRAFIA	59
ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do sistema de aquecimento ôhmico (adaptado de CASTRO <i>et al.</i> , 2004). V e A representam o voltímetro e amperímetro respectivamente.	28
Figura 2. Projeto do recipiente de vidro do sistema de aquecimento ôhmico juntamente com desenho esquemático do suporte para o eletrodo e eletrodo.	29
Figura 3. Desenho esquemático de um campo elétrico uniforme. O vetor campo elétrico E apresenta-se com mesma intensidade, direção e sentido em todos os pontos do campo elétrico.	35
Figura 4. Apresentação do painel do sistema de aquecimento ôhmico. a) foto do painel do sistema de aquecimento ôhmico com indicações de seus componentes (transdutores, relés, entradas de sinais, fonte de alimentação, aterramento e plataforma para controle de sinais digitais). b) foto dos transdutores utilizados no sistema ôhmico. O transdutor de voltagem apresenta entrada com capacidade de 0 a 600V e saída de 4 a 20mA. O transdutor de corrente apresenta entrada com capacidade de 0 a 10A e saída de 4 a 20mA. c) foto da plataforma de controle de sinal com módulos para aquisição de sinais da régua digital, transdutores de corrente e voltagem e, termômetro (termopar tipo J revestido)	38
Figura 5. Desenho esquemático do projeto de sistema de aquecimento ôhmico elaborado a partir da análise dos pontos críticos encontrados.	41
Figura 6. Desenho esquemático do sistema utilizado para aquecimento ôhmico e convencional (adaptado de CASTRO <i>et al.</i> , 2004). V e A representam o voltímetro e amperímetro respectivamente.	47
Figura 7. Diagrama esquemático das formas ressonantes do cromóforo da GFP com apresentação dos aminoácidos básicos His ¹⁴⁸ , Gln ⁹⁴ e Arg ⁹⁶ e aminoácido ácido Glu ²²² que participam de sua estabilização (extraído de PHILLIPS, 1998).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos para a inativação da fluorescência da GFP quando mantida aquecida por metodologia convencional a 60° e 70°C. Os valores apresentados representam a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência ao decorrer do tempo de experimento.	51
Tabela 2. Dados obtidos para a inativação da fluorescência da GFP quando mantida aquecida por metodologia ôhmica a 60° e 70°C. Os valores apresentados representam a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência ao decorrer do tempo de experimento.	52
Tabela 3. Dados obtidos para a inativação da fluorescência da GFP quando mantida aquecida por metodologia convencional e ôhmica a 80°C. Os valores apresentados representam a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência ao decorrer do tempo de experimento.	52
Tabela 4. Dados obtidos para a atividade da bacteriocina nisina quando mantida aquecida por metodologia convencional e ôhmica a 70° e 80°C. Os valores apresentados, e seus respectivos desvios padrões, representam a média dos valores observados após a aplicação da metodologia de difusão em ágar.	57

RESUMO

KNIRSCH, M. C. **Construção de sistema de aquecimento ôhmico e verificação comparativa do comportamento da proteína verde fluorescente e da bacteriocina nisina quando sob aquecimento convencional e ôhmico.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os processos de tratamento térmico por meio do aquecimento ôhmico revelam-se bastante promissores. A tecnologia de processamento de alimentos através do aquecimento ôhmico tem mostrado a obtenção de um produto final com características sensoriais e nutricionais superiores, quando comparada aos métodos convencionais (trocadores de calor ou banho de água). A principal vantagem atribuída ao aquecimento ôhmico é a habilidade de aquecer materiais rapidamente e de modo uniforme possibilitando desta forma a redução do abuso térmico aos produtos. A construção de um equipamento de aquecimento ôhmico foi realizada e seu funcionamento avaliado. Alguns pontos críticos para o funcionamento do equipamento foram encontrados e avaliados. Dentre os principais pontos críticos avaliados estão: o sistema de medição de temperatura e a distribuição dos campos elétricos. A avaliação destes pontos críticos possibilitou a realização de novo projeto de equipamento com o objetivo de otimizar a aplicação do aquecimento ôhmico. Realizou-se estudo comparativo da velocidade de inativação da fluorescência da proteína verde fluorescente (GFPuv) e da inativação da atividade da bacteriosina nisina, quando submetidas a aquecimento convencional (banho d'água) e ôhmico, com o objetivo de avaliar a influência da presença de campos elétricos. Leituras em $\lambda_{\text{ex}} = 394 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$ para excitação e emissão respectivamente para a GFPuv e avaliação por halo de inibição para a atividade da nisina foram realizadas periodicamente após tratamento térmico por metodologia convencional e ôhmica a temperaturas de 60°, 70° e 80°C para GFPuv e de 70° e 80°C para a nisina. Os resultados indicam que para ambos, GFP e nisina, a presença de campos elétricos não influencia de modo significativo o comportamento quando comparada a tecnologia de aquecimento ôhmico e convencional.

Palavras-chave: Aquecimento ôhmico. GFP. Nisina.

ABSTRACT

KNIRSCH, M. C. **Construction of an ohmic heating equipment and comparative analysis of green fluorescent protein fluorescence decay and nisin activity loss under conventional and ohmic heating**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Ohmic heating is an emerging technology that possesses many actual and future applications. One of the most promising applications for this technology is food processing. Ohmic heating has demonstrated to achieve better sensorial and nutritional values when compared to conventional heating (heat exchangers/water bath). The principal advantage of ohmic heating is the ability to heat materials rapidly and uniformly making possible to reduce thermal abuse to products. An ohmic heating equipment was constructed and evaluated. Critical functioning points were observed on the manufactured equipment and were evaluated. Among the observed critical points include the temperature measurement system and the distribution of the electric fields on the extension of the equipment's container. As a result of the evaluation of those critical points a new equipment project was created aiming to optimize the ohmic heating unit. The influence of the electric field over the fluorescence decay of the green fluorescent protein (GFPuv) and over nisin activity decay was evaluated. Fluorescence readings were performed at $\lambda_{\text{ex}} = 394 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$ for excitation and emission respectively for GFPuv and activity readings were performed by inhibition halo for nisin after several thermal treatment periods on ohmic and conventional heating. Samples were heated by conventional and ohmic heating at 60°, 70° and 80°C for GFPuv and at 70°, 80° and 90°C for nisin. The observed results indicate that the incidence of electric fields did not presented significative influence on the fluorescence decay of GFPuv or on the activity of nisin when ohmic heating was compared with conventional heating.

Keywords: Ohmic heating. GFP. Nisin.

INTRODUÇÃO

Os processos de esterilização e de pasteurização por meio da aplicação de campos elétricos (aquecimento ôhmico) revelam-se bastante promissores, principalmente na área de tecnologia de alimentos. A maioria dos alimentos apresenta diversos tipos de microrganismos em sua carga microbiana inicial. Alguns destes microrganismos atuam de forma conveniente para a indústria tecnológico-alimentícia (e.g. na produção de fermentados) e outros podem causar (I) degradação do alimento, (II) perda das características nutricionais e (III) patologias (e.g.. *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, e *Campylobacter jejuni*) (MOSQUEDA-MELGAR, 2008).

A quantidade de epidemias associadas com o consumo de produtos *in natura* (frescos), em especial sucos de frutas, leite e derivados, aumentou nos últimos anos (UNITED STATES OF AMERICA, 2001; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2008; SMITH et al., 2008). Muitos desses produtos não sofrem quaisquer etapas de inativação microbiana. Desta forma, um processamento mínimo dos produtos frescos para eliminar ou diminuir a população microbiana, sem causar perda significativa de suas características nutricionais, faz-se necessário. (MOSQUEDA-MELGAR, 2008).

Usualmente, os produtos de natureza orgânica são termosensíveis e não são passíveis de serem submetidos a processos esterilizantes, sendo, portanto, comumente pasteurizados. Na indústria de laticínios, os processos de

pasteurização destroem a maior parte, mas não todos os microrganismos presentes. Nesses casos, a população microbiana é mantida estática, em condições que impeçam seu desenvolvimento (refrigeração ou aplicação de inibidores de crescimento) (SCHMIDELL, 2001).

Os processos convencionais de pasteurização apresentam diversas considerações importantes à sua aplicação e segurança. Alimentos mais complexos, de alta viscosidade, baixa acidez e contendo materiais particulados, apresentam-se como um grande desafio. A aplicação de processos térmicos aos materiais particulados, por exemplo, é limitada pelo tempo de processamento necessário para garantir o tratamento conveniente no centro das partículas; conseqüentemente, a segurança destes produtos é obtida em detrimento de suas características nutricionais e organolépticas.

Quando os materiais a serem processados apresentam, em sua constituição, uma quantidade suficiente de água e eletrólitos, possibilitando a passagem de corrente elétrica, a tecnologia de aquecimento ôhmico pode ser empregada (IMAI, 1995).

O processo de aquecimento ôhmico foi definido por Sastry e Barach (2000), como sendo o processo de passagem de corrente elétrica através de materiais, com o objetivo de promover aquecimento. Desta forma, o aquecimento ocorre essencialmente através da geração de energia térmica no interior do material (por transformação de energia elétrica em energia térmica), sendo os fenômenos de condução e convecção pouco relevantes.

Conseqüentemente, o aquecimento ôhmico permite a geração de calor simultaneamente em ambas as fases do material (fase sólida e líquida), gerando um “processo asséptico” muito mais eficiente para o processamento de fluidos contendo partículas ou com viscosidade elevada (RICE, 1995; WANG et al., 2001).

Já existem vários estudos que indicam que o processamento de alimentos, através da tecnologia de aquecimento ôhmico, é muito promissor, com a obtenção de um produto final com características sensoriais e nutricionais superiores, quando comparada aos métodos convencionais. Estas indicações são dadas não apenas para alimentos fluidos contendo partículas e para alimentos fluidos viscosos, mas também para os fluidos de viscosidade reduzida (suco de laranja, leite de cabra ou vaca, entre outros) (VICENTE et al., 2006; CASTRO, 2003; PARROTT, 1992; KIM, 1996; TUCKER, 2004).

Os benefícios potenciais do aquecimento ôhmico, para a indústria de produtos lácteos, transcendem sua aplicação para inativação microbiana. A comparação entre aquecimento ôhmico e aquecimento convencional, no processo fermentativo com *Lactobacillus acidophilus*, foi avaliado por Cho e colaboradores. (1996). Observou-se que a aplicação de campos elétricos pode induzir a formação de poros de membrana, facilitando o transporte de nutriente, com conseqüente redução da fase lag da fermentação. Foi observada uma diferença final mínima entre os valores de pH dos meios, entretanto, o consumo de glicose e a liberação de ácido láctico não foram modificados pelo

aquecimento ôhmico. Pode-se, portanto, inferir que o aquecimento ôhmico apresenta também grande potencialidade de aplicação em processos fermentativos (e.g. produção de bacteriocina: nisina, lacidina, etc.), reduzindo o tempo total de processo (CHO et al., 1996; VICENTE e CASTRO, 2007).

Mosqueda-Melgar e colaboradores (2008) confirmaram o efeito letal de pulsos de campos elétricos sobre microrganismos potencialmente patogênicos, em produtos alimentícios, e observaram o mecanismo de inativação microbiana, por meio da teoria de eletroporação proposta por Coster e Zimmermann (1975). De acordo com esta teoria, a indução de campos elétricos ocasiona a formação de poros de membrana (fenômeno conhecido como eletroporação) e subsequente lise celular.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo objetiva a construção de equipamento, para a realização e estudo do aquecimento ôhmico, e avaliação da potencial utilização da tecnologia de aquecimento ôhmico como método de conservação de produtos alimentícios, farmacêuticos e afins. A potencialidade do método de tratamento térmico proposto foi avaliada por meio da determinação de valores de perda de atividade da proteína nisina (bacteriocina) e perda de fluorescência da proteína verde fluorescente (GFP; *Green Fluorescent Protein*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E COMPLEMENTARES

(I) Construção do aquecedor ôhmico, conforme modelo atualmente utilizado na Universidade do Minho, Portugal, sob orientação do Prof. Dr. António Vicente e Profa. Thereza Christina Vessoni Penna.

(II) Determinar, comparativamente, a sensibilidade térmica da GFP, na faixa de 60, 70 e 80°C, quando sob aquecimento ôhmico e quando sob aquecimento convencional (banho d'água) em tampão TRIS-EDTA (ph 8,0).

(III) Determinar, comparativamente, a sensibilidade térmica da proteína nisina, na faixa de 70 e 80°C, quando sob aquecimento ôhmico e quando sob aquecimento convencional (banho d'água) em tampão PBS (ph 5,0).

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do
Comportamento da GFPuv e da Nisina

(IV) Realizar a elaboração e construção de novo equipamento ôhmico, conforme as necessidades específicas do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

➤ **TECNOLOGIA DE PROCESSAMENTO ÔHMICO**

O tratamento térmico de materiais encontra-se entre os processos mais utilizados industrialmente. Na indústria de alimentos, por exemplo, o tratamento térmico (por possuir ação letal sobre microorganismos) é o principal procedimento físico, que a tecnologia de alimentos dispõe, para aumentar a vida útil dos alimentos (ORDÓÑEZ et al., 2005). Desta forma, novos métodos de aquecimento, que acarretem baixo gasto energético ou maior eficiência energética, continuam a atrair interesse (PALANIAPPAN e SASTRY, 1992). Dentre as tecnologias de aquecimento emergentes, o aquecimento ôhmico apresenta-se bastante promissor.

O aquecimento ôhmico (também conhecido como aquecimento joule, aquecimento por resistência elétrica, aquecimento direto por resistência elétrica, aquecimento elétrico ou aquecimento eletro-condutivo) é definido como o processo no qual uma corrente elétrica transpassa um determinado material com o objetivo principal de aquecê-lo (VICENTE et al., 2006). Este aquecimento ocorre através da transformação interna de energia (ou seja, transformação de energia elétrica para energia térmica) dentro do material processado (SASTRY e BARACH, 2000). Desta forma, o aquecimento ôhmico pode ser visto como uma tecnologia de geração interna de energia e não somente como um processo de transferência térmica. Conseqüentemente, o

processo não depende da transferência de calor em interface sólido-líquido, ou dentro de um sólido, em um sistema de duas fases.

O aquecimento ôhmico difere de outras metodologias de aquecimento por meio de energia elétrica (*e.g.* micro-ondas, aquecimento indutivo) devido a: (1) o contato de eletrodos com o material a ser aquecido, (2) a frequência elétrica aplicada (irrestrita, diferentemente das faixas de frequências destinadas a radio ou a micro-ondas), e (3) o formato da onda elétrica (também irrestrito, apesar de tipicamente apresentar-se em formato senoidal) (VICENTE et al. 2006).

Na indústria de alimentos, o principal segmento para a aplicação da tecnologia ôhmica é o “processamento asséptico”, que é utilizado especialmente para alimentos líquidos, os quais são processados predominantemente por meio de trocadores de calor. A maioria das tecnologias atualmente aplicadas depende de fenômenos de condução, convecção e/ou irradiação para a transferência de calor. A aplicação destas tecnologias para alimentos particulados, por exemplo, é limitada pelo tempo requerido para assegurar o tratamento adequado do centro de grandes partículas, geralmente causando o processamento excessivo do volume circundante (VICENTE et al., 2006).

O processamento ôhmico permite o aquecimento de materiais de modo extremamente rápido (em geral, variando de alguns segundos a poucos minutos) (SASTRY, 2005). Permite também, sob determinadas circunstâncias,

o aquecimento de grandes partículas e do fluido circundante sob velocidades de aquecimento similares e, desta forma, torna possível a aplicação de técnicas de *High Temperature Short Time* (HTST) e *Ultrahigh Temperature* (UHT) em materiais sólidos ou suspensões (IMAI et al., 1995), melhorando assim a qualidade do produto final e adicionando a ele maior valor agregado (CASTRO et al., 2003; KIM et al., 1996; PARROTT 1992; VICENTE et al., 2006; TUCKER, 2004). Este desejável cenário dificilmente é alcançado por meio de técnicas de processamentos térmicos convencionais (como por exemplo, o aquecimento por meio de trocadores de calor, banho de água, etc.) (LIMA et al., 1999). Sendo assim, os “processamentos assépticos” de fluidos contendo partículas e de fluidos de alta viscosidade são considerados as aplicações mais promissoras para o processamento ôhmico na indústria de alimentos (PALANIAPPAN e SASTRY, 2002; RICE, 1995; WANG et al., 2001).

Existe uma ampla gama de potenciais futuras aplicações para o aquecimento ôhmico, incluindo o branqueamento, evaporação, desidratação, fermentação, extração (USA-FDA, 2000), esterilização, pasteurização, aquecimento de alimentos pré-ingestão no campo militar ou aeroespacial em missões de longa duração (SASTRY et al., 2009). Entretanto, a maioria destas aplicações ainda espera por exploração comercial (SASTRY, 2005).

➤ **PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO**

Conforme descrito anteriormente, o princípio de funcionamento do aquecimento ôhmico baseia-se na aplicação de um campo elétrico, para a indução de corrente elétrica sobre o material processado. Um material é considerado condutor se seus elétrons puderem se mover livremente de um átomo a outro. O fluxo de elétrons em um material é conhecido como corrente elétrica e sua intensidade é determinada pelo número de elétrons (quantidade de carga) em movimento em um determinado instante.

Convencionalmente, em acordo com o Sistema Internacional de Unidades, a intensidade de uma determinada corrente elétrica é mensurada em amperes (símbolo: A). Quantitativamente, 1A (um ampere) é equivalente ao fluxo de aproximadamente 6×10^6 eV (elétron volt, ou seja, a carga eletrônica) por segundo (ANDERSON, 2008). A medida da habilidade em mover uma determinada carga elétrica através de uma resistência (oposição ao fluxo de eletricidade) é denominada voltagem (SHUGAR e BALLINGER, 1996).

Em 1827, a partir de observações experimentais, Georg Simon Ohm (1789-1854) enunciou que: “a intensidade da corrente elétrica que percorre um condutor é diretamente proporcional à diferença de potencial (ou seja, à voltagem) e inversamente proporcional à resistência do circuito” (este enunciado é conhecido como Lei de Ohm). Para um circuito sob corrente alternada (AC), este enunciado é matematicamente expresso por:

$$i_m = V_m \cdot Z^{-1} \text{ (equação 1)}$$

onde i_m é a corrente elétrica de pico do circuito, V_m é a voltagem de pico do gerador de AC aplicada no circuito e Z é a impedância do circuito (resistência do circuito à passagem de corrente).

Resulta da resistência elétrica uma força no sentido oposto ao deslocamento dos elétrons. Esta força ocasiona a realização de trabalho o qual retira energia do sistema. A energia retirada é inteiramente dissipada pelo sistema na forma de energia térmica. A lei física que descreve a relação entre a energia térmica dissipada por uma corrente elétrica que percorre determinado condutor em determinado tempo é conhecida como Lei de Joule (também conhecida como Efeito Joule) e pode ser matematicamente enunciada por:

$$P_{rms} = i_{mq} \cdot V_{mq} \text{ (equação 2)}$$

onde P_{rms} representa a potência média dissipada em um resistor com uma corrente alternada, i_{mq} é a corrente média quadrática no sistema e V_{mq} é a voltagem média quadrática aplicada ao sistema. Neste caso, quando analisado um circuito sob AC, temos que:

$$i_{mq} = i_m \cdot 2^{-1/2} = 0,707 \cdot i_m \text{ (equação 3)}$$

$$V_{mq} = V_m \cdot 2^{-1/2} = 0,707 \cdot V_m \text{ (equação 4)}$$

Aplicando-se o enunciado da Lei de Ohm (equação 1) ao enunciado de Joule (equação 2) e considerando que a condutividade elétrica (σ , expressa em

S/m) relaciona-se com a impedância do sistema de modo que, quando multiplicadas suas grandezas, obtemos resultado igual a um ($\sigma \cdot Z = 1$), temos que:

$$P_{rms} = i_{mq} \cdot V_{mq} = V_{mq}^2 \cdot Z^{-1} = \sigma \cdot V_{mq}^2 \text{ (equação 5)}$$

onde P_{rms} representa a potência média dissipada pelo sistema, i_{mq} é a corrente média quadrática que transpassa o sistema, V_{mq} é a voltagem média quadrática aplicada ao sistema, Z é a impedância do sistema e σ é a condutividade elétrica.

Ou seja, a energia dissipada pela corrente elétrica, em um circuito elétrico, é proporcional à condutividade elétrica do circuito e ao quadrado do potencial aplicado neste.

➤ O AQUECIMENTO ÔHMICO FRENTE A OUTRAS TECNOLOGIAS DE AQUECIMENTO POR RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA

“A indústria alimentícia recorre ao emprego de radiações eletromagnéticas com finalidades muito diversas. (...) Dependendo da energia associada, do comprimento de onda e da frequência da emissão, o efeito decorrente de sua interação com determinado material é muito diferente” (ORDÓÑEZ et al., 2005). Dentre as metodologias de tratamento térmico, destacam-se: o aquecimento por infravermelho, por microondas, dielétrico e ôhmico.

(I) AQUECIMENTO POR INFRAVERMELHO: O aquecimento por infravermelho é uma transmissão de calor por radiação, a qual produz determinada vibração nas ligações intra e intermoleculares dos componentes dos alimentos que se traduz no incremento da temperatura. A capacidade de penetração dessa radiação é pequena; por isso, seu efeito limita-se à superfície, enquanto o restante do alimento é aquecido por condução ou convecção.

(II) AQUECIMENTO POR MICRO-ONDAS: A energia das micro-ondas converte-se em calor ao ser absorvida pela matéria. No espectro eletromagnético, as micro-ondas situam-se entre as ondas de rádio e a radiação infravermelha. A interação dessa radiação, em determinado material, cria uma distorção, resultante do efeito do campo magnético associado ao elétrico. Na geração de calor por micro-ondas, nos alimentos, distinguem-se fundamentalmente dois mecanismos: a condução iônica e a rotação de dipolos (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O processo de aquecimento por microondas é influenciado por uma série de parâmetros, tanto do equipamento como do produto a ser aquecido. Alguns fatores críticos ao processo são: frequência e distribuição das ondas no interior da cavidade de processamento, conteúdo hídrico, temperatura, parâmetros do produto (incluindo massa, densidade, geometria, espessura), e calor específico. A distribuição espacial da absorção das micro-ondas é afetada

por estes parâmetros, o que significa que velocidades de aquecimento diferentes serão observadas.

Desta forma, o processamento por micro-ondas apresenta como principal obstáculo a não-uniformidade de aquecimento e a imprevisibilidade da localização dos pontos frios, os quais podem prejudicar a segurança dos alimentos (VICENTE e CASTRO, 2007; ORDÓÑEZ et al., 2005).

“Ainda que as micro-ondas sejam uma forma limpa de energia, (...) o aquecimento por micro-ondas implica em gasto energético elevado. O custo decorrente do gasto de energia elétrica pode ser três vezes superior ao consumo energético dos métodos tradicionais. Conseqüentemente, o emprego de micro-ondas deve limitar-se às aplicações que representem uma vantagem substancial ou quando seus efeitos não possam ser obtidos por outros meios” (ORDÓÑEZ et al., 2005).

(III) AQUECIMENTO DIELETRICO: “O aquecimento dielétrico é definido como a calefação de um material isolante elétrico, pelas perdas que se produzem nele, quando é submetido a um campo elétrico alternado. O processo consiste em colocar o produto, que será aquecido (dielétrico), entre duas placas ou eletrodos paralelos, denominadas *placas capacitantes*, unidas a um gerador alternado de alta frequência e capacidade. Do mesmo modo que nos fornos micro-ondas, o calor é gerado por fricção das moléculas dipolares como resposta à aplicação de um campo elétrico alternado” (ORDÓÑEZ et al., 2005). No aquecimento dielétrico, são empregadas altas frequências, em geral

13,56; 27,12 ou 40,68 MHz (VICENTE e CASTRO, 2007). Desta forma, o aquecimento dielétrico difere do aquecimento ôhmico, devido à frequência empregada e a condutividade elétrica do material ao qual é aplicável.

Quando comparado com metodologia tradicional (aquecimento por banho de água ou trocadores de calor), o aquecimento dielétrico apresenta vantagens similares ao aquecimento ôhmico e às micro-ondas, as quais são essencialmente devidas à geração de calor por todo o volume do material processado. Suas principais desvantagens são: alto custo, tanto operacional quanto dos equipamentos utilizados; obtenção de menores velocidades de aquecimento, quando comparado às micro-ondas, e o limitado conhecimento atual quanto às propriedades dielétricas dos alimentos.

(IV) COMPARAÇÕES: O aquecimento ôhmico, em seu campo de aplicação, apresenta, portanto, diversas vantagens quando comparado com outras metodologias de aquecimento por radiação eletromagnética. Diferentemente do aquecimento por infravermelhos, o aquecimento ôhmico possibilita o aquecimento do material processado por toda a extensão de seu volume.

Quando comparado ao aquecimento por micro-ondas e ao aquecimento dielétrico, o aquecimento ôhmico apresenta menores custos iniciais e operacionais, maior homogeneidade de aquecimento e maior previsibilidade da distribuição térmica (quando comparado às micro-ondas), maior aplicabilidade a materiais com alto teor hídrico e maiores velocidades de aquecimento

(quando comparado ao aquecimento dielétrico). O aquecimento ôhmico apresenta ainda maior faixa de frequências aplicáveis, uma vez que as microondas e o aquecimento dielétrico apresentam limitações de frequência, possibilitando que não haja interferência com outras tecnologias como radares e comunicações.

➤ **PRINCÍPIOS FÍSICOS DA TÉCNICA**

CAMPO ELÉTRICO: A distribuição do campo elétrico, em um sistema de aquecimento ôhmico, é determinada pela solução de uma equação diferencial parcial conhecida como equação de Laplace:

$$\nabla \cdot (\sigma \nabla V) = 0 \text{ (equação 6)}$$

onde σ é a condutividade elétrica do material e ∇V representa o gradiente de voltagem. Esta equação é obtida pela combinação da lei de Ohm com a equação da continuidade da corrente elétrica e difere da equação usual de Laplace:

$$\nabla^2 V = 0 \text{ (equação 7)}$$

pois σ é variável em função da posição e temperatura (VICENTE e CASTRO, 2007; SALENGKE e SASTRY, 2007).

A equação 6, para ser resolvida, necessita de condições de contorno específicas para cada situação. A solução desta equação, para um modelo

estático, contendo uma única partícula, foi obtida por Alwis e Fryer (1990) aplicando as seguintes condições de contorno: (I) os eletrodos apresentam voltagem uniforme, ou (II) não há fluxo de corrente além da área analisada. Para uma situação mais complexa, onde diferentes tipos de partículas são encontrados em um fluido composto por diversas fases líquidas (como por exemplo, em uma sopa de vegetais, onde diferentes pedaços sólidos de vegetais estão presentes em um fluido, o qual apresenta ao menos uma fase aquosa e uma fase lipídica), a solução matemática para a equação 6 ainda é indeterminada. Nestes casos, a previsão da distribuição do campo elétrico é realizada aplicando-se modelos semi-empíricos (VICENTE et al., 2006).

GERAÇÃO DE CALOR: Conforme indicado anteriormente, a geração de calor, em um sistema de aquecimento ôhmico, é determinada por:

$$P_{rms} = \sigma \cdot V_{mq}^2 \text{ (equação 5)}$$

Sendo σ variável em função da posição e temperatura. Admitindo que σ apresente variação linear quando a temperatura varia, temos que:

$$\sigma_T = \sigma_{ref} [1 + m(T - T_{ref})] \text{ (equação 8)}$$

onde σ_T e σ_{ref} representam a condutividade elétrica a uma temperatura T e a uma temperatura de referência T_{ref} , respectivamente, e m é o coeficiente de temperatura.

Em um meio estático, contendo uma única partícula, a distribuição de temperatura é determinada pela condutividade térmica e a geração interna de energia, assim:

$$\rho_f \cdot C_{pf} \cdot \delta T_f / \delta t = \nabla \cdot (k_f \cdot \nabla T_f) + P_f \text{ (equação 9)}$$

$$\rho_s \cdot C_{ps} \cdot \delta T_s / \delta t = \nabla \cdot (k_s \cdot \nabla T_s) + P_s \text{ (equação 10)}$$

onde f e s indicam o meio fluido ou sólido, respectivamente, ρ representa a densidade, C_p é o calor específico, T é a temperatura, k é a condutividade térmica e P representa o calor gerado internamente por meio da dissipação da energia elétrica.

Sendo P determinado por:

$$P_f = |\nabla V_{mq}|^2 \cdot \sigma_{f \text{ ref}} [1 + m(T_f - T_{f \text{ ref}})] \text{ (equação 11)}$$

$$P_s = |\nabla V_{mq}|^2 \cdot \sigma_{s \text{ ref}} [1 + m(T_s - T_{s \text{ ref}})] \text{ (equação 12)}$$

Ou seja, a energia aplicada, para variação de temperatura, é dada pela energia adquirida pelo transporte de energia térmica (condutividade térmica) somada à energia elétrica dissipada no interior do material, em consequência da corrente elétrica que o transpassa e de sua resistência.

Para a resolução das equações 9 e 10, faz-se necessário o estabelecimento das condições iniciais e de contorno, que são:

$$T_f = T_s = T_{ar} \text{ no instante } t=0 \text{ (equação 13)}$$

$$-k_f \cdot \nabla T_f \cdot \vec{n}|_w = h_{fw} \cdot (T_f - T_{ar})|_w \text{ (equação 14)}$$

$$-k_p \cdot \nabla T_p \cdot \vec{n}|_s = h_{fp} \cdot (T_{ps} - T_f)|_s \text{ (equação 15)}$$

onde k é a condutividade térmica; $\vec{n}|_w$ e $\vec{n}|_s$ representam a unidade vetorial normal na interface fluido-parede do aquecedor e na interface fluido-partícula, respectivamente; h_{fw} e h_{fp} representam o coeficiente total de transferência de calor nas interfaces fluido-parede do aquecedor e na interface fluido-partícula, respectivamente; T representa a temperatura, sendo T_{ar} a temperatura do ar circundante ao aquecedor e T_{ps} a temperatura da partícula na interface fluido-partícula.

Estas equações, acima descritas, fornecem as bases para o desenvolvimento de um modelo para a previsão das taxas de aquecimento de um sistema fluido e de um sistema fluido-sólido. De acordo com Alwis e colaboradores (1989), a velocidade de aquecimento de um sistema é determinada por: (I) a condutividade elétrica dos seus constituintes, (II) a geometria e tamanho das partículas presentes, (III) a orientação espacial das partículas e (IV) a variação térmica das propriedades físicas do sistema. Sastry e Palaniappan (1992) indicam que a fração volumétrica das partículas, ou seja, o volume total ocupado pelas partículas em relação ao volume total tratado, também tem influência sobre a velocidade de aquecimento. Dentre todos estes

fatores apontados, a condutividade elétrica é tida como fator crítico para a previsão da velocidade de aquecimento do sistema (VICENTE et al., 2006).

➤ **APLICAÇÕES ATUAIS DO AQUECIMENTO ÔHMICO**

Conforme reportado por Destinee R. Anderson (2008), atualmente, alguns produtores de alimentos aplicam a tecnologia de processamento ôhmico em seus processos. Dentre os produtores de alimentos, que se utilizam do sistema de aquecimento ôhmico, se incluem: (I) Sous Chef Ltda. na Inglaterra, onde uma unidade de 75 kilowatt processa carnes com baixa acidez e vegetais. (II) Wildfruit Products, uma divisão da Nissei Co. Ltda. do Japão, onde um sistema apresentando 75 kilowatt de potencia é utilizado para o tratamento de frutas. (III) Papetti's Hygrade Egg Products em Elizabeth, NJ, USA, que se utiliza de um sistema em 200 KHz, produzido pela Raztek ([HTTP://www.razetek.com/home.html](http://www.razetek.com/home.html)), para o processamento de cerca de 4500 a 9000 Kg de ovos líquidos por hora. Este sistema aquece os ovos líquidos a temperaturas de 270° a 290°C e os mantém a esta temperatura por 3,5 minutos. Amostras tratadas por metodologia convencional alcançaram contagens de até 10000 UFC/mL; comparativamente, amostras tratadas por aquecimento ôhmico apresentaram contagens inferiores a 10 UFC/mL após o período de 12 semanas (ANDERSON, 2008). As contagens microbianas iniciais demonstraram-se similares, porém conforme o tempo de armazenamento progrediu, o número de bactérias sobreviventes ao

aquecimento ôhmico foi inferior. O estudo concluiu que os efeitos danosos adicionais, observados no tratamento com aquecimento ôhmico, eram provenientes da eletroporação celular obtida com esta metodologia. (IV) Emmepiemme SRL ([HTTP://www.fiereparma.it/spazi/200720/03011026.html](http://www.fiereparma.it/spazi/200720/03011026.html)) em Piacenza, na Itália, que se utiliza do aquecimento ôhmico para o processamento de diversos alimentos, incluindo: alimentos para bebês, alcachofras, cenouras, cogumelos, ketchup, néctar de frutas, sucos de frutas, pimentas, couves-flor, pasta de tomate, molhos, patês e purês de frutas.

Diversas outras aplicações para o aquecimento ôhmico, na indústria de alimentos, incluem: aquecimento de alimentos líquidos como sopas, ensopados e frutas em calda; processamento de alimentos termosensíveis; tratamento de sucos para a inativação de proteínas (tais como de abacaxi ou papaia); branqueamento; descongelamento; gelatinização do amido; esterilização; remoção de casca de frutas (eliminando a necessidade de utilização de produtos químicos corrosivos); desidratação; extração; fermentação; e processamento de alimentos ricos em proteínas, as quais tendem a desnaturar e coagular quando termicamente tratadas (RAMASWAMY et al., 2005).

➤ **PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE**

A proteína verde fluorescente, GFP, extraída da água-viva *Aequorea victoria*, é um potencial instrumento biológico, apresentando-se versátil em diferentes procedimentos de desinfecção (CHAU, 2004) e tratamentos térmicos (ISHII, 2003), por ser facilmente observada sob luz UV.

A proteína verde fluorescente recombinante (GFP) é uma proteína compacta, globular (CHALFIE, 1998) e ácida (pI 4,6 – 5,4; CHIARINI, 2002), composta de monômeros de 27kDa, resistente ao calor ($T \geq 95^\circ\text{C}$; ISHII, 2003), ao pH alcalino (pH 5,5 – pH 12) e a agentes químicos (CHAU et al., 2004). Facilmente monitorada, a GFP emite máxima fluorescência, quando excitada por luz ultravioleta (UV 360-400 nm), com pico de excitação de 394 nm e pico de emissão de 509 nm, entre pH 5 e 9 (CHIARINI, 2002), sendo o pH 8 o de máxima fluorescência.

A estrutura cristalina da GFP é o conjunto de dois monômeros, dispostos em 11 fitas, formados por beta-folha pregueada externamente, em forma de barril ou cilindro, que abriga em seu centro geométrico um fluoróforo que está ligado ao cilindro por alfa-hélices. Três aminoácidos: serina, tirosina e glicina formam o fluoróforo da GFP selvagem. Aminoácidos estes que, na GFP, sofrem duas reações: ciclização autocatalítica entre a carbonila da Tyr⁶⁶ e o grupo amino da Gly⁶⁷, e da carbonila da Ser⁶⁵ e o grupo amino da Tyr⁶⁶, o que dá origem a uma ligação covalente e a uma etapa lenta, dependente do oxigênio, onde a ligação simples, entre os carbonos C α – C β da Tyr⁶⁶, resulta

em duplas ligações conjugadas com propriedades fluorescentes (CHALFIE, 1998).

Estudos recentes indicam que a presença do campo elétrico, durante o aquecimento, pode apresentar efeitos adicionais, quando comparado com metodologias de aquecimento convencionais (*e.g.* trocadores de calor, banho d'água). Na inativação enzimática, por exemplo, como demonstrada por Vicente e colaboradores, algumas enzimas apresentam velocidade de decaimento de atividade diferenciada, quando inativadas por meio de aquecimento ôhmico. O estudo e a compreensão do comportamento protéico/enzimático, quando submetido ao aquecimento ôhmico, podem beneficiar uma ampla gama de processos industriais, reduzindo potencialmente o tempo de tratamento térmico de alguns alimentos e/ou medicamentos e, conseqüentemente, o custo total de produção destes, principalmente para processos de branqueamento.

O entendimento do comportamento da proteína GFPuv e a comparação deste comportamento com indicadores biológicos convencionais, como esporos de *B. subtilis*, proporcionam uma base de dados, para o desenvolvimento de ferramenta biotecnológica, capaz de otimizar o processo de obtenção de resposta sobre a eficácia do processo térmico esterilizante. Por detecção direta da emissão de fluorescência, sob luz UV, a GFPuv proporciona alternativa aos métodos convencionais utilizados, criando um novo panorama e progresso na área da saúde (ISHII, 2006).

➤ **BACTERIOCINA NISINA**

A nisina é um peptídeo da classe dos lantibióticos, produzido por *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Os lantibióticos são peptídeos antimicrobianos, bactericidas, produzidos por uma extensa gama de bactérias Gram-positivas (Jozala, 2005). A nisina é um lantibiótico linear (Banerjee e Hansen, 1988), classificada como termoestável (Thomas, Clarkson e Delves-Broughton, 2000; Jozala, 2005), e apresenta massa molar de 3,5 kDa (Hurst, 1981)

A nisina é capaz de inibir a germinação de esporos e o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas. Sua ação sobre bactérias Gram-negativas é observada na presença de agentes quelantes, que tornam as células sensíveis à ação antimicrobiana (Jozala, 2005). A presença de agentes quelantes torna as bactérias Gram-negativas sensíveis à ação da nisina, pois eles facilitam a penetração deste peptídeo no interior celular bacteriano.

O uso da nisina, como agente conservante natural de produtos de natureza biológica (como queijos, carnes e embalagens de embutidos), é permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996).

CAPITULO I

CONSTRUÇÃO DO AQUECEDOR ÔHMICO

1.0 INTRODUÇÃO

O aquecimento ôhmico ocorre através da transformação interna de energia (energia elétrica para energia térmica) dentro do material processado (SASTRY e BARACH, 2000). O fator primordial, para o sucesso da utilização desta tecnologia de processamento, é a determinação de “cold spots”. “Cold-spots” são regiões compreendidas nos volumes tratados, nas quais a eficiência do aquecimento é reduzida. Desta forma, estes locais tendem a apresentar temperaturas inferiores às temperaturas apresentadas no resto do volume em processamento. Em processos convencionais, dependentes principalmente de fenômenos de condução e convecção térmica, o principal fator a ser considerado, para a determinação de um “cold-spot”, é a condutividade térmica dos diferentes materiais em aquecimento. Porém, na tecnologia de aquecimento ôhmico, esta avaliação deve abranger também o conhecimento da condutividade elétrica dos materiais e a distribuição do campo elétrico aplicado.

Em materiais não homogêneos, contendo partículas sólidas, o conhecimento da condutividade elétrica das partículas e sua relação com a condutividade do fluido (ou dos fluidos), onde estas estão contidas, é fator crítico para que se possa entender e avaliar a velocidade de aquecimento dos

componentes do sistema. Desta forma, a condutividade elétrica de cada componente do sistema a ser tratado e sua adequação ao sistema, como um todo, é essencial para o sucesso da aplicação do aquecimento ôhmico (BISS et al., 1989; FRYER e ZHANG, 1993, WANG et al., 2001).

A determinação e previsão da condutividade elétrica de um sistema heterogêneo é uma função complexa, que envolve diversos fatores, os quais estão principalmente associados ao conteúdo hídrico e mineral de cada componente do sistema, assim como à presença de substâncias não condutoras (como açúcares e gorduras). Dados empíricos fundamentam a teoria de que materiais, com maiores quantidade de água e minerais e menores quantidades de substâncias não condutoras, apresentam maior condutividade elétrica (WANG et al., 2001; WANG e WU, 1999).

A velocidade de aquecimento de partículas, em um fluido, depende de: (I) as condutividades relativas das fases do sistema e (II) do volume relativo de cada uma destas fases (SARANG et al. 2007). Partículas com baixa condutividade elétrica, comparativamente ao fluido, tendem a aquecer de modo menos intenso que o fluido circundante, quando em baixas concentrações. Porém, em condições nas quais a concentração destas partículas é alta, estas mesmas partículas, de baixa condutividade elétrica, podem se aquecer mais rapidamente que o fluido. Portanto, o fenômeno de liderança ou retardo no aquecimento depende da significância da resistência elétrica das partículas em relação à resistência total do sistema (SASTRY e PALANIAPPAN, 1992).

Este fenômeno ocorre, pois, com o aumento da concentração das partículas, o caminho da corrente elétrica no interior do fluido torna-se mais tortuoso, forçando uma maior porcentagem de corrente a transpassar as partículas. Como resultado, observa-se maior geração de energia térmica dentro das partículas e, conseqüentemente, maior velocidade de aquecimento destas (SARANG et al., 2007; SASTRY e PALANIAPPAN, 1992). Este fato indica que, ajustando-se a influencia geral da resistência das partículas com relação à resistência do fluido (por meio de ajustes de concentração), pode-se ajustar o padrão de aquecimento de um sistema sólido-líquido.

1.1 EQUIPAMENTO PARA REALIZAÇÃO DE AQUECIMENTO ÔHMICO

O equipamento foi projetado, segundo apresentado na figura 1 e 2, sob supervisão do Professor Dr. António Vicente (Universidade do Minho, Braga, Portugal), e desenvolvido pela equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada e pela empresa Hold Ltda. (Brasil), sob a supervisão da Professora Dra. Thereza Christina Vessoni Penna (FBT- FCF- Universidade de São Paulo, Brasil). O equipamento contém, fundamentalmente, um recipiente de vidro cilíndrico de 30 cm de comprimento e 2,3 cm de diâmetro interno, o qual apresenta entradas para alocação de eletrodos de titânio, associado a instrumentos de controle (amperímetro e voltímetro), e entradas, em sua porção superior, para alocação de sensores (termômetro). A tomada de dados é realizada de modo manual pelo operador. O fluxo de água na “camisa” do

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do Comportamento da GFPuv e da Nisina

equipamento (para realização de eventual aquecimento/resfriamento secundário) é realizado por bomba associada a banho-maria termo-regulado por meio de mangueiras de silicone. A distância entre os eletrodos (e, conseqüentemente, o volume interno disponível para alocação de amostra) é mensurada utilizando-se paquímetro digital. O sistema, em sua totalidade, é vedado, utilizando-se roscas, conexões de teflon e *O-rings* de silicone.

Figura 1. Desenho esquemático do sistema de aquecimento ôhmico (adaptado de CASTRO et al., 2004). V e A representam o voltímetro e amperímetro, respectivamente.

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do Comportamento da GFPuv e da Nisina

Figura 2. Projeto do recipiente de vidro do sistema de aquecimento ôhmico, juntamente com desenho esquemático do suporte de teflon e eletrodo.

1.2 PONTOS CRÍTICOS OBSERVADOS NO EQUIPAMENTO

Após a confecção do sistema, observou-se no equipamento alguns pontos críticos, os quais indicaram a necessidade de otimização e modificação do sistema.

1.2.1 SISTEMA DE MEDIÇÃO DE TEMPERATURA

O primeiro ponto crítico apresentado foi a necessidade de um sistema de medição de temperatura que não fosse influenciado pela presença do campo elétrico. Diversos equipamentos foram testados no intuito de verificar sua aplicabilidade no sistema. Os equipamentos testados foram: (I) termopar tipo K

(Cromel/Alumel), (II) termômetro digital (termoresistência) e (III) termômetro de mercúrio (líquido em vidro).

(I) Termopares são equipamentos elétricos largamente utilizados para medição de temperatura. Estes equipamentos têm, por princípio de atuação, o fenômeno conhecido como Efeito Seebeck. Este efeito descreve a geração de uma tensão elétrica, pela junção de dois metais, cuja intensidade é variável em função da temperatura. Desta forma, a medição da intensidade desta tensão elétrica possibilita a verificação da temperatura. Embora a confecção de um termopar possa ser realizada com praticamente quaisquer metais, algumas combinações são normalizadas, devido à previsibilidade das tensões geradas e à faixa de temperatura nas quais as respostas apresentadas são lineares. O termopar tipo K, por exemplo, apresenta tensões que variam de -6,458 mV a 48,838 mV em uma faixa de temperatura de -270°C a 1200°C.

Sendo os termopares leitores de tensão elétrica, observou-se que sua aplicação, no sistema de aquecimento ôhmico, é limitada pela presença de campos elétricos e/ou de correntes elétricas. Os campos elétricos e/ou as correntes elétricas incidentes, no sistema ôhmico, mostraram-se fonte de perturbação das tensões do termopar e, conseqüentemente, fonte de erros de leitura. Desta forma, para a utilização de um sistema de termopar, para a realização de tomadas de temperatura em um sistema ôhmico, há a necessidade de cuidados especiais com a finalidade de se evitarem erros. Uma possível medida de contorno é a utilização de revestimento vítreo, de ferro ou

de aço. O revestimento vítreo apresenta-se como possibilidade de bloqueio da corrente elétrica incidente, porém ele não anularia o campo elétrico do sistema. O revestimento de ferro ou aço, por sua vez, anularia tanto a corrente incidente como o campo elétrico (de modo similar a uma “Gaiola de Faraday”). Porém, existe a possibilidade dos revestimentos de ferro ou aço sofrerem aquecimento, juntamente com o material em processamento, por serem confeccionados em material condutor. Para os revestimentos em ferro ou aço, faz-se também necessário o isolamento dos sensores, por meio de um isolante elétrico que apresente boa condutividade térmica, para que estes sensores não sofram influências devido ao contato com o revestimento.

(II) As termoresistências são sensores que se baseiam no princípio da variação da resistência ôhmica em função da temperatura. Apresentam um instrumento de leitura, o qual mensura a corrente elétrica, que transpassa o sensor, quando aplicada uma pequena tensão elétrica. Devido ao Efeito Joule (e o resultante aquecimento ôhmico da resistência), a potência máxima normatizada (DIN-IEC 751/85) para uma termoresistência não pode ser maior que 1,0 mW. Desta forma, verificou-se que a presença de campos elétricos influencia sobremaneira a leitura de temperatura, nestes sistemas, sendo necessários cuidados especiais para a utilização deste tipo de equipamento para a medição de temperaturas durante o aquecimento ôhmico. Estes cuidados são similares aos apresentados para os sistemas termopares.

(III) Dentre os sistemas de medição de temperatura analisados, o termômetro de mercúrio (líquido em vidro) foi o único mecanismo de medição que não apresentou interferência sensível quando sobre efeito dos campos elétricos aplicados. Porém, este sistema apresenta como desvantagem a demora no tempo de resposta para uma correta leitura. Durante o aquecimento ôhmico, dependendo da intensidade dos campos elétricos aplicados, a velocidade de aquecimento dos materiais pode ser realizada de modo extremamente rápido. Desta forma, faz-se necessária a estabilização da temperatura ou a redução intencional da velocidade de aquecimento para que os erros de leitura sejam minimizados.

Uma possível alternativa, aos termopares revestidos e às termoresistências revestidas, é a utilização de leitores de temperatura, os quais atuam por meio do emprego de radiação infravermelha (IV). A intensidade de energia IV, emitida por um material, é variável em função de sua temperatura. Esta energia emitida, ao atingir o sistema óptico do instrumento (termômetro), é conduzida para um ou mais detectores fotossensíveis. O detector, por sua vez, converte a energia IV em um sinal elétrico de intensidade proporcional à temperatura. Desta forma, o valor de temperatura resultante baseia-se na equação de calibração do sensor e na emissividade do alvo. A leitura de temperatura medida é, então, convertida em um sinal digital e indicada em um terminal de computador. Este tipo de medição (fundamentada no emprego de radiação IV) apresenta grande vantagem por não sofrer interações com

campos elétricos e/ou correntes elétricas presentes no material analisado e por não necessitar de contato físico entre o equipamento de medição e a amostra analisada.

1.2.2 RELAÇÃO “ESPAÇOS-MORTOS”, DISTRIBUIÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO E VOLUME DE AMOSTRA

Para que haja sustentação dos eletrodos e para possibilitar sua união ao sistema elétrico externo, foram confeccionados dois suportes vazados, em teflon, os quais transpassam as entradas laterais do equipamento (ver figura 2). Estes suportes são sustentados por roscas (que apresentam além da função suporte, função de vedação do sistema) localizadas imediatamente após as aberturas laterais do vidro. O ajuste entre os suportes dos eletrodos e o vidro apresenta um pequeno espaçamento (em torno de 2mm de distancia) no qual há o extravasamento de amostra. Esta amostra extravasada está alheia à atuação do campo elétrico do sistema e, portanto, não sofre aquecimento por meio deste, sofrendo variações de temperatura principalmente decorrentes de fenômenos de condução e/ou convecção térmica. Este espaço de extravasamento, onde não há aquecimento por meio da aplicação do campo elétrico foi denominado “espaço-morto”.

Para que haja limitação dos “espaços-mortos”, faz-se necessário o distanciamento entre os eletrodos, de modo que estes se aproximem da rosca

de sustentação, porém tal medida apresenta repercussões no sistema. O distanciamento entre os eletrodos compromete a distribuição do campo elétrico, de forma a torná-lo menos uniforme em sua extensão. Conseqüentemente, torna o aquecimento menos homogêneo na extensão da amostra, além de aumentar, de modo considerável, o volume de amostra necessária para experimentos, assim como a intensidade do campo elétrico necessário para provocar, de modo eficiente, o aquecimento.

Um campo elétrico uniforme é aquele em que o vetor ***E*** (denominado vetor campo elétrico) é o mesmo em todos os pontos. Assim, em cada ponto do campo, o vetor ***E*** tem a mesma intensidade, a mesma direção e o mesmo sentido. As linhas de força de um campo elétrico uniforme são retas paralelas, igualmente espaçadas, e todas com o mesmo sentido (figura 3) (RAMALHO, FERRARO e SOARES, 2003)

Obtém-se um campo elétrico praticamente uniforme, entre duas placas eletrizadas, através de cargas elétricas de sinais opostos. Para que isso ocorra, a distância entre as placas deve ser muito pequena, quando comparada com suas dimensões.

Figura 3. Desenho esquemático de um campo elétrico uniforme. O vetor campo elétrico E apresenta-se com mesma intensidade, direção e sentido em todos os pontos do campo elétrico.

A existência de um campo elétrico não uniforme implica na variação da intensidade do vetor campo elétrico e, desta forma, na variação da força eletromotriz sobre as cargas presentes na amostra. Considerando-se que a intensidade da força eletromotriz é inversamente proporcional ao quadrado da distância entre a carga geradora do campo e o ponto em análise (equação 18), podemos verificar que, em campos elétricos não-uniformes, pequenas variações na distância entre as cargas podem gerar grandes variações na força eletromotriz. Estas variações na força eletromotriz, por sua vez, implicam em significativas variações na velocidade de aquecimento de diferentes pontos da amostra.

$$F_e = q \cdot E = k_0 \cdot |Q| \cdot |q| \cdot d^{-2} \quad (\text{equação 18})$$

onde: F_e é a força eletromotriz, E representa o vetor campo elétrico, k_0 é a constante eletrostática, $|Q|$ e $|q|$ são as intensidades das cargas envolvidas

(carga geradora do campo elétrico e carga na qual incide o campo) e d é a distância entre a carga geradora Q e a carga em análise q .

1.2.3 ESTUDO DE PROCESSOS EM FLUXO

Em escala industrial, muitos processos de produção são realizados de modo contínuo. Estes processos contínuos (também conhecidos como processos em fluxo) caracterizam-se, fundamentalmente, pela capacidade de operarem por longos períodos de tempo em estado estacionário, ou seja, mantendo as condições ideais para a realização das operações pretendidas. Decorre deste tipo de processo uma série de vantagens, em relação aos processos descontínuos, sendo algumas: o aumento da produtividade do processo, em virtude de uma redução dos tempos não-produtivos; a possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção; a maior facilidade no emprego de controles avançados e; a menor necessidade de mão-de-obra.

Dentre os processos contínuos, atualmente estudados, com grandes aplicações industriais para o aquecimento ôhmico, estão: a pasteurização de leites, o tratamento de frutas em calda (para serem incorporadas em outros produtos, como por exemplo, iogurtes), o tratamento de alimentos como sopas, etc. Porém, para que um experimento laboratorial possa resultar em dados significativos, para o estudo destes processos, faz-se necessária a garantia de

similaridade entre ambos. Sob este ponto de vista, a capacidade de simular processos em fluxo é bastante desejável ao equipamento, capacidade a qual não é apresentada segundo o modelo atualmente utilizado.

1.3 PROJETO DE NOVO EQUIPAMENTO

Tendo em vista os pontos críticos apresentados pelo equipamento construído, um novo projeto foi estudado, elaborado e aplicado na construção de novo equipamento. Este novo projeto foi desenvolvido pela equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada e pela empresa Hold Ltda. (Brasil), sob a supervisão da Professora Dra. Thereza Christina Vessoni Penna (FBT- FCF- Universidade de São Paulo, Brasil) e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

De modo similar ao equipamento atual, o projeto contém, fundamentalmente, um recipiente de vidro (figura 5) que apresenta entradas laterais, para a introdução de eletrodos de titânio que são associados a instrumentos para medição digital (National Instruments Corporation, USA e Hold Ltda., Brasil), tais como: termopar tipo J (Ferro/Constantan), transdutor de voltagem, transdutor de corrente elétrica, régua digital, bomba de circulação externa e bomba peristáltica para circulação interna. Estes instrumentos apresentam-se conectados a um terminal de computador, para o ajuste de parâmetros e controles, realização de leituras e gravação de dados (ver figura 4 para detalhes dos componentes do painel). O software utilizado foi elaborado

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do Comportamento da GFPuv e da Nisina

utilizando-se a linguagem de programação LabView (National Instruments Corporation, USA).

Figura 4. Apresentação do painel do sistema de aquecimento ôhmico. a) foto do painel do sistema de aquecimento ôhmico com indicações de seus componentes (transdutores, relés, entradas de sinais, fonte de alimentação, aterramento e plataforma para controle de sinais digitais). b) foto dos transdutores utilizados no sistema ôhmico. O transdutor de voltagem apresenta entrada com capacidade de 0 a 600V e saída de 4 a 20mA. O transdutor de corrente apresenta entrada com capacidade de 0 a 10A e saída de 4 a 20mA. c) foto da plataforma de controle de sinal, com módulos para aquisição de sinais da régua digital, transdutores de corrente e voltagem e termômetro (termopar tipo J revestido)

O recipiente de vidro apresenta ainda maior número de entradas para sensores (ao total cinco entradas), as quais permitem a utilização de termopar tipo J, de agitador e a realização de análises experimentais em regime de fluxo (simulando desta forma um processo contínuo). Todas as entradas presentes, no vidro do equipamento, permitem o seu fechamento sem que haja a formação de espaços alheios à influência do campo elétrico aplicado. A peça de vidro permite ainda a circulação externa de água, para a realização de aquecimento/resfriamento secundário, realizado por bomba de circulação externa associada a banho-maria termo-regulado.

A distância apresentada entre os eletrodos é mensurada por meio de régua digital, a qual emite sinal TTL (*Transistor-Transistor Logic*) para leitura em computador. Os eletrodos apresentam dupla vedação (realizada por meio de “*O-rings*”), localizada imediatamente após a área útil dos eletrodos, para possibilitar o isolamento de uma ou mais entradas. Este isolamento permite, portanto, o controle do volume interno do equipamento sem que haja a criação de “espaços mortos” neste volume. O isolamento permite ainda a realização de análises experimentais com menores volumes de amostra e sob aplicação de campos elétricos mais uniformes (uma vez que menores distâncias entre os eletrodos poderão ser aplicadas).

O sistema de medição de temperatura consiste em um termopar tipo J revestido em vidro. Os metais internos do termopar apresentam-se circundados por óxido de magnésio, pois este apresenta alta condutibilidade térmica, porém

baixa condutibilidade elétrica. Verificações prévias realizadas demonstraram a eficácia deste equipamento, na realização de medições de temperatura, sem que houvesse introdução perceptível de erros de leitura devidos à incidência de campos elétricos.

CAPITULO II - AVALIAÇÃO COMPARATIVA, ENTRE A METODOLOGIA CONVENCIONAL E ÔHMICA, DA PERDA DE FLUORESCENCIA DA GFP E DA PERDA DE ATIVIDADE DO PEPTÍDEO NISINA QUANDO SOB AQUECIMENTO CONVENCIONAL E ÔHMICO

2.0 INTRODUÇÃO

O aquecimento ôhmico é uma tecnologia emergente que apresenta grande potencial de aplicação. Esta tecnologia é definida como um processo no qual se induz a passagem de corrente elétrica, por determinado material, com o objetivo primário de aquecê-lo (VICENTE et al., 2006). O aquecimento ocorre devido à transformação interna de energia (a partir da energia elétrica para energia térmica). Por esta razão, o aquecimento ôhmico pode ser considerado um processo de geração interna de energia térmica. Conseqüentemente, este processo de aquecimento independe da transferência de calor, por uma interface sólido-líquido ou no interior de um sólido. Desta forma, o “processamento asséptico” de fluidos, contendo partículas, é considerado a aplicação mais promissora para a tecnologia de aquecimento ôhmico.

Estudos recentes, realizados por Castro e colaboradores (2004), indicam que algumas proteínas (enzimas) apresentam comportamento diferenciado quando inativadas por metodologias de aquecimento convencional (*e.g.* trocadores de calor, banho d'água) ou ôhmico. Castro e colaboradores (2004) demonstraram que a inativação das enzimas lipoxigenase (LOX) e polifenoloxidase (PPO) é consideravelmente afetada (apresentando maior

velocidade de inativação) pela incidência de campos elétricos durante o aquecimento ôhmico. Por outro lado, enzimas como a pectinase (PEC), fosfatase alcalina (ALP) e a β -galactosidase (β -GAL) não apresentaram distinções em suas velocidades de inativação quando aquecidas por metodologia convencional e ôhmica. Os autores indicam que os grupos prostéticos metálicos, presentes nas enzimas LOX e PPO (ausentes nas enzimas PEC, ALP e β -GAL), possivelmente interagem com os campos elétricos causando a exacerbação do efeito de inativação.

A mesma exacerbação, no efeito de inativação, foi observada por Icier e colaboradores (2008) para a enzima peroxidase presente em purê de pêra. Os valores de tempo crítico de inativação reportados, para o aquecimento ôhmico, a 50 V/cm e 40 V/cm, foram 54 e 104 segundos, respectivamente, enquanto que, para metodologia de aquecimento convencional, foi de 300 segundos.

Apesar destas indicações de comportamento protéico diferenciado, poucas informações adicionais são atualmente disponíveis na literatura científica.

Dentre as proteínas de interesse, ao aquecimento ôhmico, encontra-se a bacteriocina nisina. O interesse no comportamento da nisina, quando sob influencia de campos elétricos, reside em sua potencialidade para atuar de forma sinérgica, com o aquecimento ôhmico, para a conservação de alimentos e outros produtos perecíveis. Pesquisas recentes indicam que o aquecimento ôhmico apresenta efeitos celulares, não térmicos, devido à presença de campos elétricos (CHO, YOUSEF e SASTRY, 1999; PEREIRA, MARTINS,

MATEUS, TEIXEIRA e VICENTE, 2007; SUN et al., 2008), os quais são principalmente atribuídos ao efeito de eletroporação das membranas celulares (USA-FDA, 2000). Desta forma, a eletroporação pode, potencialmente, facilitar a ação da nisina sobre microrganismos, de modo similar ao observado quando a nisina é aplicada conjuntamente com EDTA (DELVES-BROUGHTON, 1993).

Uma classe de proteínas que, atualmente, têm gerado muito interesse são as proteínas verdes fluorescentes (GFP, *Green Fluorescent Protein*). A primeira GFP descrita na literatura científica (SHIMOMURA et al., 1962) foi originalmente extraída da espécie *Aequorea aequorea* e é considerada altamente estável na manutenção de sua fluorescência. Posteriormente, descobriu-se que outras espécies bioluminecentes continham uma GFP similar à proteína da *Aequorea*, as quais atuam como emissoras de bioluminescência *in vivo* (HASTING e MORIN, 1969a,b ; MORIN e HASTING, 1971a, b; WAMPLER et al., 1971, 1973; CORMIER et al., 1973, 1974; MORIN, 1974). São exemplos de gêneros que apresentam GFP: *Aequorea*, *Mitrocoma*, *Obelia*, *Phialidium*, *Acanthoptilum*, *Cavernularia*, *Renilla*, *Ptilosarcus* e *Stylatula* (SHIMOMURA, 1998).

As GFPs apresentam estrutura tridimensional cilíndrica (figura 6), comumente intituladas de “*beta-can*”, e apresentam seus grupos cromóforos posicionados próximos ao centro geométrico de suas estruturas. Desta forma, o grupo cromóforo de uma GFP está circundado e protegido por onze fitas beta-folha. Esta estruturação fornece uma barreira protetora sobremaneira eficiente, de modo que clássicos agentes supressores de fluorescência (como

acrilamidas, haletos e o oxigênio molecular) não apresentam praticamente nenhum efeito sobre a fluorescência das GFPs (WARD, 1998).

A GFP, atualmente, é aplicada em diversos estudos biotecnológicos como marcador. Recentemente, levantou-se a hipótese da aplicabilidade da GFP como sensor para processos de esterilização por calor (ISHII, 2006).

2.1 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo a avaliação da aplicabilidade da GFP como sensor biológico para processos de inativação microbiológica por meio do aquecimento ôhmico. Objetiva-se também a avaliação comparativa da perda de fluorescência da GFP e da atividade da bacteriocina nisina quando sob aquecimento convencional e ôhmico.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 PRODUÇÃO DA GFP

A produção de GFP foi realizada por meio do cultivo de cepa de *Escherichia coli* DH5- α na qual se inseriu, de acordo com o protocolo do manual de biologia molecular (SAMBROOK, 1989), o plasmídeo *pGFP* (Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos), contendo a seqüência de transcrição da proteína, juntamente com a seqüência para transcrição de β -

lactamase. O controle da transcrição e tradução da sequência genética codificadora, da GFP, no plasmídeo, foi realizado por meio da introdução de indutor de transcrição, o Isopropil β -D-1-tiogalactopirósídeo (IPTG; Sigma, USA). A *E. coli* DH5- α foi cultivada em meio Luria Bertani (LB; Difco, USA) contendo ampicilina, na concentração de 0,01g/100mL, por 24 horas, à 37°C. Após as primeiras 2 horas de cultivo, adicionou-se 125 μ L de IPTG, para induzir a produção de GFP durante a fase logarítmica do crescimento microbiano. As células contendo GFP, obtidas por meio deste cultivo, foram centrifugadas (6300g por 20 minutos; Jouan, França) para a remoção do meio de cultura.

As células, depois de centrifugadas e removidas do meio de cultivo, foram dispersas em 2 mL de tampão de extração, composto por 25 mM de TRIS-EDTA (Sigma, USA) pH 8 e 1 mM de fenil-metil-sulfonil-fluorídeo (Sigma, USA). A cada alíquota de 4 mL desta suspensão, adicionou-se 3 mL de $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ (Vetec, Brasil), na concentração 4 M e 7 mL de t-butanol (Mallinckrodt, USA). A suspensão foi, então, vigorosamente agitada, em vortex, por 8 minutos, e centrifugada (6300g por 20 min). O t-butanol e o pellet de resíduo celular, presente na interface das fases formadas, foram removidos e descartados. Posteriormente, realizou-se nova adição de 7 mL de t-butanol, seguida por agitação vigorosa e centrifugação (6300g por 20 min). Após a centrifugação, observou-se a formação de uma interface entre as fases contendo GFP. Esta interface foi coletada e suspensa em 1 mL de tampão de extração.

2.2.2 PURIFICAÇÃO DA GFP

A purificação da GFP, obtida por meio do cultivo acima descrito, foi realizada pela aplicação da técnica de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

À suspensão de GFP obtida, foi adicionado 1 mL de $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ 4M. Esta suspensão resultante foi passada por uma coluna cromatográfica metil de fluxo rápido, previamente equilibrada com $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ 2M. Os resíduos indesejados, presentes na coluna, foram removidos pela passagem de $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ 1,3M e, posteriormente, removeu-se a GFP purificada pela passagem de tampão TRIS-EDTA (pH 8).

A intensidade de fluorescência da solução final de GFP purificada foi medida com a utilização de espectrofluorofotômetro (Shimadzu, Japão).

2.2.3 Preparo da amostra de Nisina

A amostra de nisina (Sigma-Aldrich, USA) foi preparada na concentração de 0,01 g/mL em solução tampão PBS (phosphate buffered saline), ajustando-se o pH final da solução para pH 5,0.

2.2.4 DESCRIÇÃO DO SISTEMA UTILIZADO

A unidade de aquecimento utilizada (figura 6), para o aquecimento ôhmico e convencional (banho d'água), consiste em um tubo de vidro cilíndrico de 30 cm de comprimento e 2,3 cm de diâmetro interno. A medição de temperatura foi realizada por termômetro de mercúrio.

Figura 6. Desenho esquemático do sistema utilizado para aquecimento ôhmico e convencional (adaptado de CASTRO et al., 2004). V e A representam o voltímetro e amperímetro, respectivamente).

O aquecimento convencional foi realizado pela passagem de água aquecida (60º, 70º e 80ºC) na camisa externa do equipamento. Para a realização do aquecimento ôhmico, foram utilizados dois eletrodos de titânio localizados nas extremidades do volume interno. Os eletrodos foram conectados a uma fonte de energia, para aplicação de campo elétrico alternado (0 a 300V) e indução da passagem de corrente elétrica (0-10A) na frequência

de 60 Hz. A tensão elétrica aplicada e a intensidade da corrente gerada foram medidas com a utilização de voltímetro e amperímetro, respectivamente.

2.2.5 TRATAMENTO TÉRMICO E COLETA DE DADOS

O tratamento térmico das amostras foi realizado em triplicata nas temperaturas de 60º, 70º e 80ºC em 50 mL de solução tampão TRIS-EDTA (pH 8) para amostras de GFPuv. Para cada análise realizada, estabilizou-se 49 mL de TRIS-EDTA, na temperatura de tratamento pretendida e, após a estabilização, adicionou-se 1 mL de solução concentrada de GFP. A estabilização prévia da temperatura foi realizada, para evitar interferências nas leituras de fluorescência da GFP devidas à cada fase de aquecimento da solução (diferentes para cada metodologia de aquecimento aplicada). Após a adição do concentrado de GFP, provocou-se a homogeneização da amostra. Alíquotas da amostra foram periodicamente retiradas e tiveram sua intensidade de fluorescência analisada em espectrofluorofotômetro. As análises de inativação de fluorescência foram realizadas em triplicata.

Amostras de nisina sofreram tratamento térmico nas temperaturas de 70º e 80ºC. As análises foram realizadas em triplicata. Após o aquecimento das amostras, à temperatura pretendida para o tratamento térmico, uma alíquota foi retirada para análise e a atividade de nisina observada foi considerada como a atividade inicial no tempo zero. Desta forma, pretendeu-se excluir, dos dados observados, os efeitos térmicos sofridos pelo tempo de aquecimento das

amostras, uma vez que para cada metodologia de aquecimento este tempo demonstrou-se variável.

2.2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GFP E DA ATIVIDADE DE NISINA

A concentração da GFP foi determinada com a utilização de espectrofluorofotômetro. Para tanto, foram utilizados os comprimentos de onda ideais para a excitação e leitura da emissão apresentados pela GFP, a saber: $\lambda_{\text{ex}} = 394 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$, para excitação e emissão, respectivamente.

Utilizou-se GFP recombinante purificada, para a produção de uma curva padrão, correlacionando a concentração de GFP com a intensidade de fluorescência.

A atividade de nisina foi verificada, por meio da aplicação do método de difusão em agar, conforme procedimento descrito por Jozala (2005). Para tanto, inoculou-se cepa de *Lactobacillus sake* (utilizada como célula sensível), em concentração conhecida, em MRS *soft-agar*. Após a solidificação do meio de cultura, foram feitos orifícios, com diâmetro aproximado de 3mm, na superfície do agar, nos quais foram aplicadas alíquotas de 50 μ L das amostras coletadas durante os experimentos. As placas foram incubadas à 30°C, por 24 horas e, após este período, realizou-se as leituras dos diâmetros dos halos formados (inibição do crescimento celular), realizando-se quatro medidas de diâmetro, para cada halo observado, e considerando-se a média dos valores.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva padrão realizada demonstrou que a GFP apresenta correlação linear entre concentração e fluorescência para o intervalo de concentração analisado.

Durante os ensaios, após a estabilização da temperatura e adição da GFP concentrada ao sistema de aquecimento, observou-se apenas uma pequena variação de temperatura (entre -0,5° e -1,0°C para ambas as metodologias de aquecimento), seguida de uma rápida estabilização térmica (tempo máximo de estabilização de 10s). Estas variações foram desconsideradas por encontrar-se dentro da faixa de erro de leitura do equipamento de medição (termômetro de mercúrio).

Os dados obtidos (tabela 1 e 2) foram:

Metodologia Conventional				
Temperaturas		60°C		70°
Tempo (min)	Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão	Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão
2	10,790	0,596	10,192	0,582
4	10,576	0,582	9,727	1,05
6	10,189	0,452	9,226	0,712
8	10,104	0,255	9,262	0,773
10	10,093	0,327	8,963	1,18
12	10,056	0,632	8,646	1,08
14	9,978	0,417	8,345	0,769
16	9,983	0,605	8,298	0,911
18	9,788	0,403	7,921	0,589
20	9,819	0,427	7,986	0,653

Tabela 1. Dados obtidos para a inativação da fluorescência da GFP, quando mantida aquecida por metodologia convencional, a 60° e 70°C. Os valores apresentados representam a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência ao decorrer do tempo de experimento.

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do Comportamento da GFPuv e da Nisina

Metodologia Ôhmica				
Temperaturas	60 °C		70 °C	
Tempo (min)	Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão	Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão
2	11,303	0,564	9,054	0,312
4	10,365	0,673	8,246	0,635
6	9,931	0,304	7,944	0,770
8	9,677	0,176	7,516	0,736
10	9,722	0,351	7,701	0,538
12	9,635	0,441	7,568	0,831
14	9,557	0,816	7,572	0,619
16	9,539	0,540	7,550	0,657
18	9,555	0,639	7,528	0,738
20	9,341	0,238	7,295	0,917

Tabela 2. Dados obtidos para a inativação da fluorescência da GFP, quando mantida aquecida por metodologia ôhmica, a 60º e 70ºC. Os valores apresentados representam a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência ao decorrer do tempo de experimento.

Metodologia Convencional			Metodologia Ôhmica	
Temperatura	80°C		80°C	
Tempo (s)	Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão	Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão
20	11,304	1,05	10,240	0,332
40	8,923	0,546	7,585	0,299
60	6,814	0,971	7,076	0,603
80	6,157	0,924	5,100	0,582
100	4,966	0,979	4,425	1,03
120	5,280	0,456	5,115	0,481
140	5,104	0,510	4,251	0,562
160	3,802	0,541	5,113	0,977
180	4,456	0,529	4,956	0,931
200	3,966	0,842	4,057	0,866

Tabela 3. Dados obtidos para a inativação da fluorescência da GFP, quando mantida aquecida por metodologia convencional e ôhmica, a 80ºC. Os valores apresentados representam a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência ao decorrer do tempo de experimento.

A partir dos dados obtidos, foi possível verificar um rápido decréscimo de fluorescência da GFP nos momentos iniciais do tratamento térmico por ambas as metodologias. Após este período de decréscimo, a velocidade de perda de fluorescência variou de modo acentuado, apresentando-se muito mais tênue. Esta observação está em conformidade com descrições do comportamento da GFP realizadas por Ward (1998).

Gráfico 1. Decréscimo da fluorescência da GFP, quando aquecida por metodologia convencional (banho d'água) e ôhmica, a 60°C. A curva apresentada representa a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência pelo tempo de experimento.

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do Comportamento da GFPuv e da Nisina

Gráfico 2. Decréscimo da fluorescência da GFP, quando aquecida por metodologia convencional (banho d'água) e ôhmica, a 70°C. A curva apresentada representa a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência pelo tempo de experimento.

Gráfico 3. Decréscimo da fluorescência da GFP, quando aquecida por metodologia convencional (banho d'água) e ôhmica, a 80°C. A curva apresentada representa a concentração (em µg/mL) de GFP que mantém sua fluorescência pelo tempo de experimento.

Segundo o que foi apresentado por Ward (1998), a perda de fluorescência da GFP, devido a efeitos térmicos, ocorre quando esta perde suas características de estrutura terciária e secundária (BOKMAN e WARD, 1981). Esta desnaturação térmica, da GFP, ocorre paralelamente à renaturação da proteína, tornando-a novamente fluorescente, embora a GFP desnaturada por aquecimento não recupere sua fluorescência de modo eficiente (WARD, 1998). Desta forma, supondo a existência de equilíbrio entre a forma fluorescente e a forma desnaturada da proteína, é possível inferir que, a partir de determinado instante de tratamento térmico, a velocidade de perda da fluorescência da GFP tenderá a se igualar com a velocidade de renaturação da proteína. Este fato é embasado pelas observações experimentais realizadas e explicam a observação de um “patamar” de concentração alcançado pelos tratamentos térmicos realizados.

Nos experimentos realizados, não foi possível observar diferenciação no comportamento de perda da fluorescência da GFP nas temperaturas de 60º, 70º e 80ºC quando comparado o aquecimento convencional e ôhmico.

A fluorescência da GFP é atribuída a um anel imidazólico formado a partir da ciclização autocatalítica entre os aminoácidos Ser⁶⁵ e Gly⁶⁷. Esta ciclização ocorre devido à distância apresentada pelos aminoácidos envolvidos e à presença de grupos ácidos e básicos, nas proximidades do cromóforo, os quais catalisam a ciclização e estabilizam suas formas ressonantes (figura 6).

Os aminoácidos envolvidos na estabilização do cromóforo são His¹⁴⁸, Gln⁹⁴, Arg⁹⁶ e Glu²²².

Figura 7. Diagrama esquemático das formas ressonantes do cromóforo da GFP com apresentação dos aminoácidos básicos His¹⁴⁸, Gln⁹⁴ e Arg⁹⁶ e aminoácido ácido Glu²²² que participam de sua estabilização (extraído de PHILLIPS, 1998).

É possível observar que a estabilização do grupo cromóforo da GFP é realizada por meio da interação de diversas cargas (parciais ou formais) presentes na estrutura protéica. Apesar de estas interações serem potencialmente suscetíveis à ação de campos elétricos, não foi possível observar influência dos campos elétricos aplicados (intensidade média de 32, 28 e 25 V/cm) sobre o comportamento de desnaturação térmica da GFP.

Construção de Sistema de Aquecimento Ôhmico e Verificação Comparativa do Comportamento da GFPuv e da Nisina

De modo similar à GFP, os experimentos realizados com a bacteriocina nisina não demonstraram diferenciação entre o comportamento do peptídeo sob aquecimento convencional ou ôhmico. Sendo os seguintes dados coletados:

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Aquecimento Convencional		Aquecimento Ôhmico	
		Média (mm)	Desvio padrão	Média (mm)	Desvio Padrão
70º	0	22,35	0,88	22,20	0,92
	10	20,60	0,58	23,25	0,77
	20	20,95	0,72	22,08	1,13
	30	22,23	0,32	23,76	0,54
80º	0	19,78	0,52	22,43	0,62
	10	20,87	0,77	22,45	1,24
	20	21,52	0,40	21,29	0,69
	30	19,91	0,38	17,32	1,04

Tabela 4. Dados obtidos para a atividade da bacteriocina nisina, quando mantida aquecida por metodologia convencional e ôhmica, a 70º e 80ºC. Os valores apresentados e seus respectivos desvios padrões representam a média dos valores observados após a aplicação da metodologia de difusão em ágar.

A nisina é um peptídeo termoresistente, o qual pode ser submetido à temperatura de 121ºC, por 5 minutos, em determinadas condições de pH, sem que sofra degradação sensível (Arauz et al., 2009). Esta característica de termoresistência é bastante desejável e oportuna, para sua aplicação concomitante à tecnologia de aquecimento ôhmico, na conservação de produtos alimentícios e farmacêuticos. Sendo o comportamento da nisina

similar, sob aquecimento, por ambas as metodologias, confirma-se o potencial para a obtenção de efeito sinérgico entre a conservação de produtos por meio de aquecimento ôhmico concomitantemente com a aplicação de nisina. Entretanto, para a confirmação ou refuta de ação sinérgica, entre as metodologias de conservação, maiores estudos fazem-se necessários.

2.4 CONCLUSÃO

O aquecimento ôhmico apresenta diversas aplicações potenciais. Dentre estas se encontram processos de branqueamento e tratamento térmico de suspensões/soluções protéicas. A incidência de campos elétricos durante o aquecimento demonstrou capacidade de interação com algumas proteínas.

Intensidades médias de campos elétricos de 25, 28 e 32 V/cm (a 60°, 70° e 80°C, respectivamente) não demonstraram interferência sobre o comportamento da GFPuv quando comparados o aquecimento ôhmico e o aquecimento convencional.

De modo similar, o peptídeo nisina não demonstrou modificação de comportamento quando submetido a ambas as tecnologias de aquecimento. Este comportamento similar faz-se bastante desejável, devido à termiresistencia do peptídeo e sua potencialidade em apresentar efeito sinérgico com a tecnologia de aquecimento ôhmico para a conservação de produtos.

BIBLIOGRAFIA

- ALWIS A.A.P.; FRYER, P.J. A finite-element analysis of heat generation and transfer during OH of food. **Chemical Engineering Science**, v. 45, p. 1547–1559, 1990. doi:10.1016/0009-2509(90)80006-Z.
- ALWIS, A.A.P.; HALDEN, K.; FRYER, P.J. Shape and conductivity effects in the ohmic heating of foods. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 67, p. 159–168, 1989.
- ANDERSON, D. R. **Ohmic heating as an alternative food processing technology**. 2008. 54 f. Tese (Mestrado) – Food Science Institute, College of Agriculture, Kansas State University, Manhattan, Kansas.
- ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 20, n. 3-4, pag. 146-154, 2009. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056.
- BANERJEE, S. e HANSEN, J. N. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 263, p. 9508-9514, 1988.
- BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M. Foodborne disease outbreak in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 804-817, 1990.
- BISS, C.H.; COOMBES. S.A.; SKUDDER. P.J. The development and application of ohmic heating for the continuous heating of particulate foodstuffs. In: FIELD, J.A.; HOWELL, J.A. (org.). **Process Engineering in the Food Industry**. London UK: Elsevier, 1989. p. 11-20.

BOKMAN, S. H.; WARD, W. W. Renaturation of Aequorea green-fluorescent protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 101, p. 1372-1380, 1981.

CASTRO, I. **Ohmic heating as an alternative to conventional thermal treatment**. 2007. Tese (Doutorado), Universidade do Minho, Braga, Portugal.

CASTRO, I.; MACEDO, B.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. The effect of electric field on important food-processing enzymes: Comparison of inactivation kinetics under conventional and ohmic heating. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. C696-C701, 2004.

CASTRO, I.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. The influence of field strength, sugar and solid content on electrical conductivity of strawberry products. **Journal of Food Process Engineering**, v. 26, p. 17–29, 2003.

CHALFIE, M.; KAIN, S. **Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols**, New York: Ed. Willey-liss, p. 385, 1998.

CHAU, E.; KUNIMURA, S.J.; ISHII, M.; PENNA, T.C.V. Evaluation of Green Fluorescent Protein (GFPuv) as a Biological Marker for Microbial Inactivation in Water Purification System and Hospitals, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, supl.1, 2004.

CHIARINI, E.B. **Comparação entre os Métodos Físicos e Químicos de Permeação e de Extração da Proteína Verde Fluorescente (GFPuv) de Culturas de Escherichia Coli DH5- α** . 2002. 64f. (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), Universidade de São Paulo, 2002.

CHO, H.Y.; YOUSEF, A.E.; SASTRY, S.K. Growth kinetics of Lactobacillus acidophilus under ohmic heating. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 49, n. 3, p. 334-340, 1996.

CHO, H.Y.; YOUSEF, A.E.; SASTRY, S.K. Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 62, n. 3, p. 368-372, 1999.

CORMIER, M.J.; HORI, K.; ANDERSON, J.M. Bioluminescence in coelenterates. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 346, p. 137-164, 1974.

CORMIER, M.J.; HORI, K.; KARKHANIS, Y.D.; ANDERSON, J.M.; WAMPLER, J.E.; MORIN, J.G.; HASTINGS, J.W. Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates. **J. Cell. Physiol.**, v. 81, p. 291-297, 1973.

COSTER, H.G.; ZIMMERMANN, U. The mechanism of electric breakdown in membranes of *Valonia utricularis*. **Journal of Membrane Biology**, v. 22, p. 73-90, 1975.

FRYER, P.; ZHANG, L. Electrical resistance heating of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 4, n. 11, p. 364-369, 1993.

GERMAN INDUSTRIAL STANDARDS ORGANIZATION - EUROPEAN INTERNATIONAL ELECTRONIC COMMITTEE. **DIN-IEC 751/85**: Reference platinum precision resistance thermometers. Alemanha, 1985.

HASTING, J.W.; MORIN, J.G. Calcium-triggered light emission in *Renilla*. A unitary biochemical scheme for coelenterate bioluminescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 37, p. 493-498, 1969a.

HASTING, J.W.; MORIN, J.G. Comparative biochemistry of calcium activated photoproteins from ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, *Pelagia* and *Renilla*. **Biol. Bull.**, v. 137, p. 402, 1969b.

- IÇIER, F.; YILDIZ, H.; BAYSAL, T. Polyphenoloxidase deactivation kinetics during ohmic heating of grape juice. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 410-417, 2008.
- IMAI, T.; UEMURA, K.; ISHIDA, N.; YOSHIKAZI, S.; NOGUCHI, A. Ohmic heating of Japanese White Radish *Raphanus sativus* L. **International journal of food science and technology**, v. 30, p. 461-472, 1995.
- ISHII, M. **Aplicação da proteína verde fluorescente (GFPuv) como indicador biológico na validação da autoclavação de soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de itens termolábeis**. Comparação entre esporos de *Bacillus subtilis*. 2006. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ISHII, M. **Determinação dos parâmetros cinéticos de resistência térmica da Proteína Verde Fluorescente recombinante (GFPuv)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- JOZALA, A. F. **Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo**. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- KIM, H.J.; CHOI, Y.M.; YANG, T.C.S.; TAUB, I.A.; TEMPEST, P.; SKUDDER, P.; TUCKER, G.; PARROTT, D.L. Validation of OH for quality enhancement of food products. **Food Technology**, v. 50, p. 253–261, 1996.
- LIMA, M.; HESKITT, B.F.; BURIANEK, L.L.; NOKES, S.E.; SASTRY, S.K. Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating. **Journal of Food Preservation**, v. 23, p. 421-434, 1999.

- MORIN, J.G. Coelenterate bioluminescence. In: MUSCATINE, L.; LENHOFF, H.M. (org.). **Coelenterate Biology**: Reviews and Perspectives. New York: Academic, 1974. p. 397-438.
- MORIN, J.G.; HASTING, J.W. Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. **J. Cell. Physiol.**, v. 77, p.305-311, 1971a.
- MORIN, J.G.; HASTING, J.W. Energy transfer in a bioluminescent system. **J. Cell. Physiol.**, v. 77, p. 313-318, 1971b.
- MOSQUEDA-MELGAR, J.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; RAYBAUDI-MASSILIA, R.M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effects of pulse electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 747-759, 2008.
- ORDÓÑEZ, J.A. (ed.) **Tecnologia de alimentos**: Componentes dos alimentos e processos, vol. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- PALANIAPPAN, S.; & SASTRY, S.K. Effects of electroconductive heat treatment and electrical pretreatment on thermal death kinetics of selected microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 225-232, 1992.
- PALANIAPPAN, S.; SASTRY, S. (2002). Ohmic heating. In: JUNEJA, V.K.; SOFOS, J.N. (org.). **Control of foodborne microorganisms**. New York: Marcel Dekker.
- PARROTT, D.L. Use of OH for aseptic processing of food particulates. **Food Technology**, v. 45, p. 68–72, 1992.

- PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A. Conceitos básicos de esterilização e desinfecção. In: NOGAROTO, S.L.; PENNA, T.C.V. (org.). **Desinfecção e Esterilização**. São Paulo: Atheneu, 2006.
- PEREIRA, R.; MARTINS, J.; MATEUS, C.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. **Chemical Papers**, v. 61, n. 2, p. 121-126, 2007.
- PHILLIPS, G. N. The three-dimentional structure of green fluorescent protein and its implications for function and design. In: CHALFIE, M, KAIN, S. (org.). **Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols**, New York: Ed. Willey-liss, 1998.
- RAMALHO, F.; FERRARO, N.G.; SOARES, P.A.T. **Os fundamentos da Física Vol. 3**. 8. ed. rev. e ampl. São Paulo: Editora Moderna, 2003. p. 33-73, ISBN 85-16-03702-9 (LA), 85-16-03703-7 (LP).
- RAMASWAMY, R.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; SASTRY, S.K. 2005. Ohmic Heating of Foods-Fact Sheet for Food Processors. Ohio State University (OSU). Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/fse-fact/0004.html>. Acesso em: 1 de junho de 2010.
- RICE, J. Ohmic Adventures. **Food Processing**, p. 56, n. 3, p. 87-91, 1995.
- SALENGKE, S.; SASTRY, S.K. Models for ohmic heating of soli-liquid mixtures under worst-case heating scenarios. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 337-355, 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press:New York, 1989.

SARANG, S.; SASTRY, S.K.; GAINES, J.; YANG, T.C.S.; DUNNE, P. Product Formulation for Ohmic Heating: Blanching as a Pretreatment Method to Improve Uniformity in Heating of Solid-Liquid Food Mixtures. **Journal of Food Science E: Food Engineering and Physical Properties**, v. 72, n. 5, p. E227-E234, 2007.

SASTRY, S.K. Advances in ohmic heating and moderate electric field (MEF) processing. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. (ed.). **Novel food processing technologies**. Boce Raton, FL: CRC Press, 2005.

SASTRY, S.K.; BARACH, J.T. Ohmic and Inductive Heating. **Journal of Food Science Supplement**, v. 65, n. 4, p. 42-46, 2000.

SASTRY, S.K.; JUN, S.; SOMAVAT, R.; SAMARANAYAKE, C.; YOUSEF, A.; PANDIT, R.B.. Heating and sterilization technology for long-duration space missions. In: INTERDISCIPLINARY TRANSPORT PHENOMENA: ANNALS OF N.Y. ACADEMY OF SCIENCES, v. 1161, p. 562–569. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04088.x. 2009.

SASTRY, S.K.; PALANIAPPAN, S. Mathematical modeling and experimental studies on ohmic heating of liquid-particle mixtures in a static heater. **Journal of Food Engineering**, v. 15, p. 241–261, 1992.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Orgs.). **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

SHIMOMURA, O. The discovery of green fluorescent protein. In: CHALFIE, M, KAIN, S. (ed.). **Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols**, New York: Ed. Willey-liss. 1998.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. **J. Cell. Comp. Physiol.**, v. 59, p. 223-239, 1962.

SHUGAR, G.J.; BALLINGER, J.T. **Chemical Technicians' Ready Reference Handbook**, 4th edition. McGraw-Hill, Inc. 1996.

SMITH, K.E.; MEDUS, C.; MEYER, S.D.; BOXRUD, D.J.; LEANO, F.; HEDBERG, C.W.; ELFERING, K.; BRAYMEN, C.; BENDER, J.B.; DANILA, R.N. Outbreaks of salmonellosis in Minnesota (1998 through 2006) associated with frozen, microwaveable, breaded, stuffed chicken products. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 10, p. 2153-60, 2008.

SUN, H.X.; KAWAMURA, S.; HIMOTO, J.I.; ITOH, K.; WADA, T.; KIMURA, T. Effects of ohmic heating on microbial counts and denaturation of proteins in milk. **Food Science and Technology Research**, v. 14, p. 117–123, 2008.

TAUXE, R.V. Salmonella: a postmodern pathogen. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 563-568, 1991.

THOMAS, L. V.; CLARKSON, M. R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: Naidu, A. S., Editor, 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 463-524.

TUCKER, G.S. Food waste management and value-added products: using the process to add value to heat-treated products. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, p. CRH102-CRH104, 2004.

UNITED STATES OF AMERICA, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: Ohmic and inductive heating. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101246.htm>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2009.

UNITED STATES OF AMERICA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2001. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In: Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm090977.htm>. Acesso em: 09 de setembro de 2008.

- UNITED STATES OF AMERICA. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. *Multistate outbreak of Salmonella infections associated with frozen pot pies--United States, 2007*. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 57, n. 47, p. 1277-80, 28 Nov 2008.
- VICENTE, A.A.; CASTRO, I. Novel thermal processing technologies. In: TEWARI, G.; JUNEJA, V.K. (eds). **Advances in thermal and non-thermal food preservation**. Oxford, UK, Blackwell publishing, 2007.
- VICENTE, A.A.; CASTRO, I.; TEIXEIRA, J.A. Ohmic heating for food processing. In: DA-WEN SUN (editor). **Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group. p 424- 468, 2006.
- WAMPLER, J.E.; HORI, K.; LEE, J.; CORMIER, M.J. Structured bioluminescence. Two emitters during both the *in vitro* and the *in vivo* bioluminescence of Renilla. **Biochemistry**, v. 10, p. 2903-2910, 1971.
- WAMPLER, J.E.; KARKHANIS, Y.D.; MORIN, J.G.; CORMIER, M.J. Similarities in the bioluminescence from the *Pennantulacea*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 314, p. 104-109, 1973.
- WANG, C.S.; KUO, S.Z.; KUO-HUANG, L.L.; WU, J.S.B. Effect of Tissue Infrastructure on Electric Conductance of Vegetable Stems. **Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties**, v. 66, n. 2, p. 284-288, 2001.
- WANG, C.S.; WU, J.S.B. Ohmic heating of fluids containing apple particulates. **Food Science and Agricultural Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 154-161, 1999.
- WARD, W.W. Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In: CHALFIE, M, KAIN, S. (eds.). **Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols**, New York: Ed. Willey-liss. 1998.

ANEXOS

- Artigos Científicos Publicados
- Curriculum Lattes
- Histórico Escolar do Mestrado
- Carta de Dispensa de Comitê de Ética
- Norma para Defesa de Dissertação