

INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

ESTG

APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE
BAIXA/MODERADA INTENSIDADE NA INATIVAÇÃO MICROBIANA

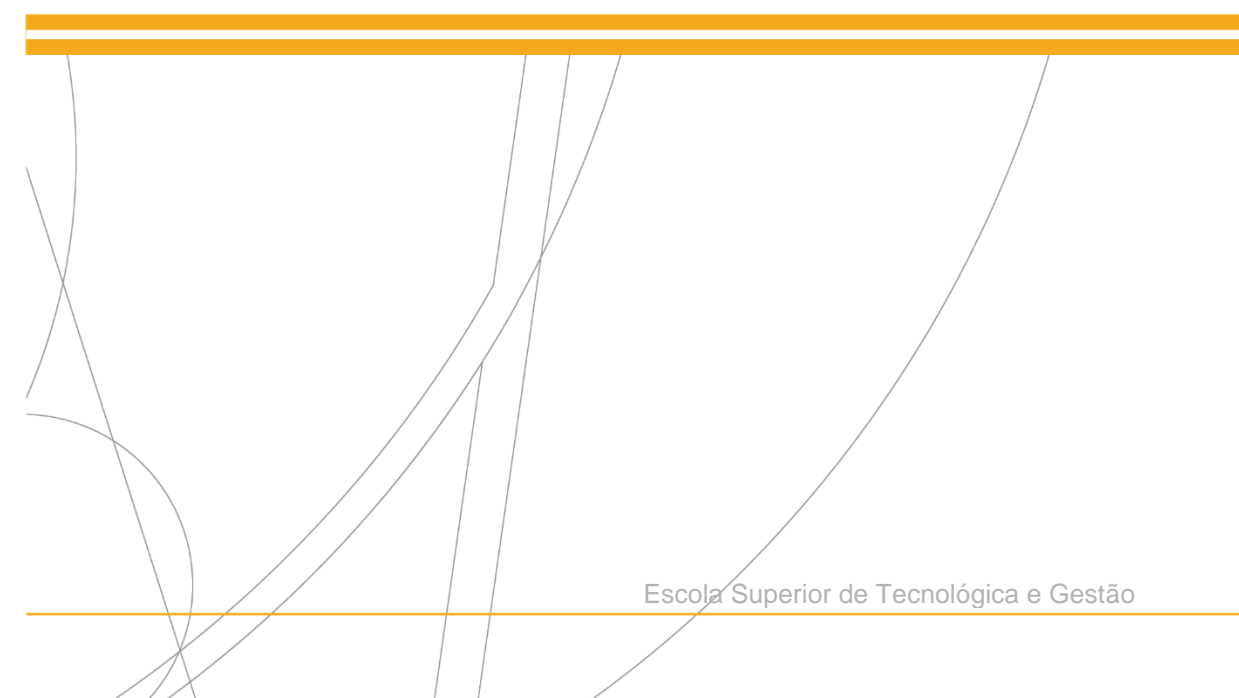
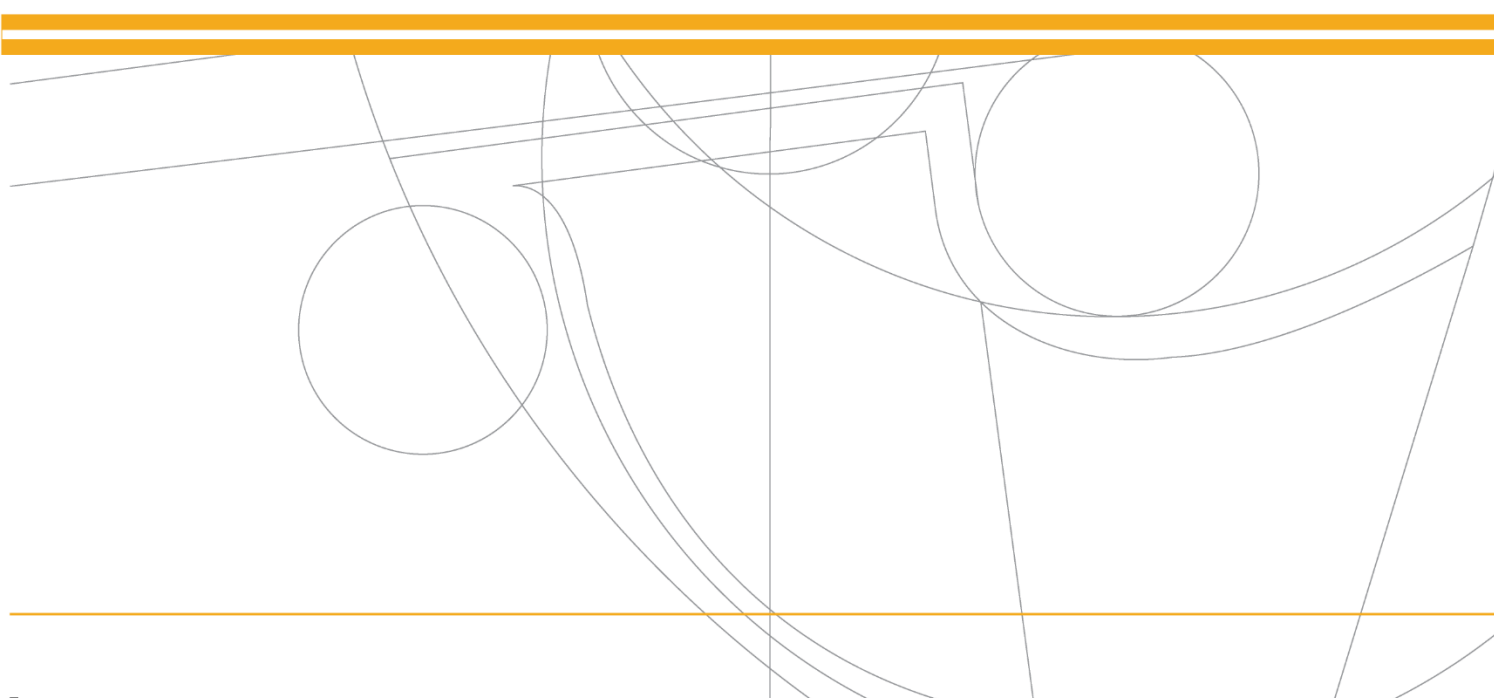
2021



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS PULSADOS DE BAIXA/MODERADA INTENSIDADE NA INATIVAÇÃO MICROBIANA

Alexandre Martins Romão



Escola Superior de Tecnológica e Gestão



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Alexandre Martins Romão

APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS
PULSADOS DE BAIXA/MODERADA
INTENSIDADE NA INATIVAÇÃO
MICROBIANA

Mestrado em Engenharia Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Paulo Fernandes

e coorientação do
Professor Doutor M. Rui Alves

agosto de 2021

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Campos Elétricos Pulsados	3
1.1.1. Enquadramento Histórico e Desenvolvimentos	3
1.1.2. Componentes do Sistema	5
1.2. Variáveis do Processo	8
1.2.1. Intensidade do Campo Elétrico (E)	8
1.2.2. Formato e Tamanho do Pulso (τ).....	9
1.2.3. Tempo de Tratamento (t)	11
1.2.4. Energia Específica (W)	11
1.2.5. Frequência (f)	11
1.2.6. Temperatura (T).....	12
1.3. Variáveis do Produto.....	14
1.3.1. Condutividade Elétrica	14
1.3.2. pH	14
1.3.3. Atividade de Água.....	15
1.4. Características do Microrganismos	16
1.4.1. Tipo de Microrganismo	16
1.4.2. Tamanho e Formato das Células.....	16
1.4.3. Condições de Cultura	17
1.5. Inativação Microbiana por Campos Elétricos Pulsados	18
1.5.1. Mecanismos de Eletropermeabilização	18
1.6. Aplicação de Campos Elétricos Pulsados na Indústria Alimentar	24

1.7. Enquadramento.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. Microrganismos Utilizados	26
2.2. Regeneração e Preparação das Culturas de Microrganismos a Testar .	26
2.3. Ensaios de Aplicação de Campos Elétricos Pulsados	27
2.4. Quantificação de <i>E. coli</i>	28
2.5. Quantificação de <i>L. salivarius</i>	28
2.6. Quantificação de <i>S. cerevisiae</i>	28
2.7. Análise de Dados	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1. Inativação de <i>E. coli</i>	30
3.2. Inativação de <i>L. salivarius</i>	32
3.3. Inativação de <i>S. cerevisiae</i>	34
3.4. Influência das Características Microbianas na Inativação.....	35
3.5. Influência do Tempo de Pulso na Inativação	37
3.6. Influência da Temperatura de Entrada e Caudal na Inativação	38
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho nomeadamente:

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Fernandes pela orientação prestada, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Rui Alves pelo apoio dado ao longo do de todo o trabalho sobretudo na análise estatística dos resultados.

Ao Vítor Monteiro, à Engenheira Carla Ramos e à Luísa Imperadeiro pela paciência, conhecimentos transmitidos e disponibilidade total no esclarecimento de dúvidas.

Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio e amizade ao longo de todo este percurso.

RESUMO

A tecnologia de campos elétricos pulsados (PEF) é vista como um dos métodos de processamento não-térmico mais promissores para a inativação de microrganismos. O processo é caracterizado pela aplicação de pulsos elétricos num produto colocado dentro de uma câmara de tratamento com dois elétrodos. A aplicação de um campo elétrico externo provoca distorções no campo elétrico à volta das células levando à permeabilização da membrana, num fenómeno denominado de eletroporação, sendo esta a premissa subjacente à inativação dos microrganismos no tratamento por PEF. Dependendo da intensidade do tratamento aplicado, a permeabilização da membrana provocada pela eletroporação pode ser reversível ou irreversível, sendo que neste caso leva à rutura permanente da membrana e conseqüente morte celular. Neste trabalho investigou-se a inativação não térmica de microrganismos através de campos elétricos pulsados de intensidade baixa/moderada procurando-se determinar o impacto das variáveis tempo de impulso, temperatura inicial e caudal na inativação de *Escherichia coli*, *Lactobacillus salivarius* e *Sacharomyces cerevisiae* inoculadas em tampão citrato-fosfato.

Os ensaios foram realizados utilizando um sistema de fluxo contínuo com um design de câmara de tratamento colinear, aplicando uma intensidade de campo elétrico de 10 kV/cm, uma frequência de 3 Hz com tamanho de pulso variável (1, 2, 4, 6, 10, 20, 50 μ s) em duas condições de temperatura inicial (23°C; 30°C) e de caudal (2,92 L/h; 6,74 L/h) combinadas entre si.

As condições de PFE em $E = 10$ kV/cm, $f = 3$ Hz e $\tau = 50$ μ s mostraram-se as mais eficazes na inativação de todos os microrganismos em estudo. Os resultados obtidos indicam claramente que a morte de microrganismos causada por campos elétricos pulsados está relacionada com a duração dos pulsos aplicados e conseqüente aumento do tempo de tratamento, sendo que quando este parâmetro é aumentado o grau de inativação de todos os microrganismos aumentou. Não foi observado qualquer efeito significativo na inativação causado pelas diferentes combinações de temperatura inicial-caudal utilizadas. Verificou-se também que a inativação microbiana por PEF depende das características dos microrganismos uma vez que para as mesmas condições de tratamento, S.

cerevisiae foi o microrganismo mais sensível, seguido de *E. coli*, que apresentou níveis de inativação comparáveis com os da levedura. *L. salivarius* foi o microrganismo mais resistente às condições de tratamento testadas.

Com este trabalho evidenciam-se os efeitos de algumas variáveis do processo na inativação de microrganismos o que pode ajudar na definição de tratamentos PEF mais eficazes que permitam atingir uma maior redução microbiana, uma vez que ficam patentes as dificuldades em atingir níveis de inativação elevados aplicando tratamentos PEF de baixa intensidade sem que estes sejam combinados com temperaturas de entrada elevadas ou outros tipos de tratamentos antimicrobianos.

ABSTRACT

Pulsed electric field (PEF) technology is seen as one of the most promising non-thermal food processing methods for the inactivation of microorganisms. The process consists in applying electrical pulses to a product placed inside a treatment chamber with two electrodes. The application of an external electric field causes distortions in the electric field around the cells, lead to membrane permeabilization, in a phenomenon called electroporation. Depending on the intensity of the applied treatment, membrane permeabilization caused by electroporation can be reversible or irreversible, and in this case it leading to permanent rupture of the membrane and consequent cell death. In this work, the non-thermal inactivation of microorganisms through pulsed electric fields of low/moderate intensity was studied in order to determine the impact of pulse time, initial temperature and flow rate on the inactivation of *Escherichia coli*, *Lactobacillus salivarius* and *Sacharomyces cerevisiae* inoculated in citrate-phosphate buffer.

The tests were carried out using a continuous flow system with a collinear treatment chamber, applying an electric field strength of 10 kV/cm, a frequency of 3 Hz with variable pulse size (1, 2, 4, 6, 10, 20, 50 μ s) under different conditions of initial temperature (23°C; 30°C) and flow rate (2.92 L/h; 6.74 L/h) combined between them.

The treatment conditions of $E = 10$ kV/cm, $f = 3$ Hz and $\tau = 50$ μ s showed the greatest effectiveness in inactivating all microorganisms under study. The results clearly indicate that the death of microorganisms caused by pulsed electric fields is related to the duration of the applied pulses and the consequent increase in the treatment time. When this parameter is increased, the inactivation of all microorganisms increased. The different combinations of initial temperature and flow rate applied did not cause any significant effect on inactivation. It was also found that microbial inactivation by PEF depends on the characteristics of the microorganisms since, for the same treatment conditions, *S. cerevisiae* was the most sensitive microorganism, followed by *E. coli*, which presented inactivation levels comparable to those of yeast. *L. salivarius* was the most resistant microorganism to the applied treatment conditions.

This work highlights the effects of some process variables on the inactivation of microorganisms, which can help to define more effective PEF treatments potentially causing greater microbial reduction. The work evidenced the difficulties in achieving high inactivation levels by applying low/moderate intensity PEF treatments without being combined with high initial temperatures or other types of antimicrobial treatments.

1. INTRODUÇÃO

As tecnologias de preservação de alimentos baseiam-se na prevenção do crescimento microbiano ou na inativação microbiana. Na maioria dos casos, os alimentos são preservados pela inibição da atividade microbiana por meio dos fatores que mais efetivamente influenciam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos, como a temperatura. O processamento térmico é uma tecnologia importante que tem sido amplamente utilizada na indústria alimentar para aumentar a vida útil e manter a segurança dos alimentos com baixos custos de processamento (Min *et al.*, 2007). No entanto, este tipo de tratamentos não só mata os microrganismos contaminantes, mas também pode influenciar negativamente o sabor, a cor e provocar perdas vitamínicas levando a uma perda de qualidade para o consumidor ao nível nutricional e sensorial (Jeyamkondan *et al.*, 1999). Nos últimos anos, várias tecnologias têm sido investigadas de modo a verificar a sua capacidade de inativar microrganismos em temperaturas mais baixas do que as normalmente utilizadas nos tratamentos térmicos convencionais permitindo aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, sem prejudicar as qualidades físicas, químicas e biológicas dando assim resposta à crescente procura por alimentos frescos e naturais por parte dos consumidores (Lado, Yousef, 2002).

Entre as várias tecnologias não térmicas emergentes, os campos elétricos pulsados (PEF) são uma das mais atraentes devido aos seus curtos tempos de tratamento e efeitos de aquecimento reduzidos. O tratamento PEF baseia-se na aplicação de pulsos elétricos de curta duração (μs – ms) a biomateriais de origem vegetal ou animal, ou suspensões de microrganismos colocadas entre dois eletrodos condutores dentro de uma câmara de tratamento. Como resultado, o material biológico é exposto a um campo elétrico cuja intensidade depende da voltagem entre os eletrodos, bem como da geometria e do espaço entre os mesmos. O impacto do PFE causa a permeabilização da membrana, também denominada de eletroporação, levando a um aumento da permeabilidade da mesma a iões e moléculas (Raso *et al.*, 2016). Dependendo da intensidade do tratamento aplicado a viabilidade da célula eletroporada pode ser preservada através da recuperação da integridade da membrana. Intensidades de

tratamento mais altas podem ser utilizadas para a inativação de microrganismos por degradação irreversível da membrana celular (Toepfl *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos de aplicação de PEF relacionadas com alimentos são baseadas na inativação de microrganismos indesejáveis. Vários grupos de investigação demonstraram já a inativação de alguns microrganismos em diferentes produtos alimentares líquidos como sumo de laranja e maçã, produtos à base de iogurte, bebidas carbonatadas, sopa de ervilha, leite desnatado e ovo líquido (Min *et al.*, 2007). Desenvolvimentos recentes têm permitido com sucesso a transferência de sistemas PEF de escala de laboratorial para aplicação industrial, sobretudo para o processamento de sumos de frutas e vegetais (Toepfl *et al.*, 2014). No entanto, a aplicação industrial desta tecnologia para inativação microbiana é ainda um desafio uma vez que existem vários aspetos a melhorar, que dificultam a sua comercialização para este fim. O desenvolvimento de sistemas PEF capazes de atender aos requisitos industriais atuais em termos de capacidade de processamento de altos volumes, regulamentação de segurança alimentar, confiabilidade a longo prazo e aspetos de custo são importantes para aumentar a utilização desta tecnologia a nível industrial (Pataro, Ferrari, 2020). Outras aplicações na área alimentar são a substituição de métodos convencionais de desintegração celular, como a trituração ou o tratamento enzimático ou como etapa de pré-tratamento para melhoria de transferência de massa antes da desidratação, extração ou prensagem (Toepfl *et al.*, 2014). A exploração comercial desta tecnologia na indústria alimentar parece ser, no momento, mais voltada para este tipo de aplicações uma vez que as mesmas requerem baixa ou moderada intensidade de tratamento tornando mais fácil a sua implementação (Pataro, Ferrari, 2020).

A tecnologia PEF tem potencial para otimizar a utilização de energia de maneira económica e eficiente, além da vantagem de fornecer alimentos microbiologicamente seguros e minimamente processados. A aplicação bem-sucedida da tecnologia PEF sugere um potencial substituto alternativo ao processamento térmico convencional de produtos alimentares líquidos.

1.1. Campos Elétricos Pulsados

1.1.1. Enquadramento Histórico e Desenvolvimentos

O interesse pelo uso de campos elétricos como tecnologia de conservação de alimentos teve o seu início no começo do século XX. Nas décadas de 1920 e 1930, um procedimento denominado “Electro-pure” foi uma das primeiras tentativas de usar campos elétricos na conservação de alimentos, neste caso para a pasteurização de leite. Este método era fundamentalmente um método térmico, do ponto de vista atual semelhante ao aquecimento óhmico, uma vez que o aquecimento gerado pela passagem direta da eletricidade através do alimento era o principal responsável pelo efeito letal nos microrganismos (Toepfl, 2006). No entanto, devido à baixa capacidade do sistema e à falta de equipamento adequado para ajuste e controle de temperatura, a tecnologia não se popularizou comercialmente na época (Altunakar, 2007).

Nas décadas de 1950 e 1960, um processo denominado tratamento electro-hidráulico mostrou-se eficaz na inativação de microrganismos. A inativação era obtida por meio de ondas de choque geradas por um arco elétrico após a aplicação pulsada de campos elétricos de elevada tensão (Sitzmann *et al.*, 2017). Apesar dos resultados iniciais terem sido promissores, este processo não foi desenvolvido ao ponto de poder ser usado para processar alimentos à escala industrial por causa dos níveis da contaminação dos alimentos tratados, devido à erosão dos elétrodos e da desintegração de partículas dentro dos alimentos causada pelas ondas de choque.

Inspirado nos trabalhos desenvolvidos anteriormente o engenheiro alemão Heinz Doevenspeck, começou em 1958 a desenvolver um equipamento, que usava pela primeira vez descargas definidas acumuladas por condensadores para gerar campos elétricos pulsados homogêneos. A formação, aplicação e impacto dos campos elétricos nas membranas celulares foram relatados pela primeira vez por Doevenspeck sendo por isso considerado por muitos o pai intelectual da tecnologia de campos elétricos pulsados (Sitzmann *et al.*, 2017). Os campos elétricos foram aplicados em sistemas dispersos de origem inorgânica ou orgânica para influenciar as membranas das células vegetais ou animais ou as

cargas superficiais das partículas. Rutura celular, crescimento e/ou morte de microrganismos, aceleração de processos de fermentação e tratamento de águas residuais foram identificados, descritos e patenteados por Doevenspeck já no início dos anos 1960 (Sitzmann *et al.*, 2017).

Na década de 1980, o interesse pela tecnologia PEF aumentou repentinamente entre as comunidades científicas com o objetivo de obter um método de preservação não térmica que reduziria as alterações indesejáveis induzidas pelo calor nos alimentos (Raso *et al.*, 2014). O número de grupos de pesquisa a trabalhar com a tecnologia PEF, paralelamente ao número de patentes depositadas para projetos específicos de câmaras de tratamento e equipamentos, aumentou rapidamente em todo o mundo. Nesta altura foram construídas as primeiras plantas à escala industrial e durante este período várias aplicações e mecanismos do processo foram identificados, modelados matematicamente e apresentados ao público científico pela primeira vez (Altunakar, 2007).

Uma das primeiras aplicações industriais da tecnologia PEF foi desenvolvida pela Krupp Mashinentechnik (Hamburgo, Alemanha), em parceria e tendo por base o trabalho desenvolvido por Doevenspeck. Surgia assim, no final dos anos 1980, o processo ELSTERIL® tendo como função a esterilização elétrica e pasteurização de meios eletricamente condutores e bombeáveis (Sitzman, 1990). Resultados bem sucedidos foram relatados a partir das primeiras aplicações e, portanto, a tecnologia PEF mostrava ser um tratamento promissor para alimentos líquidos. Em 1995 a PurePulse Technologies, uma subsidiária da Maxwell Laboratories (San Diego, EUA), desenvolveu os sistemas de processamento por campos elétricos pulsados CoolPure® para o tratamento antimicrobiano de líquidos e alimentos bombeáveis. No mesmo ano, a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) divulgou uma “carta de não objeção” para o uso de campos elétricos pulsados, aprovando assim a aplicação industrial da PurePulse Technologies. O reconhecimento por agências reguladoras permitiu novas implementações assim como um interesse crescente na tecnologia (Altunakar, 2007).

De 2000 até ao presente, grandes avanços foram alcançados em direção ao aumento da comercialização de equipamentos PEF para o processamento de

alimentos. No entanto, a reduzida quantidade de aplicações comerciais e economicamente viáveis limitou a exploração comercial do PEF na indústria alimentar (Raso *et al.*, 2014). A transferência de resultados bem-sucedidos de laboratório para escala industrial tem-se revelado uma tarefa difícil (Toepfl, 2006). Neste ponto, para provar a aplicabilidade da tecnologia PEF para uso industrial, os resultados laboratoriais devem atingir um certo nível de otimização para que o processo ganhe relevância (Altunakar, 2007).

Esforços na pesquisa através de grupos multidisciplinares são necessários para melhorar alguns aspetos fundamentais como a distribuição da intensidade do campo elétrico nas câmaras de tratamento de fluxo contínuo, para desenvolver sensores adequados para avaliar o processo, para identificar os microrganismos mais resistentes ao tratamento para cada alimento em específico e para obter uma melhor compreensão dos parâmetros críticos que afetam a inativação microbiana. Um conhecimento mais profundo destes aspetos é necessário para satisfazer as agências reguladoras e para aumentar a segurança e estabilidade dos alimentos sujeitos a este tipo de tratamento permitindo assim uma maior aplicabilidade ao nível industrial (Raso *et al.*, 2016).

1.1.2. Componentes do Sistema

A tecnologia PEF é baseada numa potência pulsante fornecida ao produto a tratar que se encontra colocado entre um conjunto de eléctrodos no interior duma câmara de tratamento. O equipamento consiste num gerador de pulsos de alta tensão que fornece energia na tensão seleccionada, uma câmara de tratamento com um sistema de bombeamento de fluidos adequado e dispositivos de monitorização e controlo necessários (Picart, Cheftel 2003) (Fig. 1). O produto é colocado na câmara de tratamento, em modo *batch* ou contínuo, onde dois eléctrodos são separados por um material não condutor para evitar o fluxo eléctrico de um para o outro. Pulsos eléctricos de alta tensão gerados são aplicados aos eléctrodos, que então conduzem o pulso eléctrico de alta intensidade ao produto colocado entre eles. O produto alimentar sofre uma força por unidade de carga,

o chamado campo elétrico, que é responsável pela rutura da membrana celular em microrganismos (Zimmermann, 1986).

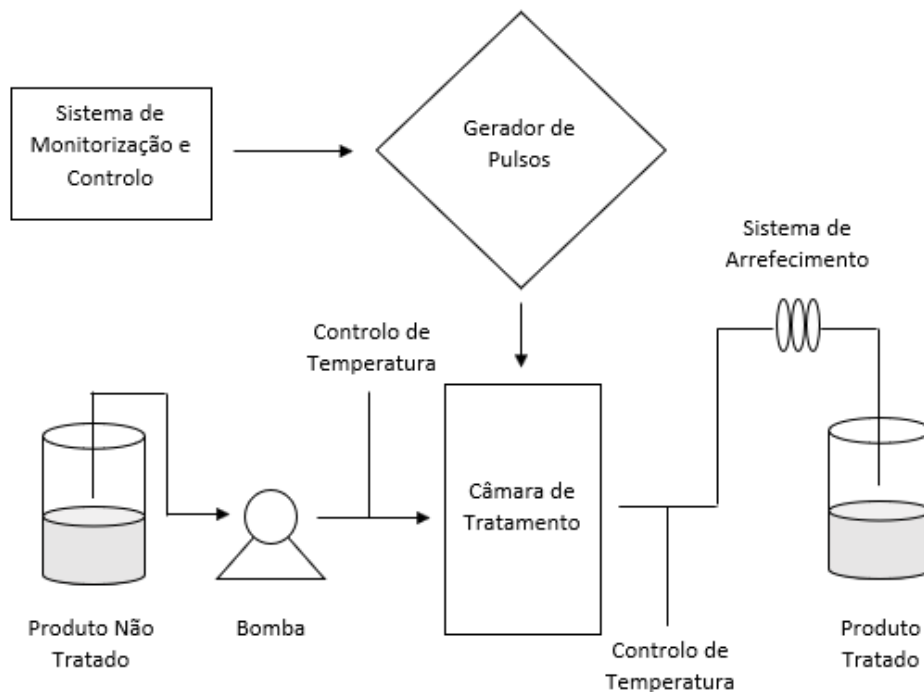


Figura 1: Componentes básicos do sistema PEF. (Adaptado de Mohamed, Eissa, 2012).

Um dos componentes mais importantes do sistema é a câmara de tratamento uma vez que a uniformidade do processo é altamente dependente do design da mesma (Mohamed, Eissa, 2012). Na câmara de tratamento o produto a tratar é exposto aos pulsos do campo elétrico. Esta é composta por pelo menos dois eléctrodos, um em alta tensão e outro no potencial de terra, separados por material isolante em diferentes configurações geométricas (Toepfl, 2006). Embora vários projetos diferentes tenham sido desenvolvidos, os tipos de câmara de tratamento mais utilizados apresentam eléctrodos em configuração paralela, configuração colinear e configuração coaxial (Picart, Cheffel, 2003) (Fig. 2). A configuração paralela é a geometria mais simples e consiste num ducto retangular de material isolante com dois eléctrodos em lados opostos. Esta configuração é normalmente utilizada em modo *batch* e confere um campo eléctrico uniforme na zona de tratamento (Mohamed, Eissa, 2012). Numa câmara

coaxial, o produto flui entre dois elétrodos cilíndricos concêntricos. Devido à geometria radial, a intensidade do campo através do espaço entre os elétrodos não é uniforme e diminui progressivamente do elétrodo interno para o externo (Picart, Cheftel 2003). A câmara de tratamento colinear consiste num tubo eletricamente isolante através do qual o produto flui. Em torno da câmara de tratamento encontram-se os elétrodos. A secção circular de configuração colinear facilita a sua instalação nas tubagens utilizadas na indústria (Raso *et al.*, 2014). Em contraste com as câmaras coaxiais as câmaras de tratamento colineares têm uma área de elétrodo mais reduzida e, portanto, apresentam uma alta resistência à carga elétrica, permitindo que o gerador de pulsos opere com correntes mais baixas. Embora as câmaras coaxiais e colineares não forneçam uma distribuição homogênea da intensidade do campo elétrico e consequentemente distribuição da temperatura na câmara de tratamento durante o processamento, em contraste com os sistemas paralelos, são bem adequadas para o modo de operação contínuo (Picart, Cheftel, 2003).

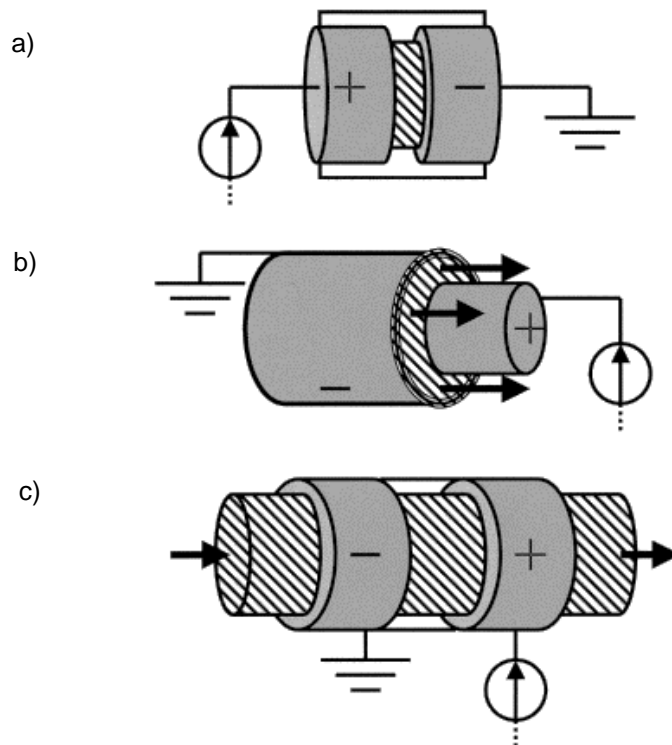


Figura 2: Configurações de câmaras de tratamento para tratamento PEF em modo contínuo: a) Configuração paralela, b) Configuração Coaxial c) Configuração Colinear. (Picart, Cheftel, 2003).

Quando a força dos campos elétricos aplicados excede a força do campo elétrico do produto tratado ocorre a quebra dielétrica do produto. Este é um dos conceitos mais importantes a ser considerado na projeção de câmaras de tratamento. A quebra dielétrica dos alimentos é geralmente caracterizada por causar danos nas superfícies dos elétrodos, levando a explosões da câmara de tratamento e formação de bolhas de gás. Além de ter em conta as características elétricas do produto a tratar a homogeneidade do campo elétrico é um ponto crítico na projeção de uma câmara de tratamento em termos de consumo de energia e baixo aquecimento do produto (Mohamed, Eissa, 2012).

1.2. Variáveis do Processo

1.2.1. Intensidade do Campo Elétrico (E)

A intensidade do campo elétrico depende da tensão aplicada entre os elétrodos, geometria da câmara de tratamento e distribuição espacial das propriedades dielétricas do material a tratar (Raso *et al.*, 2016), sendo um dos fatores de maior influência em tratamentos PEF que visam a inativação microbiana.

Quando a influência deste parâmetro é analisada, é necessário considerar tanto a intensidade quanto a distribuição do campo elétrico no interior da câmara de tratamento. A distribuição da intensidade do campo elétrico dentro da câmara de tratamento deve ser o mais homogênea possível para permitir ter uma noção exata da intensidade real aplicada assim como para garantir que todo o produto é sujeito ao mesmo nível de tratamento (Raso *et al.*, 2016). Uma distribuição não uniforme da intensidade do campo elétrico na câmara de tratamento resulta em tratamentos heterogêneos que levam a que subpopulações de células sujeitas a uma menor intensidade de campo elétrico resistam ao tratamento (Mañas *et al.*, 2001). A distribuição da intensidade do campo elétrico depende sobretudo das características da câmara de tratamento, como o formato dos elétrodos, tamanho e formato da câmara, etc. (Álvarez *et al.*, 2006).

1.2.2. Formato e Tamanho do Pulso (τ)

Embora muitos formatos de pulso sejam aplicáveis à tecnologia PEF, as formas de pulso mais utilizadas são os pulsos de onda quadrada e os pulsos de decaimento exponencial (Toepfl, 2006) (Fig. 4). A maior utilização destas duas formas deve-se sobretudo a uma maior facilidade de projeção do sistema gerador do pulso assim como à sua eficácia na inativação de microrganismos (Altunakar, 2007).

Para fins de inativação microbiana os pulsos de onda quadrada apresentam superioridade em relação aos pulsos de decaimento exponencial sendo que esta deve-se à uniformidade da intensidade do campo elétrico durante cada pulso. Quando a tensão máxima é aplicada no caso de pulsos de onda quadrada, a intensidade do campo elétrico permanece constante durante a duração do pulso. Nos pulsos de decaimento exponencial, a tensão aumenta exponencialmente para um pico e diminui para zero e, portanto, o seu efeito na inativação de microrganismos é mais reduzido, contribuindo ainda para um maior aquecimento e desperdício energético (Altunakar, 2007).

O tamanho do pulso é definido como o tempo em que a intensidade do campo elétrico máxima é mantida para pulsos de onda quadrada ou o tempo até à perda de 37% da intensidade máxima para pulsos de decaimento exponencial (Toepfl, 2006) (Fig. 3).

Pulsos mais curtos aplicados com intensidades de campo elétrico elevadas são, regra geral, mais eficazes na inativação de microrganismos do que pulsos mais longos aplicados com intensidades de campo elétrico mais reduzidas (Álvarez *et al.*, 2006). Além disso, pulsos mais curtos oferecem outras vantagens, como menor efeito Joule e redução na migração de compostos dos elétrodos para o meio de tratamento ou na formação de espécies químicas (Álvarez *et al.*, 2006). Em termos de polaridade, os pulsos podem ser monopolares ou bipolares. Os pulsos monopolares são apenas pulsos positivos, os bipolares consistem num pulso positivo e um negativo libertados de forma intercalada (Altunakar, 2007). Em termos de polarização, os pulsos bipolares são mais eficientes do que os pulsos monopolares. Uma reversão repentina da orientação do campo elétrico aplicado alterará a direção do movimento dos grupos carregados na membrana celular. O stress alternado produzido pelos pulsos bipolares resulta em maiores

danos estruturais para a membrana e numa maior suscetibilidade da membrana celular à quebra dielétrica (Jeyamkondan *et al.*, 1999)

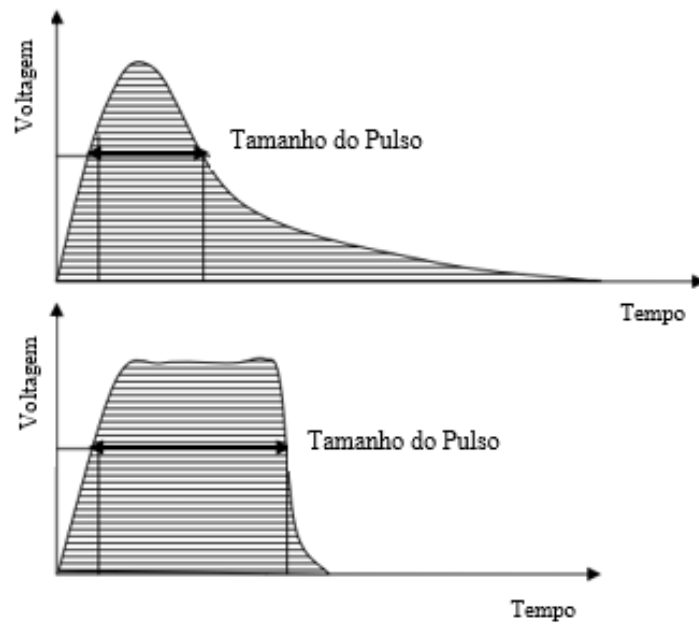


Figura 3: Tamanho de pulso efetivo de pulsos de decaimento exponencial e quadrados. (Adaptado de Góngora-Nieto *et al.*, 2002).

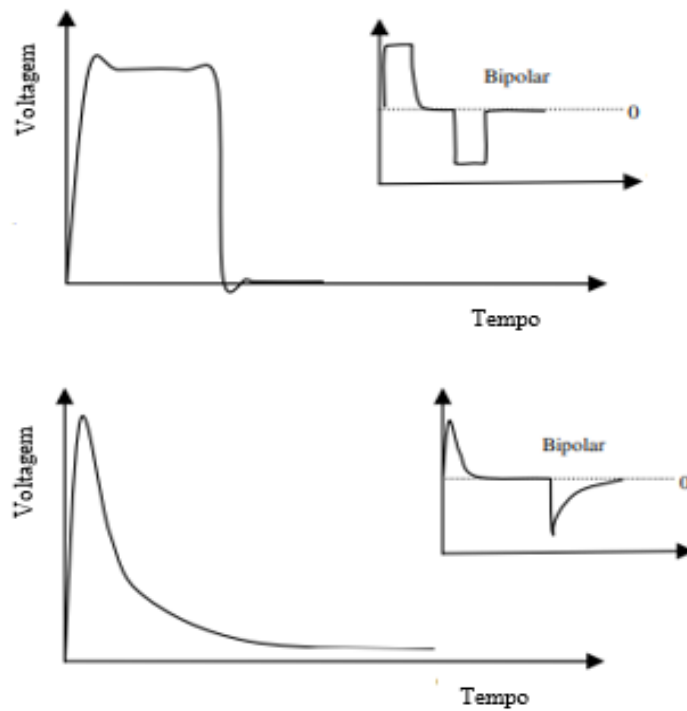


Figura 4: Formatos de pulso mais utilizados na tecnologia PEF: (a) Pulso decaimento exponencial, (b) Pulso quadrado. (Adaptado de Raso *et al.*, 2016).

1.2.3. Tempo de Tratamento (t)

O tempo de tratamento pode ser definido como o tempo efetivo durante o qual os microrganismos são submetidos ao campo elétrico. Depende do número e do tamanho dos pulsos aplicados. Este parâmetro juntamente com a intensidade do campo elétrico são os fatores de maior influência na inativação de microrganismos em tratamentos PEF (Maged, Ayman, 2012).

1.2.4. Energia Específica (W)

A energia específica consiste na energia elétrica de alta tensão aplicada por unidade de massa. Este parâmetro permite avaliar os custos energéticos do processo de PEF e, conseqüentemente, comparar a eficiência do tratamento de PEF com outras tecnologias (Raso *et al.*, 2016). Como toda a energia elétrica fornecida para a câmara de tratamento é dissipada como calor e o tempo de residência do produto na câmara de tratamento é inferior a 1 s, este parâmetro permite também estimar o incremento da temperatura do produto a tratar como consequência do tratamento. A energia específica depende da tensão aplicada, largura de pulso e resistência da câmara de tratamento, que variam de acordo com a geometria e condutividade do material tratado. De um modo geral o aumento da energia específica provoca um incremento na inativação microbiana (Raso *et al.*, 2014)

1.2.5. Frequência (f)

A frequência indica o número de pulsos aplicados por unidade de tempo. A especificação da frequência de pulso é importante, pois determina a quantidade de energia elétrica fornecida por unidade de tempo no produto colocado na câmara de tratamento, o que, por sua vez, afeta o aumento de temperatura do produto a tratar devido ao efeito Joule (Raso *et al.*, 2016). Aumentos da frequência de pulso, podem provocar elevados aumentos de temperatura,

portanto, pode existir a necessidade de implementação de um sistema de refrigeração a fim de reduzir possíveis efeitos térmicos indesejáveis (Toepfl *et al.*, 2014).

1.2.6. Temperatura (T)

Embora o tratamento PEF seja uma tecnologia não térmica, existe um inevitável aumento de temperatura durante o tratamento devido ao efeito Joule. Este aumento de temperatura depende sobretudo de dois fatores, tamanho do pulso e frequência. Em ambos os casos quanto maior o tamanho do pulso e a frequência aplicada maior será a temperatura no final do processo (Maged, Ayman, 2012).

Efeitos térmicos adicionais podem ocorrer no caso de aplicação de altas quantidades de energia total, controlo de temperatura insuficiente e *design* da câmara de tratamento inadequado. A distribuição não homogénea do campo elétrico no interior da câmara de tratamento, provocando a ocorrência de picos de temperatura no interior da mesma, velocidades de fluxo limitadas e a recirculação do meio devem também ser considerados como fatores de impacto térmico (Jäger, 2010). Simulações numéricas do processo utilizando a dinâmica de fluidos computacional ganham crescente interesse para esse fim, uma vez que a medição experimental não é possível na maioria dos casos devido às pequenas dimensões da câmara de tratamento, bem como à interferência do dispositivo de medição no fluxo do produto e no campo elétrico. O controlo de temperatura adquire particular importância ao analisar os efeitos do tratamento PEF na funcionalidade de compostos termossensíveis, como proteínas, ou ao realizar estudos de cinéticas de inativação térmica (Jäger, 2012).

Por outro lado, temperaturas moderadas (25 °C-50 °C) têm um efeito altamente sinérgico na eficácia do tratamento (Min *et al.*, 2007). A aplicação de PEF combinados com temperaturas de processamento não letais afeta significativamente a fluidez e estabilidade da membrana celular (Jäger, 2012). Enquanto a baixas temperaturas a estrutura da bicamada fosfolipídica da membrana celular se apresenta numa fase mais ordenada, formando a fase

lamelar sólido-cristalina ou fase gel, com o aumento da temperatura a membrana é aquecida e passa pela temperatura de transição, temperatura na qual ocorre uma mudança radical no seu estado físico, os fosfolípidos sofrem uma transição para uma fase lamelar líquido-cristalina ou fase fluida, caracterizada por um aumento da fluidez da membrana levando a uma redução da estabilidade da mesma facilitando o processo de eletroporação (Jäger, 2012).

O efeito sinérgico da temperatura durante a inativação de microrganismos por PEF pode ser usado para melhorar os resultados da inativação assim como para reduzir os custos inerentes ao processo. A poupança de energia deriva da menor intensidade do tratamento (tempo de tratamento e consumo total de energia específica) necessária para atingir um determinado nível de inativação microbiana e a um aumento da temperatura e da possibilidade de recuperar a energia elétrica dissipada durante o tratamento em forma de energia térmica para pré-aquecimento do produto a tratar (Jäger, 2010). O tratamento com PEF em combinação com calor moderado fornece um potencial para reduzir a carga térmica total. Uma redução da carga térmica pode ser usada para melhorar a retenção de compostos bioativos sensíveis ao calor, manter as características dos produtos a tratar e para preservar a integridade do equipamento aumentando o seu tempo de vida (Jäger, 2012).

Ao aplicar os conceitos de tratamento, considerando o efeito sinérgico do PEF e da temperatura, é de extrema relevância executar um controlo de temperatura adequado para limitar os efeitos térmicos negativos em compostos sensíveis ao calor. Além disso, são necessárias abordagens analíticas para quantificar a contribuição da intensidade do campo elétrico e os efeitos térmicos nos resultados gerais da inativação (Jäger, 2012).

1.3. Variáveis do Produto

1.3.1. Condutividade Elétrica

Um dos parâmetros mais significativos em tratamentos com PEF no que respeita às características do produto é a condutividade elétrica. Ao inverso da resistência elétrica a condutividade elétrica é uma medida da capacidade de um determinado material conduzir corrente elétrica através dele. Em termos de tratamento com PEF, altas condutividades são contraproducentes, uma vez que a intensidade do campo elétrico aplicado terá que ser menor e, conseqüentemente, é mais difícil atingir a intensidade do campo elétrico crítica (E_c) para a permeabilização celular e respetiva inativação microbiana. Por outro lado, em meios com maior força iónica a membrana será enfraquecida e mais suscetível a um pulso elétrico externo, causando maior permeabilidade e mais alterações estruturais (Toepfl *et al.*, 2014).

Condutividade elétrica e força iónica estão intimamente relacionadas. Quanto maior a concentração de iões contidos no meio, maior é a sua condutividade. Além disso, a condutividade depende também da temperatura, sendo que aumentos de temperatura provocam um aumento da condutividade elétrica (Reineke *et al.*, 2015) em virtude do aumento da mobilidade dos iões na solução (Altunakar, 2007). Por estas razões deve ser tida em conta a interdependência da condutividade elétrica com a força iónica e temperatura de modo a que a conjugação destes fatores se encontre a um nível ideal para garantir a eficácia do tratamento.

1.3.2. pH

A influência do pH na inativação microbiana em tratamentos com PEF é ainda pouco clara. Pesquisas publicadas indicam que a resistência microbiana ao PEF varia consideravelmente dependendo do pH do meio de tratamento e que uma variação do pH do meio de tratamento pode aumentar, reduzir ou não ter efeito na modificação da sensibilidade microbiana aos PEF (Wouters, *et al.*, 2001). Geralmente, os microrganismos Gram-positivos são mais resistentes aos PEF

em meios com pH neutro do que em condições ácidas, e os Gram-negativos são mais resistentes em meios com pH baixo do que em condições neutras (Raso *et al.*, 2014).

O mecanismo que explica completamente essas diferenças ainda não foi elucidado. Supõe-se que a maior sensibilidade em meios ácidos possa estar relacionada a uma alteração na capacidade da célula de manter um gradiente de pH transmembranar devido à eletroporação da membrana. As alterações ao nível da membrana prejudicam a homeostasia do pH, o que poderá modificar o pH intracelular, afetando assim os principais componentes da célula (DNA, RNA, enzimas etc). Esse mecanismo explicaria a maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas nos meios ácidos, mas não o comportamento mostrado pelos Gram-negativos. Para este grupo bacteriano, as membranas externas das células podem atuar como uma barreira protetora ou determinar uma configuração de membrana mais estável em meio ácido que induz a uma maior resistência aos PEF (Pagán, Mañas, 2006).

1.3.3. Atividade de Água

A influência da atividade da água do meio de tratamento na inativação microbiana foi pouco investigada e o efeito do tipo de soluto usado para a reduzir não é claro. No geral, a resistência microbiana a diferentes tratamentos ou agentes de inativação é maior quanto menor atividade da água (Wouters, *et al.*, 2001). Este efeito foi explicado por uma redução do volume celular e/ou mudanças na espessura, permeabilidade e fluidez da membrana microbiana. Quando os microrganismos são transferidos para um ambiente com baixa a_w , a água sai da célula o que resulta numa redução do volume celular que aumentaria a resistência aos PEF. Além disso, o encolhimento celular provavelmente poderia causar um espessamento da membrana celular, seguido de uma redução da permeabilidade e fluidez da membrana. Essa menor fluidez também pode influenciar a maior resistência aos PEF em um nível reduzido de a_w (Raso *et al.*, 2014).

1.4. Características do Microrganismos

1.4.1. Tipo de Microrganismo

Foi demonstrado que os tratamentos de PEF inativam células vegetativas bacterianas, fungos e leveduras (Wouters *et al.*, 2001), mas os esporos bacterianos são resistentes aos tratamentos com PEF. Em geral, tem sido relatado que as leveduras são os microrganismos mais sensíveis ao PEF, e os Gram-positivos são mais resistentes que as bactérias Gram-negativas (Pagán, Mañas, 2006). Basicamente, as diferenças das estruturas mais externas dos esporos e células vegetativas explicaria as diferenças na resistência ao PEF. Os esporos bacterianos são resistentes ao PEF provavelmente porque o córtex e outras camadas externas do endósporo, que envolve a membrana citoplasmática, impede o efeito de permeabilização provocada pelo PEF (Álvarez *et al.*, 2006). No entanto, parece que a resistência microbiana intrínseca é mais importante do que o efeito das características microbianas na determinação da sensibilidade microbiana ao PEF. Quando a resistência ao PEF de diferentes microrganismos é comparada nas mesmas condições experimentais, observa-se que algumas células de levedura são mais resistentes ao PEF do que algumas bactérias, alguns microrganismos Gram-positivos são mais sensíveis do que alguns microrganismos Gram-negativos e algumas espécies de levedura e algumas bactérias bastonetes são mais resistentes do que algumas bactérias cocos (Raso *et al.*, 2014).

1.4.2. Tamanho e Formato das Células

A resistência microbiana intrínseca também parece estar fortemente relacionada com o tamanho e formato das células. Estes fatores seriam responsáveis não apenas pelas diferentes sensibilidades de diferentes microrganismos, mas também pela de estirpes do mesmo microrganismo (Álvarez *et al.*, 2006). A indução de campos elétricos nas membranas celulares é maior quando células maiores são expostas ao tratamento com PEF. Entre as espécies microbianas,

as leveduras são geralmente mais suscetíveis à inativação com PEF do que as células bacterianas, provavelmente devido ao seu tamanho maior, enquanto as espécies gram-positivas são mais resistentes que as espécies gram-negativas (Altunakar, 2007). A influência do tamanho e da forma das células no efeito letal dos PEF tem sido relacionada com o potencial transmembranar criado pelas forças externas do campo elétrico. Quanto menor o tamanho da célula, menor o valor do potencial induzido na membrana por um campo elétrico externo e maior a resistência microbiana ao tratamento (Álvarez *et al.*, 2006).

1.4.3. Condições de Cultura

Em relação às condições de cultura, como fase de crescimento, composição do meio de cultura, temperatura de crescimento ou exposição celular a diferentes condições de stress, ainda pouco se sabe. De uma forma geral foi demonstrado que as células bacterianas na fase de crescimento exponencial são mais sensíveis ao tratamento com PEF do que as células em fase estacionária (Pagán, Mañas, 2006). Essa maior sensibilidade microbiana pode estar relacionada a uma maior instabilidade eletromecânica dos microrganismos devido à divisão celular contínua nessa fase de crescimento e ao maior tamanho das células. Numa cultura em crescimento, observa-se que as células se alongam e formam uma partição que eventualmente separa a célula em duas células filhas. Para as leveduras, foi levantada a hipótese de que, durante a fase exponencial, a área entre as células mãe e filha é mais suscetível aos efeitos do campo elétrico (Álvarez *et al.*, 2006).

A temperatura da cultura também influencia a resistência microbiana aos PEF. Os dados relatados indicam que as células que crescem a temperaturas inferiores à ideal são mais sensíveis aos tratamentos com PEF do que aquelas cultivadas na temperatura ideal (Álvarez *et al.*, 2006). A fluidez da membrana está significativamente relacionada com a composição lipídica. Sabe-se que a temperatura de crescimento induz alterações na membrana celular ou na composição da parede celular, como variações no comprimento da cadeia de ácidos gordos, na proporção de ácidos gordos saturados e insaturados, ou na presença de ácidos gordos com anéis ciclopropano nas membranas das células.

As membranas bacterianas mostram a capacidade de se adaptar às mudanças na temperatura de crescimento, mantendo uma fluidez adequada, a fim de manter a funcionalidade da mesma. Como a instabilidade eletromecânica das membranas celulares está diretamente envolvida na resistência microbiana aos PEF, essas alterações na composição podem ser responsáveis pelas diferenças na resistência observada (Pagán, Mañas, 2006).

1.5. Inativação Microbiana por Campos Elétricos Pulsados

1.5.1. Mecanismos de Eletropermeabilização

O efeito primário dos PEF nas células está relacionado com alterações estruturais locais e ruptura da membrana celular. A membrana celular é um componente vital para as células uma vez que protege o microrganismo das condições ambientais circundantes. Ao manter um limite osmótico eficaz entre a célula e o ambiente envolvente, a membrana celular controla as atividades metabólicas da célula. Atua também como uma barreira semipermeável, isto é, controla a passagem de nutrientes para a célula e a passagem de produtos finais das atividades metabólicas para fora da mesma (Toepfl *et al.*, 2014).

Quando as células são submetidas a um campo elétrico externo as cargas elétricas acumulam-se nas áreas interiores e exteriores da membrana. A acumulação de cargas negativas e positivas na membrana celular provoca um potencial transmembranar significativamente aumentado. Nessas áreas, o potencial é muito intenso levando à formação de poros que tornam a membrana permeável (eletroporação) (Min *et al.*, 2007).

Quando uma célula é exposta a um campo elétrico externo, os efeitos da eletroporação podem ser divididos em quatro etapas principais: (1) aumento do potencial transmembranar devido à acumulação de cargas na membrana celular pelo campo elétrico externo aplicado. (2) início da formação de poros (3) aumento do número e tamanho dos poros formados anteriormente. (4) estágio pós-tratamento. Após o tratamento elétrico pode ocorrer a libertação de

compostos intracelulares, entrada de substâncias extracelulares, vedação dos poros entre outros processos (Saulis, 2010).

A elucidação da permeabilização da membrana pelo processo de eletroporação é uma tarefa difícil, pois a sequência temporal de formação de poros está na faixa dos nanossegundos ou microssegundos e a área de formação de poros representa apenas 0,1% da superfície total da membrana (Pagán, Mañas, 2006). A informação disponível sobre a sequência temporal e a dinâmica do processo de eletroporação, bem como relativamente às mudanças estruturais das células durante e após os tratamentos com PEF ainda é reduzida (Min *et al.*, 2007). Diferentes modelos foram sugeridos para explicar o processo de eletroporação, estes modelos podem ser divididos em dois grupos: os modelos eletromecânicos (Dimitrov, 1984; Zimmermann, 1986; Crowley, 1973; Zimmermann *et al.*, 1974; Weaver, Chizmadzhev, 1996; Barbosa-Canovas *et al.*, 1999) e os modelos de reorientação molecular (Sale, Hamilton, 1967; Abidor *et al.*, 1979; Glaser *et al.*, 1988; Tsong, 1991; Saulis, Venslauskas, 1993; Joshi *et al.*, 2002).

Os modelos eletromecânicos consideram a membrana celular um condensador que acumula cargas elétricas e que é preenchido com um material dielétrico de uma constante dielétrica muito baixa em comparação com o interior da célula e o meio exterior. Devido à diferença nas constantes dielétricas, cargas livres acumulam-se em ambas as superfícies da membrana, gerando um potencial transmembranar (Pagán, Manãs, 2006). Manter o potencial transmembranar é vital para as células, pois este é usado para dirigir uma variedade de processos ligados à obtenção de energia por parte das mesmas.

Quando um campo elétrico externo é aplicado, o potencial transmembranar aumenta porque mais cargas livres se acumulam nas superfícies exterior e interior da membrana. Essas cargas são opostas e tendem a atrair-se, resultando numa compressão da membrana e, portanto, a sua espessura é reduzida. Por outro lado, forças viscoelásticas opõem-se à electro-compressão da membrana. No entanto, quando o potencial transmembranar atinge aproximadamente 1 V, as forças electro-compressivas excedem as propriedades viscoelásticas da membrana e ocorre a quebra dielétrica da membrana e esta torna-se permeável (Pagán, Manãs, 2006). O potencial transmembranar induzido por um campo elétrico externo depende da intensidade do campo elétrico externo, do tempo de

tratamento e do tamanho da célula assim como da forma e composição da membrana. O nível mínimo de intensidade do campo elétrico externo necessário para aumentar o potencial transmembranar e causar a formação de poros é definido como a intensidade do campo elétrico crítica (E_c), que depende das características das células e membranas mencionadas anteriormente (Rubinsky, 2009). Um aumento da intensidade do campo elétrico externo para além do E_c ou o aumento tempo de tratamento aumentará o tamanho e o número de poros da membrana e ocorrerá uma quebra irreversível, que está associada à destruição mecânica da membrana e morte celular (Fig. 5) (Weaver, 1995).

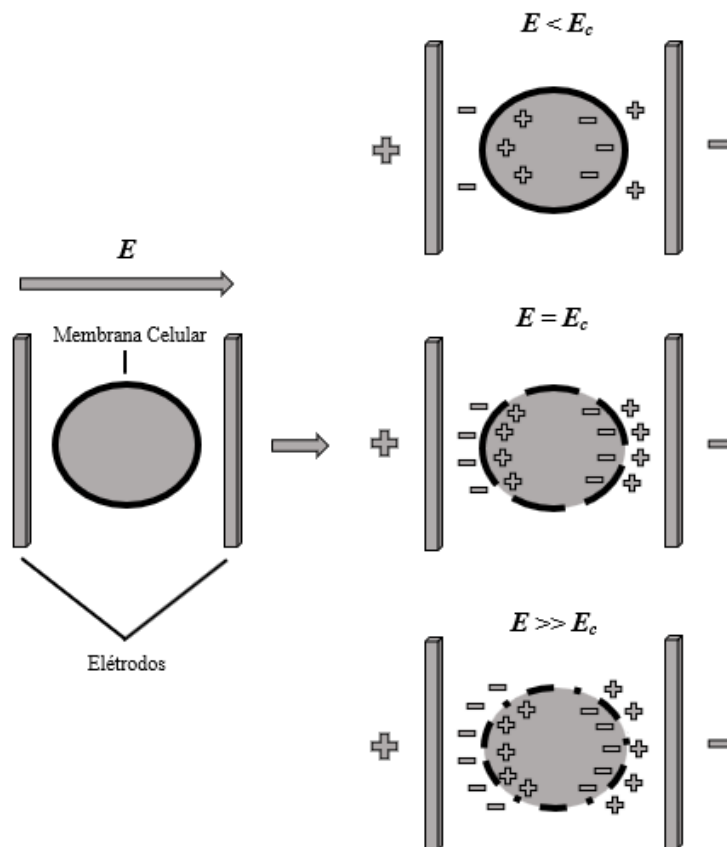


Figura 5: Eletroporação da membrana celular por PEF segundo os modelos eletromecânicos. (Adaptado de Pagán, Mañas, 2006).

Os modelos de reorientação molecular sugerem que a formação de poros se deve à ocorrência de reorientações moleculares na bicamada fosfolipídica ou nos canais proteicos que levam à formação de poros hidrofílicos (Pagán, Manãs, 2006).

O início do processo é baseado na evolução de pequenos poros hidrofóbicos que são formados naturalmente na membrana fosfolipídica devido a flutuações térmicas (Toepfl *et al.*, 2014). No entanto, quando sujeitos à ação de um campo elétrico externo, os poros hidrofóbicos podem ser transformados em poros hidrofílicos (Min *et al.*, 2007). Quando o raio do poro (r_p) excede um raio crítico (r_c), os poros hidrofóbicos tornam-se hidrofílicos, porque é necessária menos energia para manter essa estrutura, tornando-a mais estável nessas condições (Fig. 6). O aumento do potencial transmembranar e o aumento da temperatura devido ao efeito Joule durante a aplicação do tratamento com PEF levam a uma redução na energia necessária para os poros se formarem, o seu número e tamanho aumentam e o r_c é reduzido (Toepfl, *et al.*, 2014). A formação de poros também pode acontecer devido a defeitos estruturais na membrana que consistem em poros espontâneos que se expandem quando o campo elétrico excede o potencial transmembranar crítico (Tsong, 1991). Segundo estes modelos, a acumulação e a expansão de poros hidrofílicos são responsáveis pela eletroporação.

O efeito da eletroporação pode ser a formação de poros hidrofílicos na bicamada fosfolipídica, mas o campo elétrico externo pode também afetar os canais proteicos presentes na membrana (Toepfl *et al.*, 2014). A funcionalidade das proteínas transmembranares que formam os canais iônicos depende do potencial transmembranar. O potencial de abertura e fecho dos canais formados pelas proteínas é consideravelmente menor do que o potencial transmembranar crítico. Portanto, quando um tratamento com PEF é aplicado, a maioria dos canais proteicos é aberto. Novamente, o efeito Joule ou outras modificações elétricas podem ocorrer e os canais de proteicos podem tornar-se irreversivelmente desnaturados, resultando na formação de poros (Pagán, Manãs, 2006).

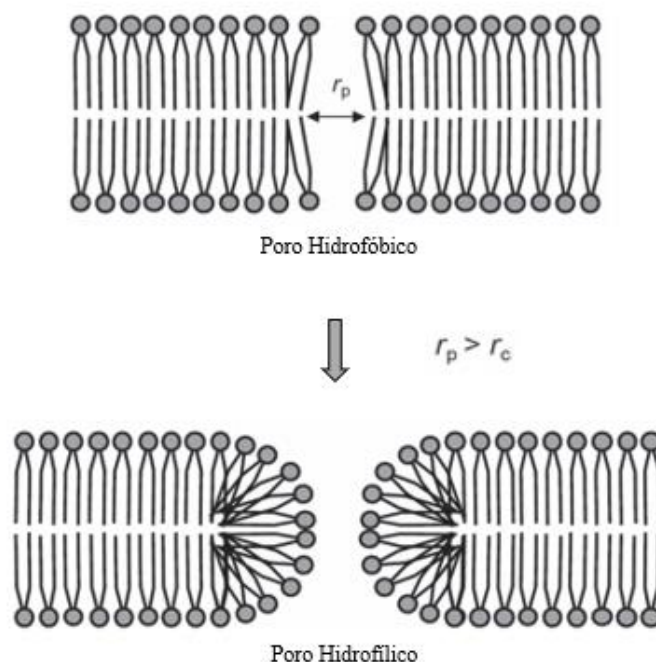


Figura 6: Representação esquemática da formação de poros hidrofílicos na membrana celular (Adaptado de Toepfl *et al.*, 2014).

Dependendo da intensidade do tratamento, a eletroporação de membrana leva a uma formação de poros que pode ser reversível ou irreversível. Se a eletroporação é reversível ou irreversível, depende de vários fatores, como o E_c , número de pulsos, tamanho do pulso, frequência e vários outros fatores relacionados com as características da célula, como o seu tamanho e forma, potencial transmembranar, etc. (Pagán, Manãs, 2006).

A eletroporação reversível ocorre quando o campo elétrico aplicado atinge valores próximos ao E_c ou quando o tempo de tratamento é curto. Nestes casos o número e o tamanho dos poros gerados são reduzidos (Pagán, Manãs, 2006). Trata-se, na verdade, de um estado temporário de alta condutibilidade entre os meios extra e intracelulares, uma vez que a população de poros criada durante o tratamento entra em colapso e a membrana celular restaura a sua estrutura e funcionalidade (Weaver, 1995). A eletroporação reversível é já amplamente utilizada nas áreas da biotecnologia e biologia molecular sobretudo na transformação de microrganismos (Maged, *et al.*, 2012).

Quando tratamentos PEF mais intensos são aplicados, o número de poros e o seu tamanho aumentam, resultando numa eletroporação irreversível (Pagán, Manãs, 2006). Este processo leva à morte celular, principalmente quando os campos elétricos causam permeabilização permanente da membrana e a consequente perda de homeostase celular. A eletroporação irreversível tem sido alvo de um crescente interesse devido à sua eficiência como método não térmico com potencial de aplicação na esterilização de alimentos, tratamentos farmacêuticos e em várias aplicações médicas (Golberg, *et al.*, 2010).

O efeito de um campo elétrico externo na célula biológica pode ser analisado de um ponto de vista qualitativo, ou seja, permeabilização reversível e irreversível, e de um ponto de vista quantitativo (grau de permeabilização da membrana) (Jäger, 2012). A distinção desses dois níveis é particularmente importante para os conceitos de eletroporação reversível e irreversível. Por exemplo, é na membrana que o transporte molecular ocorre através de uma população dinâmica de poros. A eletroporação pode ser reversível ao nível da membrana, mas o grande transporte molecular pode levar a um stress químico significativo entre os volumes intra e extracelular podendo originar um desequilíbrio químico significativo. Se esse desequilíbrio for muito grande, a recuperação poderá não ocorrer, com a morte celular a ser o resultado, sendo este evento secundário ao nível da célula que leva à eletroporação celular irreversível (Weaver, 1995). Por outro lado, a eletroporação de 100% das células durante a aplicação do pulso elétrico pode não acontecer. Mesmo que sejam aplicadas tensões na faixa da eletroporação irreversível não é garantido que todas as células percam a viabilidade (Lelieveld *et al.*, 2007). A permeabilização das membranas celulares pode ser influenciada por parâmetros como, a orientação espacial aleatória dos microrganismos, a diversidade de tamanhos das células assim como uma má definição das variáveis do processo (Jeyamkondan *et al.*, 1999). Como consequência, frações celulares lesadas sub-letalmente podem recuperar a sua integridade estrutural devido à capacidade da membrana reconstruir a sua estrutura levando a que uma determinada célula sobreviva e prolifere após o tratamento, fazendo com que o processo não seja totalmente eficiente (Golberg *et al.*, 2010).

1.6. Aplicação de Campos Elétricos Pulsados na Indústria Alimentar

A maior parte das aplicações da tecnologia PEF na indústria alimentar está relacionada com a inativação de microrganismos indesejáveis (Nowosad *et al.*, 2021). O efeito letal dos PEF foi demonstrado numa ampla variedade de microrganismos vegetativos deteriorantes, bem como espécies patogénicas. Os microrganismos são inativados através do princípio físico da eletroporação, como resultado, a carga térmica é baixa, proporcionando grandes vantagens de qualidade no que diz respeito ao sabor, cor e teor de vitaminas. O PEF é maioritariamente aplicado a produtos líquidos e semissólidos que podem ser bombeados facilmente e são menos propensos ao fenómeno de rutura dielétrica. A capacidade para atingir níveis de redução microbiana desejáveis em vários produtos alimentares, como sumos de frutas ou vegetais, leite, cerveja e vinho foi comprovada. A tecnologia PEF já se encontra a ser utilizada com sucesso por vários fabricantes na Europa, Ásia e EUA para o mercado de produtos *premium* (Siemer *et al.*, 2018).

Apesar da inativação de microrganismos ser o foco principal da utilização de PEF a nível industrial existem várias outras aplicações. Por exemplo, na indústria de processamento de batata a aplicação de PEF leva à perda de pressão celular interna (turgor) e ao aumento da permeabilidade da membrana. Da implementação desta tecnologia advêm vantagens no que diz respeito ao processamento e à qualidade do produto (Min *et al.*, 2007). A modificação estrutural induzida permite economia de energia e menos desperdício de produto bruto. Batatas tratadas com PEF apresentam uma cor mais uniforme e absorvem menos óleo durante a fritura. Outro efeito do PEF é provocar a formação de uma textura mais macia que facilita o processamento da batata, nomeadamente o corte. Em 2018, a nível mundial, mais de 50 unidades PEF eram utilizadas a nível industrial no processamento de batata (Siemer *et al.*, 2018).

Também na área da secagem é possível reduzir os consumos de energia, melhorar a preservação estrutural e obter um sabor mais intenso de diversos produtos hortofrutícolas. O pré-tratamento da amostra com PEF a fim de destruir a estrutura celular reduz a sua resistência à difusão e as taxas de transferência de massa entre as células e o meio exterior aumentam permitindo uma

otimização do processo de secagem em relação à temperatura e ao tempo (Picart, Cheftel 2003).

Outra aplicação da tecnologia PEF é a sua utilização em processos de extração para a obtenção de compostos de interesse que geralmente envolvem o tratamento químico e/ou térmico da amostra. Numerosos estudos relatam que a aplicação de PEF no processo de extração pode aumentar a sua eficiência, reduzir o tempo de extração e minimizar qualquer dano ao material extraído (Nowosad *et al.*, 2021). Por exemplo, as películas e grânhas de uva são por vezes fermentadas com o sumo para extrair a cor vermelha causada pela presença de antocianinas e polifenóis. Com o pré-tratamento com PEF do mosto, os pigmentos e polifenóis separam-se mais fácil e rapidamente das células (Siemer *et al.*, 2018). Como resultado, esta etapa do processo pode ser reduzida em vários dias permitindo também a obtenção de vinhos com alto teor de compostos fenólicos (Nowosad *et al.*, 2021).

1.7. Enquadramento

O presente trabalho foi desenvolvido na Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo (ESTG-IPVC) mais concretamente no laboratório da Unidade de Microbiologia Aplicada (UMA) e teve como objetivo principal avaliar a eficácia da aplicação de campos elétricos pulsados de intensidade baixa/moderada na inativação de *E. coli*, *L. salivarius* e *S. cerevisiae*.

Como objetivos específicos definiram-se:

- Quantificar a inativação microbiana em função do tempo de pulso, temperatura inicial e caudal.
- Compreender a suscetibilidade dos diferentes microrganismos em estudo aos tratamentos aplicados.
- Aplicar tratamentos tendo em conta a interdependência das diferentes variáveis de modo a evitar aumentos elevados de temperatura durante o tratamento garantindo que a inativação observada se deve exclusivamente ao tratamento PEF.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos Utilizados

Neste estudo foram analisados os efeitos da aplicação de campos elétricos pulsados em três espécies de microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Lactobacillus salivarius* (ATCC 11741) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

2.2. Regeneração e Preparação das Culturas de Microrganismos a Testar

A cultura inicial de *E. coli* foi obtida transferindo uma lentícula para tubo de ensaio com 5 mL de meio Brain-Heart Infusion (BHI, Oxoid) e colocada a incubar overnight a 37 °C. Da cultura inicial 1 mL foi inoculado em 50 mL de meio BHI e incubada a 37 °C *overnight*. Antes da realização dos testes foi efetuada uma diluição de 1:100 retirando da cultura anterior 1 mL para 99 mL de meio BHI fresco sendo depois incubadas a 30°C durante 4 h com agitação.

Para a regeneração da cultura de *L. salivarius* foi inicialmente realizada uma pré-cultura em meio De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA, VWR) a 30 °C durante 48 h a partir de uma cultura preservada a -80 °C com 15% glicerol. Da cultura anterior foi selecionada uma colónia isolada e repicada para 5mL de De Man, Rogosa and Sharpe Broth (MRSB, VWR) sendo colocada a incubar overnight a 30 °C. No dia anterior à realização dos testes 5 mL da cultura preparada anteriormente foram transferidos para 100 mL do mesmo meio e incubados a 30 °C durante 24 h.

A regeneração da levedura *S. cerevisiae* foi realizada a partir de uma cultura preservada a -80 °C com 15% glicerol preparando uma pré-cultura em placa com meio Yeast Extract–Peptone–Dextrose Agar (YEPDA) com a seguinte composição: extracto de levedura 0,5 % (p/v) (Biokar Diagnostics); peptona 1,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics); glucose 2,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics); agar 2,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics) e incubada a 27 °C durante 72 h. Da cultura anterior uma colónia isolada foi inoculada em tubo de ensaio a conter 50 mL de meio

Yeast Extract–Peptone–Dextrose (YEPD) com a seguinte composição: extrato de levedura 0,5 % (p/v) (Biokar Diagnostics); peptona 1,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics); glucose 2,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics) sendo colocada a incubar a 27 °C durante 72 h.

A densidade de células foi medida em todas as culturas anteriores e padronizada pela escala de McFarland a 0,5 por medição da turbidez (Biosan DEN-1B). De seguida as células de todos os microrganismos utilizados foram suspensas em solução tampão citrato-fosfato a pH 7 com condutividade elétrica ajustada a 2 mS/cm por diluição com água destilada estéril e com uma concentração de células entre 10^5 - 10^6 UFC/ml. O número de células esperado foi verificado por contagem em placa das amostras que não sofreram qualquer tipo de tratamento.

2.3. Ensaios de Aplicação de Campos Elétricos Pulsados

Os ensaios foram conduzidos num equipamento EPULSUS®-LPM1A-10 (EnergyPulse Systems, Lda.) para aplicações em laboratório e escala piloto. Este gerador produz pulsos retangulares unipolares com uma ampla faixa de variação nos valores dos parâmetros de intensidade do campo elétrico, tamanho de pulso e frequência. Encontra-se equipado com uma câmara de tratamento contínuo de estrutura colinear com diâmetro interno de 1,0 cm e com uma distância de 1,0 cm entre elétrodos. As condições de aplicação foram selecionadas tendo em conta testes preliminares previamente realizados de modo a determinar as condições ideais de aplicação e de forma a garantir que a temperatura final nunca atingisse valores letais para os microrganismos em estudo. Os ensaios foram realizados em modo de tratamento contínuo, utilizando uma intensidade de campo elétrica fixa de 10 Kv/cm, sendo testados sete tempos de impulso 1,2,4,6,10,20,50 μ s com uma frequência de 3 Hz em diferentes condições de temperatura inicial (23°C; 30°C) e de velocidade de caudal (2,92 L/h; 6,74 L/h). Previamente a cada ensaio, a linha de tratamento foi limpa com água destilada, depois higienizada bombeando uma solução de etanol a 70% através dela e posteriormente enxaguada com água destilada estéril. Após a etapa de higienização, foram selecionadas as condições experimentais e o tratamento foi aplicado ao tampão inoculado. Uma bomba peristáltica

(Watson Marlow 313S) foi utilizada para bombear a suspensão microbiana através do sistema às velocidades de caudal referidas anteriormente. A câmara foi colocada em posição vertical, a fim de evitar a formação de bolhas de ar no seu interior e garantir o controlo do tempo de residência do fluido. Após o tratamento foi efetuada a medição de temperatura do produto tratado e recolhidos 5 mL para tubos de ensaio estéreis, sendo os mesmos imediatamente colocados em gelo até à realização das análises microbiológicas.

2.4. Quantificação de *E. coli*

Após o tratamento, 1,0 mL das amostras de controlo não tratadas e das amostras sujeitas ao tratamento foram diluídas 1:10 de forma seriada em tubos de ensaio com 9,0 mL de solução Ringer esterilizada (Oxoid). O número de células sobreviventes de *E. coli* foi determinado incorporando 1 mL de cada diluição em meio Plate Count Agar (PCA, Oxoid) e contando as colónias após incubação a 37 °C por 24 h.

2.5. Quantificação de *L. salivarius*

Para a quantificação de *L. salivarius* 1 mL de cada diluição foram incorporados em meio De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA, VWR) sendo a contagem efetuada após incubação a 30 °C por 48 h.

2.6. Quantificação de *S. cerevisiae*

A quantificação de *S. cerevisiae* foi realizada em meio YEPDA com a seguinte composição: extracto de levedura 0,5 % (p/v) (Biokar Diagnostics); peptona 1,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics); glucose 2,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics); agar 2,0 % (p/v) (Biokar Diagnostics) onde foram inoculados por espalhamento à superfície 0,1 mL de cada diluição sendo a contagem realizada após um período de incubação de 72h a 27°C.

2.7. Análise de Dados

A contagem de colônias microbianas foi expressa em UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL de amostra). A eficácia da inativação foi quantificada pela determinação da diferença logarítmica entre o número de bactérias antes e depois do tratamento e expressa como redução de ciclos logarítmicos. Cada ensaio foi realizado em duplicado utilizando lotes de tampão preparados independentemente e culturas bacterianas frescas para cada repetição.

A influência na inativação dos tempos de pulso aplicados foi avaliada estatisticamente pela metodologia de análise de variância univariada (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey para verificar diferenças significativas entre os diferentes tempos. As temperaturas iniciais e caudais aplicados foram avaliados estatisticamente através de uma análise de variância com dois fatores (Two-way ANOVA) de modo a verificar a existência de uma influência significativa de cada um dos parâmetros e da interação de ambos na inativação. Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. A análise estatística foi realizada com o software IBM® SPSS® Statistics 26.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Inativação de *E. coli*

Com uma intensidade do campo elétrico de 10 kV/cm, frequência de 3 Hz, tamanho de pulso de 50 μ s, temperatura inicial de 30°C e um caudal de 2,92 L/h e com a temperatura final a não exceder os 52,5 °C ocorreu uma redução de 1,50 log na população de *E. coli*. A inativação caiu de 1,50 para 0,50 log quando para as mesmas condições o tamanho do pulso diminuiu de 50 μ s para 1 μ s.

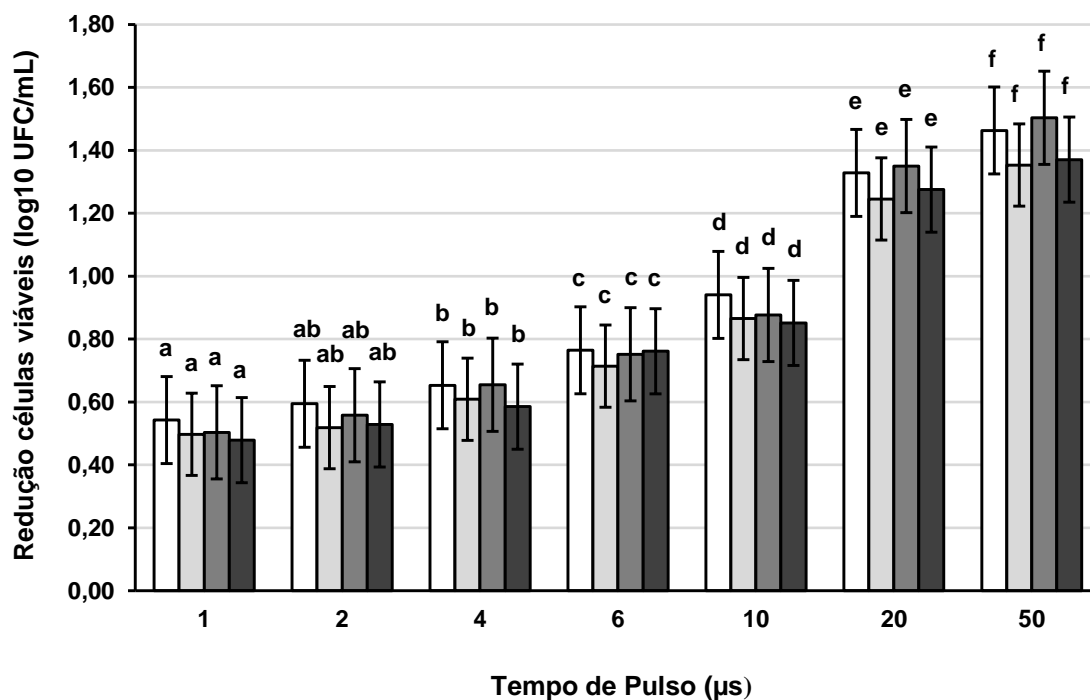


Figura 7: Inativação de *E. coli* inoculada em tampão citrato-fosfato em função do tempo de pulso e das diferentes combinações de temperatura de entrada-caudal: □ 23 °C - 2,92 L/h; ◻ 23 °C - 6,74 L/h; ◼ 30 °C - 2,92 L/h; ◼ 30 °C - 6,74 L/h. Letras diferentes nas colunas indicam que as médias foram significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Para uma intensidade do campo elétrico e frequência constantes, o aumento no tamanho de pulso e consequente aumento no tempo de tratamento promoveu significativamente a inativação de *E. coli*. O tempo de pulso de 2 μ s não diferiu

significativamente dos tempos de 1 e 4 μ s. As diferentes temperaturas iniciais e caudais aplicados e as suas combinações não influenciaram significativamente a inativação.

Vários estudos sobre tratamentos PEF foram realizados para verificar a sua eficácia na inativação de *E. coli* inoculada em diferentes matrizes. Zhao *et al.* 2008 estudaram a inativação de *E. coli* em chá verde e obtiveram uma redução máxima de 5,6 log após aplicar uma intensidade de 38,4 kV/cm durante 160 μ s, Tao *et al.* 2014 obtiveram uma redução do máxima no número total de colónias de *E. coli* inoculadas em água estéril de 5,15 log aplicando um campo elétrico de 35 kV/cm e um tempo de tratamento de 90 μ s. Ambos concluíram que para uma intensidade de campo elétrico constante, o efeito de inativação por PEF em *E. coli* aumentou com o aumento do tempo de tratamento o que vai de encontro aos resultados obtidos neste estudo. Valores semelhantes ou superiores foram relatados na literatura por vários autores (McDonald *et al.* 2000; Aronsson *et al.*; 2001a; Amiali *et al.* 2005; Dutreux *et al.*, 2000). As taxas de inativação citadas anteriormente são muito superiores às observadas neste trabalho sugerindo que as diferenças registadas se devem sobretudo à utilização de intensidades de campo elétrico mais elevadas, no entanto, os tempos de tratamento mais longos que foram aplicados assim como as condutividades dos diferentes produtos tratados poderão também ter influenciado positivamente a inativação.

3.2. Inativação de *L. salivarius*

O número total de colónias de *L. salivarius* diminuiu no máximo 0,86 log quando as células foram sujeitas a um tratamento de 10 kV/cm, 3 Hz de frequência, tamanho de pulso de 50 μ s, temperatura inicial de 30°C e um caudal de 2,92 L/h com a temperatura a não ultrapassar os 52,4 °C. Quando nas mesmas condições o tamanho de pulso aplicado foi de 1 μ s a inativação diminuiu 0,70 log estabelecendo-se nos 0,16 log.

O aumento da duração de pulso e do tempo de tratamento influenciaram significativamente a inativação promovendo o aumento da mesma. No entanto, nos tamanhos de pulso menores as diferenças não são claras sendo que, apenas a partir da aplicação de pulsos de 10 μ s essas mesmas diferenças ficam patentes. Não foi registado qualquer efeito significativo das diferentes combinações de temperaturas iniciais e caudais na inativação de *L. salivarius*.

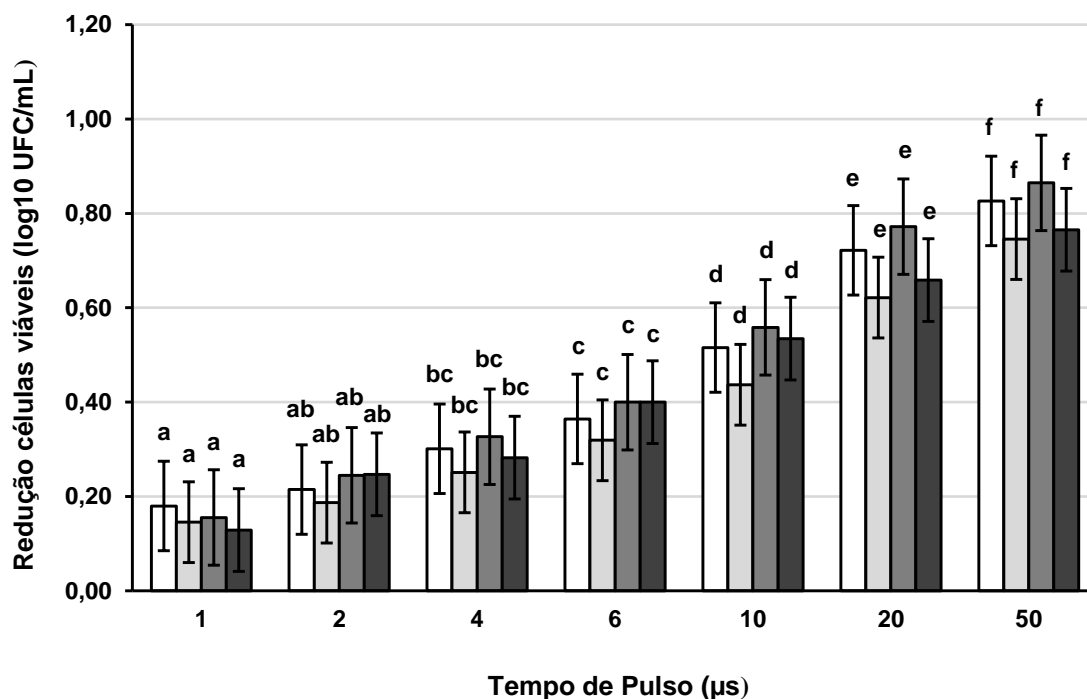


Figura 8: Inativação de *L. salivarius* inoculada em tampão citrato-fosfato em função do tempo de pulso e das diferentes combinações de temperatura de entrada-caudal: □ 23 °C - 2,92 L/h; ◻ 23 °C - 6,74 L/h; ◼ 30 °C - 2,92 L/h; ◼ 30 °C - 6,74 L/h. Letras diferentes nas colunas indicam que as médias foram significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O efeito da intensidade do campo elétrico e do tempo de tratamento na inativação de diferentes espécies de *Lactobacillus* foi relatado por vários autores. Sampedro *et al.*, 2007 registaram uma inativação máxima de 2,12 log de *L. plantarum* quando aplicaram um tratamento de 40 kV/cm durante 130 μ s com a temperatura a não ultrapassar os 55 °C. Abram *et al.*, 2003 estudaram os efeitos do tratamento com PEF em *L. plantarum* suspenso em tampão fosfato e observaram uma inativação máxima de aproximadamente 4,43 log ao expor o meio a uma intensidade de campo elétrico de 25 kV/cm durante 48 μ s aplicando pulsos de 5 μ s. Elez-Martínez *et al.*, 2005 obtiveram uma redução máxima de 5,8 log em *L. brevis* suspenso em sumo de laranja, esta redução foi alcançada após um tratamento de 1000 μ s aplicando pulsos bipolares de 4 μ s com intensidade de 35 kV/cm e 200 Hz de frequência sem exceder 32 °C. As muito diferentes condições experimentais utilizadas pelos diferentes autores e a diversidade de equipamentos disponíveis limita a comparação de resultados e pode ser responsável pelos diferentes níveis de inativação reportados. Uma vez mais o nível de inativação obtido neste trabalho ficou muito abaixo dos citados anteriormente, estas diferenças devem-se à baixa intensidade do tratamento, sobretudo à intensidade de campo elétrico aplicada.

3.3. Inativação de *S. cerevisiae*

Após aplicar um tratamento de 10 kV/cm, 3 Hz de frequência, tamanho de pulso de 50 μ s, temperatura inicial de 30°C e um caudal de 2,92 L/h com a temperatura a não ultrapassar os 52,2 °C obteve-se uma redução máxima de 1,56 log UFC/mL da população de *S. cerevisiae*.

À semelhança dos restantes microrganismos testados também no caso da levedura o aumento do tempo de pulso causou um aumento significativo na inativação sendo registado um resultado idêntico ao observado para *E. coli* com o tempo de pulso de 2 μ s a não ser significativamente diferente dos tempos de 1 e 4 μ s. Também para *S. cerevisiae* as diferentes combinações de temperatura inicial e caudal não mostraram ter um efeito significativo na inativação.

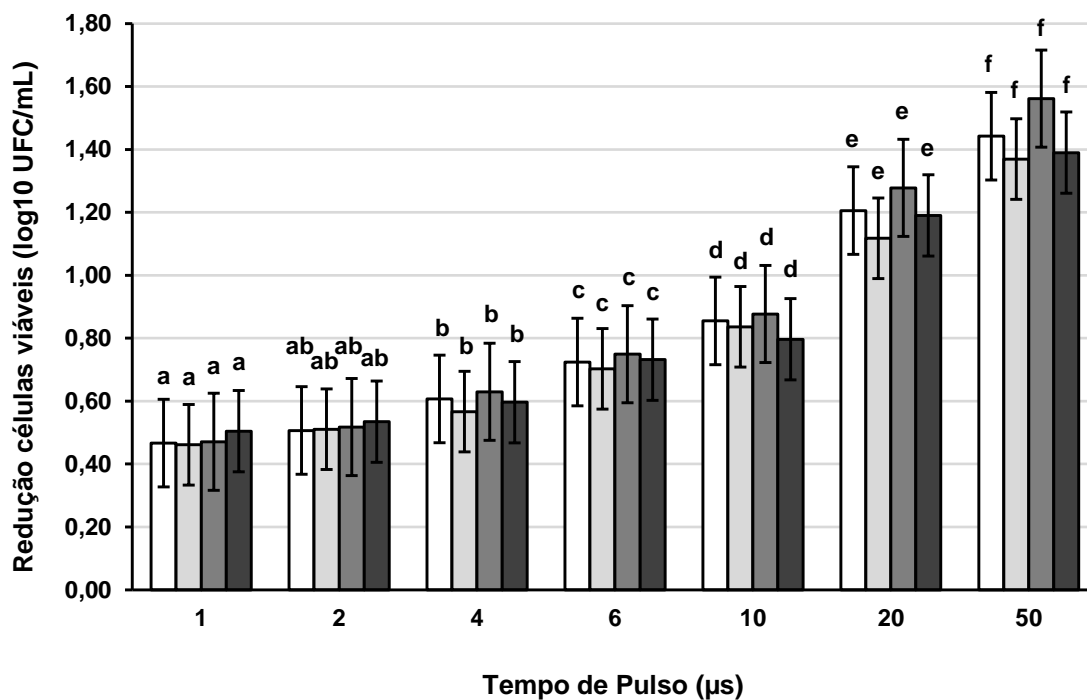


Figura 9: Inativação de *S. cerevisiae* inoculada em tampão citrato-fosfato em função do tempo de pulso e das diferentes combinações de temperatura de entrada-caudal: □ 23 °C - 2,92 L/h; ◻ 23 °C - 6,74 L/h; ◼ 30 °C - 2,92 L/h; ◼ 30 °C - 6,74 L/h. Letras diferentes nas colunas indicam que as médias foram significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Os níveis de inativação de *S. cerevisiae* registados neste estudo foram inferiores aos obtidos por outros autores como por exemplo Aronsson *et al.* 2005 que observaram uma redução máxima de 6,8 log em tampão fosfato inoculado com *S. cerevisiae* tratado a 30 kV/cm com uma duração de pulso de 4 μ s. Esta diferença deve-se sobretudo à intensidade do campo elétrico aplicado que foi três vezes superior. Também a condutividade do meio pode ter influência na inativação uma vez que as células foram tratadas em tampão fosfato com condutividade elétrica de 4,0 mS/cm e sabe-se que o aumento da condutividade pode provocar um aumento na inativação (Álvarez *et al.*, 2006). Elez-Martinez *et al.* 2004 obtiveram uma inativação de 4,7 log em sumo de laranja inoculado com *S. cerevisiae* aplicando um tratamento de 35 kV/cm com uma duração de pulso de 4 μ s. Os mesmos autores concluíram que intensidade de campo elétrico e tempo de tratamento foram os fatores com maior influência na inativação, o mesmo aconteceu neste trabalho com maiores tempos de tratamento a provocarem maiores taxas de inativação. Wang *et al.* 2015 observaram que para intensidades de campo elétrico moderadas, entre 5 a 10 kV/cm, um grande número de células de *S. cerevisiae* encontravam-se apenas lesadas subletalmente. Este resultado sugere que devem ser aplicadas intensidades de campos elétricos acima de 10 kV/cm a fim de aumentar o número de células lesadas letalmente pelo tratamento, o que permite explicar os reduzidos valores de inativação obtidos neste estudo.

3.4. Influência das Características Microbianas na Inativação

O efeito do tratamento PEF é amplamente influenciado pela espécie microbiana (Aronsson, Rönnér 2001). Os resultados experimentais mostraram que *E. coli* é ligeiramente menos sensível ao tratamento com PEF do que *S. cerevisiae*, enquanto *L. salivarius* é dos microrganismos estudados aquele que apresenta maior resistência ao tratamento. Os resultados obtidos vão de encontro aos registados por vários autores que concluíram que as leveduras são mais sensíveis a um campo elétrico externo do que as bactérias (Lee *et al.*, 2015,

Toepfl *et al.*, 2007, Timmermans *et al.*, 2014, Timmermans *et al.*, 2019, Aronsson *et al.*, 2001a, (Aronsson, Rönner 2001).

Além disso, vários autores demonstraram que, relativamente às bactérias, as Gram-negativas são mais suscetíveis ao tratamento com PFE do que as Gram-positivas (Dutruex *et al.*, 2000, Damar *et al.*, 2002, Qin *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2015, Aronsson *et al.*, 2001a). As diferenças na composição da parede celular podem contribuir para a resistência aos PFE. A camada mais espessa de peptidoglicano da parede das células Gram-positivas é responsável por uma maior resistência aos PEF, em comparação com uma camada mais fina de peptidoglicano da parede das bactérias Gram-negativas (Álvarez *et al.*, 2006).

No entanto, as características da membrana e da parede celular não são os únicos fatores que afetam a resistência ao tratamento com PFE. O tamanho da célula também é um fator importante e que deve ser considerado. Os modelos mecânicos que explicam o processo de eletroporação afirmam que o potencial transmembranar induzido está correlacionado com o tamanho da célula (Zimmermann *et al.*, 1974). Por exemplo, Grahl e Markl 1996 definiram uma força crítica de campo elétrico (E_c) de 13,7 kV/cm para *E. coli* e de 4,7 kV/cm para *S. cerevisiae*. Tendo em conta o diâmetro comparativamente maior das células de levedura, o seu E_c é consideravelmente menor do que o das células bacterianas de menores dimensões. Como *S. cerevisiae* é o maior dos três organismos testados, é o mais sensível ao tratamento, enquanto que *E. coli* e *L. salivarius* são células de menor tamanho e a voltagem induzida através de suas membranas é maior nas mesmas condições de PEF.

As pequenas diferenças registadas no grau de inativação entre as diferentes espécies, sobretudo entre *E. coli* e *S. cerevisiae* resultam da aplicação de uma intensidade de campo elétrico baixa/moderada, estas diferenças acentuam-se quando tratamentos de maior intensidade são aplicados (Timmermans *et al.*, 2019).

3.5. Influência do Tempo de Pulso na Inativação

Como mostrado nas Figuras 7,8 ,9 , o efeito de inativação por PEF em *E. coli*, *S. cerevisiae* e *L. salivarius* aumentou com o aumento do tempo de pulso. Os resultados indicam que a inativação de microrganismos causada por campos elétricos pulsados está relacionada com a duração dos pulsos aplicados, sendo que, a taxa de sobrevivência dos microrganismos estudados diminui quando este parâmetro é aumentado. À medida que o tempo de pulso aumenta, o tempo de tratamento também aumenta, o que resulta num aumento da inativação. Os resultados obtidos sugerem que a intensidade do campo elétrico aplicado influenciou a eficácia dos pulsos, pois para uma intensidade moderada como a utilizada neste estudo a utilização de tempos de pulso reduzidos não se revelou eficaz, algo que vai de encontro ao relatado por Wouters *et al.*, 1999 que observou que a vantagem da utilização de pulsos mais longos a intensidades mais baixas foi anulada quando aplicados tratamentos de alta intensidade.

Os resultados registados neste trabalho vão de encontro aos obtidos por vários autores que atingiram uma maior inativação com a aplicação de pulsos mais longos (Aronsson *et al.*, 2001a; Alvarez *et al.*, 2003; Abram *et al.*, 2003; Evrendilek *et al.*, 2004). No entanto, outros autores sugerem que pulsos mais curtos aplicados em intensidades de campo elétrico mais altas foram mais eficazes na inativação de vários microrganismos do que pulsos mais longos aplicados em intensidades de campo mais baixas (Moonesan, Jayaram, 2013, Vernhes *et al.*, 2002). Além disso, pulsos mais curtos oferecem outras vantagens, como menor efeito Joule e redução na migração de compostos dos eletrodos para o meio de tratamento ou na formação de espécies químicas (Álvarez *et al.*, 2006). No entanto, devido às limitações impostas pelo equipamento utilizado a intensidade de campo elétrico máxima aplicada foi de 10 kV/cm pelo que de modo a compensar a baixa intensidade aplicada a duração dos pulsos aplicados foi maior. Como a inativação é dependente tanto da intensidade dos pulsos aplicados como da sua duração, o tratamento de baixa intensidade aplicado neste estudo provocou alterações na membrana, no entanto essas alterações, nomeadamente o tamanho dos poros formados pode

ter sido reduzido, provocando apenas danos reversíveis na membrana levando a que as células eletroporadas possam ter permanecido viáveis.

3.6. Influência da Temperatura de Entrada e Caudal na Inativação

A temperaturas iniciais e caudais aplicados, assim como a sua interação, mostraram não ter influência significativa no grau de inativação dos microrganismos em estudo como é possível verificar através das Tabela 1, 2 e 3 onde não se observam valores de $p < 0,05$ que indicariam um efeito significativo destes parâmetros e da sua interação na inativação.

Tabela 1: Efeito das temperaturas iniciais e caudais e da interação entre ambos na inativação de *E. coli*.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p
Temp. Inicial	0,003	1	0,003	0,000	0,988
Caudal	0,022	1	0,022	0,166	0,687
Interação	0,001	1	0,001	0,005	0,947
Erro	3,215	24	0,134		
Total	24,033	28			

Legenda: SQ – Soma de Quadrados; gl – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio; F – Teste F. Valores de p considerados significativos abaixo de 0,05.

Tabela 2: Efeito das temperaturas iniciais e caudais e da interação entre ambos na inativação de *L. salivarius*.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p
Temp. Inicial	0,009	1	0,009	0,149	0,703
Caudal	0,018	1	0,018	0,292	0,594
Interação	0,000	1	0,000	0,006	0,939
Erro	1,438	24			
Total	6,763	28			

Legenda: SQ – Soma de Quadrados; gl – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio; F – Teste F. Valores de p considerados significativos abaixo de 0,05.

Tabela 3: Efeito das temperaturas iniciais e caudais e da interação entre ambos na inativação de *S. cerevisiae*.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p
Temp. Inicial	0,007	1	0,007	0,057	0,814
Caudal	0,015	1	0,015	0,118	0,734
Interação	0,001	1	0,001	0,008	0,929
Erro	3,059	24			
Total	22,123	28			

Legenda: SQ – Soma de Quadrados; gl – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio; F – Teste F. Valores de p considerados significativos abaixo de 0,05.

As temperaturas iniciais de 23 °C e 30 °C não mostraram ter um efeito significativo no aumento da inativação microbiana. No entanto, vários autores mostraram que o aumento da temperatura inicial leva a um aumento da eficiência do tratamento uma vez que além de aumentar a taxa de inativação permite também atingir uma redução da carga microbiana com menos entrada de energia específica. Timmermans *et al.*, 2014 observaram que a inativação de *S. cerevisiae* aumentou significativamente quando a temperatura de entrada aplicada subiu de 20 °C para 36 °C. Rodríguez-González *et al.*, 2011 demonstraram que o tratamento com PEF é mais eficaz em temperaturas acima de 30 °C, com uma diminuição em quase metade da energia aplicada para reduzir microrganismos em leite ao mesmo nível alcançado a temperaturas mais baixas. Heinz *et al.*, 2003 concluíram que o consumo de energia elétrica necessário para obter 6 log de inativação de *E. coli* pode ser reduzido de 100 kJ/kg a menos de 40 kJ/kg ao aumentar a temperatura de tratamento de 20-30 °C até uma faixa de 55-65 °C. Lee *et al.*, 2015 obtiveram uma redução de 4,5 log na contagem de *E. coli* quando a temperatura de entrada era de 30 °C e uma energia específica de 200 kJ/kg era aplicada. Com uma temperatura de entrada de 40 °C, e para a mesma energia específica aplicada a redução foi de 5,2 log. O efeito da temperatura inicial na eficácia do tratamento com PEF pode ser explicado pelas características da membrana dos microrganismos que são dependentes da temperatura. As transições de fase dos fosfolipídios da fase gel

para a fase líquido-cristalina estão relacionadas com a temperatura (Jäger, 2012). Estas transições afetam a estabilidade da membrana celular em temperaturas mais altas, sendo que o E_c diminui quando a temperatura da solução aumenta e, conseqüentemente, a eletroporação ocorre em campos elétricos externos mais baixos (Timmermans *et. al*, 2014).

O facto de as temperaturas iniciais aplicadas não terem causado nenhum efeito significativo na inativação pode ser explicado por essas mesmas temperaturas não se encontrarem acima de 30 °C algo que vai de encontro aos resultados obtidos pelos autores citados anteriormente. A escolha da temperatura do tratamento com PEF é muito importante, visto que uma temperatura acima de 30 °C aumenta a suscetibilidade da membrana celular à eletroporação e a eficiência antimicrobiana do tratamento (Mosqueda-Melgar *et al.*, 2008). Ao aplicar temperaturas iniciais mais baixas, é necessário um alto consumo de energia específica para atingir taxas de inativação elevadas algo que resulta em altos custos de operação e que neste caso seria difícil de conseguir tendo em conta as limitações impostas pelo equipamento utilizado. Além disso, no presente estudo as condições aplicadas foram seleccionadas de modo a evitar um aumento significativo da temperatura durante o tratamento e com isso garantir que os níveis de inativação registados eram resultado do tratamento PEF em si e não do aumento de temperatura gerada durante o processo.

À semelhança da temperatura também os caudais de 2,92 e 6,74 L/h não apresentaram efeito significativo na inativação dos microrganismos em estudo. O efeito do caudal na inativação de microrganismos por PEF carece de maior investigação sendo a informação relativa à influência desta variável ainda muito escassa. Meneses *et. al*, 2011, conduziram um estudo com taxas de fluxo de 3, 5, 10 e 20 L/h e uma intensidade de 18 kV/cm em *E. coli* suspensa em solução Ringer com uma condutividade de 4,7 mS/cm. Um aumento significativo na inativação foi observado quando o tratamento com PEF foi realizado a 10 L/h em comparação com 3 L/h. Os mesmos autores também verificaram que o tempo de tratamento é menos homogéneo ao processar a uma taxa de fluxo de 3 L/h do que 10 L/h uma vez que o perfil de velocidade é mais laminar e maiores diferenças na velocidade de fluxo podem ser encontradas sugerindo por isso, a utilização de taxas de fluxo mais elevadas. A razão para aumentar a velocidade

do fluxo é produzir uma melhor mistura do fluido na câmara de tratamento o que produz um tratamento mais homogêneo e poderia potencializar a inativação microbiana (Meneses *et. al*, 2011). Além disso, os efeitos de mistura gerados também produzem uma distribuição de temperatura mais homogênea na câmara de tratamento (Jaeger *et. al*, 2009). Estes resultados indicam que os caudais utilizados neste estudo poderão ter sido reduzidos. No entanto, é importante ter em conta as limitações impostas pelo equipamento utilizado uma vez que ao aplicar maiores taxas de fluxo é necessária uma maior potencia do equipamento gerador de pulsos a fim de fornecer uma quantidade suficiente de energia por volume do produto a tratar para atingir um determinado nível de inativação microbiana (Pataro *et. al*, 2011). Uma vez mais a impossibilidade de aplicar elevadas intensidades de campo elétrico demonstrou ter influência, mesmo que indireta, noutros parâmetros do tratamento evidenciando assim a complexa interdependência existente entre as diferentes variáveis.

No entanto, mais estudos são necessários para uma compreensão mais aprofundada do papel desempenhado pela dinâmica do fluxo na eficiência do tratamento PEF, a fim de determinar, para cada caso, as condições de fluxo ideais que maximizem o efeito letal do processo, juntamente com o consumo mínimo de energia.

4. CONCLUSÃO

Vários estudos sobre a inativação de microrganismos por PEF sob uma ampla gama de condições de tratamento já demonstraram a eficácia do processo com reduções significativas da carga microbiana em diferentes tipos de matrizes. Essas aplicações bem sucedidas fazem dos PEF uma tecnologia com potencial na preservação não térmica de alimentos e uma alternativa ao processamento térmico convencional. Muitos destes estudos têm se concentrado na identificação de fatores críticos que influenciam a resistência microbiana do PEF e, atualmente, a maioria deles é bem conhecida. No entanto, torna-se difícil a comparação de resultados devido à grande variedade de equipamentos e condições experimentais utilizadas sendo por isso importante encontrar uma forma padronizada de relatar as condições de tratamento.

Das diferentes condições aplicadas neste trabalho a aplicação de um tratamento PEF de $E = 10 \text{ kV/cm}$, $\tau = 50$ e $f = 3 \text{ Hz}$ μs mostrou-se o mais eficaz na inativação de todos os microrganismos em estudo. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a inativação de microrganismos por PEF em tampão citrato-fosfato foi dependente das características do tratamento aplicado, bem como do microrganismo alvo. A duração dos pulsos aplicados foi o parâmetro do processo que influenciou de forma significativa o nível de inativação. Para todos os microrganismos estudados os níveis de inativação aumentaram quando pulsos de maior duração e conseqüentemente maior tempo de tratamento foram aplicados, independentemente das outras variáveis em análise.

Não foi observado qualquer efeito significativo na inativação causado pelas diferentes combinações de temperatura inicial-caudal utilizadas.

A sensibilidade ao tratamento PEF variou entre os diferentes microrganismos. Neste estudo, a bactéria gram-positiva foi mais resistente do que a gram-negativa, enquanto a levedura testada foi a mais sensível.

Com a seleção cuidadosa dos parâmetros de tratamento tendo em conta a interdependência dos mesmos e aqueles que maior influência apresentam no incremento da temperatura (tempo de pulso, frequência, etc.), foi possível

minimizar o aumento da temperatura das amostras durante o tratamento, limitando assim os efeitos desse mesmo aumento na inativação.

Com este trabalho evidenciam-se os efeitos de algumas variáveis do processo na inativação de microrganismos por PEF o que pode ajudar na definição de tratamentos mais eficazes que permitam atingir maiores níveis de inativação microbiana utilizando o equipamento disponível no IPVC. Os resultados obtidos revelam as dificuldades em atingir níveis de inativação elevados através da aplicação de tratamentos PEF de baixa/moderada intensidade e sem combinação com outros tratamentos promotores da inativação.

Trabalhos futuros poderão concentrar-se na otimização e adaptação dos parâmetros de processamento tendo em conta as limitações do equipamento utilizado procurando alternativas de modo a aumentar os níveis de inativação microbiana, nomeadamente através de tratamentos combinados tirando proveito do efeito sinérgico do aumento da temperatura de entrada na eficiência do tratamento assim como de outras tecnologias de inativação de microrganismos inovadoras e antimicrobianos naturais.

Verificar a possibilidade de utilização do PEF de baixa intensidade para fragilização inicial de células levando a que tratamentos subsequentes possam ter níveis elevados de inativação aplicando condições mais brandas.

Com base no trabalho desenvolvido seria também importante quantificar frações de microrganismos lesados subletalmente.

Por último, sugere-se um estudo para avaliar as potencialidades de aplicação a matrizes alimentares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidor, I., G., Arakelyan, L., V., Chernomordik, L., V., Chizmadzhev, Y., Pastushenko, V., F., Tarasevich, M., R. (1979) Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochem Bioenerg* 6:37–52

Abram, F., Smelt, J. P. P. M., Bos, R., & Wouters, P. C. (2003). Modelling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 571–579.

Altunakar, B., (2007). Food Preservation By Pulsed Electric Fields And Selected Antimicrobials. Ph.D. Washington State University.

Álvarez, I., Condón, S. and Raso, J., (2006). Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. In: J. Raso and V. Heinz, ed., *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*, 1st ed. Boston: Springer, pp.97-129.

Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J., & Condón, S. (2003). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20(6), 691–700.

Amiali, M., Ngadi, M., Smith, J. P., & Raghavan, V. (2005). Inactivation of *Escherichia Coli* 0157:H7 and *Salmonella Enteritidis* in Liquid Egg Using Continuous Pulsed Electric Field System. 20.

Aronsson, K., & Ronner, U. (2001). Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Emerging Technologies*, 8.

Aronsson, K., Lindgren, M., Johansson, B. R., & Ronner, U. (2001). Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: The influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Emerging Technologies*, 14.

Aronsson, K., Rönner, U., & Borch, E. (2005). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to

pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology*, 99(1), 19–32.

Barbosa-Canovas. G. v., Gongora, M. M., Pothakamury , U. R., and Swanson, B. G., (1999), *Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields*, Academic Press, San Diego.

Crowley JM (1973). Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys J* 13:711–724.

Damar, S., Bozogolu, F., Hizal, M., Bayındırlı, A. (2002). Inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields. 6.

Dimitrov DS (1984) Electric field induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: a thin viscoelastic model. *J Membr Biol* 78:53–60

Dutreux, N., Notermans, S., Wijtzes, T., Góngora-Nieto, M. M., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2000). Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 54(1–2), 91–98.

Elez-Martínez, P., Escolà-Hernández, J., Soliva-Fortuny, R. C., & Martín-Belloso, O. (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* Suspended in Orange Juice Using High-Intensity Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2596–2602.

Elez-Martínez, P., Escolà-Hernández, J., Soliva-Fortuny, R. C., & Martín-Belloso, O. (2005). Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 22(4), 311–319.

Evrendilek, G. A., Zhang, Q. H., & Richter, E. R. (2004). Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering*, 87(2), 137–144.

Glaser RW, Leikin SL, Chernomordik LV, Pastushenko VF, Sokirko AI (1988) Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim Biophys Acta* 940:275–287

Golberg, A., Fischer, J. and Rubinsky, B., 2010. The Use of Irreversible Electroporation in Food Preservation. In: B. Rubinsky, ed., Irreversible Electroporation, 1st ed. Berlin: Springer, pp.273-312.

Gongora-Nieto, M. M., Sepulveda, D., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G., and Swanson, B. G., 2002, Food processing by pulsed electric fields: treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects, *Lebensm-Wiss Technol*, 35, 5: 375-388.

Grahl, T., Märkl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1–2), 148–157.

Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 167–175.

Jaeger, H., Balasa, A., & Knorr, D. (2009). Food Industry Applications for Pulsed Electric Fields. *Em Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials* (pp. 181–216).

Jäger, H., 2012. Process Performance Analysis of Pulsed Electric Field (PEF) Food Applications. Ph.D. Technical University Berlin.

Joshi, R., Hu, Q., Schoenbach, K. and Hjalmarson, H., 2002. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses. *Physical Review E*, 65(4).

Lee, G. J., Han, B. K., Choi, H. J., Kang, S. H., Baick, S. C., & Lee, D.-U. (2015). Inactivation of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus brevis* in Low-fat Milk by Pulsed Electric Field Treatment: A Pilot-scale Study. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 800–806.

Lelieveld, H.L.M., Notermans, S., de Haan, S.W.H.: Food Preservation by pulsed electric fields. From Research to Application. CRC, Cambridge (2007).

Maged, M. and Ayman, E., 2012. Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology. In: A. Eissa, ed., *Structure and Function of Food Engineering*, 1st ed. London: IntechOpen, pp.275-306.

- McDonald, C. J., Lloyd, S. W., Vitale, M. A., Petersson, K., & Innings, F. (2000). Effects of Pulsed Electric Fields on Microorganisms in Orange Juice Using Electric field Strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science*, 65(6), 984–989.
- Meneses, N., Jaeger, H., Moritz, J., & Knorr, D. (2011). Impact of insulator shape, flow rate and electrical parameters on inactivation of *E. coli* using a continuous co-linear PEF system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 6–12.
- Min S., Evrendilek GA, Zhang Q H., (2007) Pulsed electric fields: processing system, microbial and enzyme inhibition, and shelf-life extension of foods. *IEEE T Plasma Sci* 35:59–73
- Moonesan, M. S., & Jayaram, S. H. (2013). Effect of Pulsewidth on Medium Temperature Rise and Microbial Inactivation Under Pulsed Electric Field Food Treatment. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 49(4), 1767–1772.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. (2008). Effects of Pulsed Electric Fields on Pathogenic Microorganisms of Major Concern in Fluid Foods: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(8), 747–759.
- Neumann, E. and Rosenheck, K., 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 10(1), pp.279-290.
- Pagán, R. and Mañas, P., 2006. Fundamental Aspects of Microbial Membrane Electroporation. In: J. Raso and V. Heinz, ed., *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*, 1st ed. Boston: Springer, pp.73-94.
- Pataro, G., Senatore, B., Donsì, G., & Ferrari, G. (2011). Effect of electric and flow parameters on PEF treatment efficiency. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 79–88.
- Qin, Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., Pedrow, P. D., & Olsen, R. G. (1998). Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 34(1), 43–50.

Raso, J., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Non-Thermal Processing | Pulsed Electric Field. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 966–973.

Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J. and Miklavčič, D., 2016. Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, pp.312-321.

Rodríguez-González, O., Walkling-Ribeiro, M., Jayaram, S., & Griffiths, M. W. (2011). Factors affecting the inactivation of the natural microbiota of milk processed by pulsed electric fields and cross-flow microfiltration. *Journal of Dairy Research*, 78(3), 270–278.

Sale, A. J. H., and Hamilton, W A., 1967, Effects of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast, *Biochem. Biophys. Acta* 148: 781-788

Sampedro, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., & Rodrigo, M. (2007). Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice–milk based beverage: Effect of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 931–938.

Saulis, G., 2010. Electroporation of Cell Membranes: The Fundamental Effects of Pulsed Electric Fields in Food Processing. *Food Engineering Reviews*, 2(2), pp.52-73.

Saulis, G., Venslauskas, M., 1993. Cell Electroporation. Part 1. Theoretical Simulation of the Process of Pore Formation in the Cell. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32, 221-235.

Tao, X., Chen, J., Li, L., Zhao, L., Zhang, M., & Sun, A. (2015). Influence of Pulsed Electric Field on *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Properties*, 18(7), 1416–1427.

Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., Berendsen, L. B. J. M., Nederhoff, A. L., Matser, A. M., Van Boekel, M. A. J. S., & Nierop Groot, M. N., 2019. Moderate intensity Pulsed Electric Fields (PEF) as alternative mild preservation technology for fruit juice. *International Journal of Food Microbiology*, 298, 63–73.

- Timmermans, R. A. H., Nierop Groot, M. N., Nederhoff, A. L., van Boekel, M. A. J. S., Matser, A. M., & Mastwijk, H. C. (2014). Pulsed electric field processing of different fruit juices: Impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 105–111.
- Toepfl, S., 2006. Pulsed Electric Fields (PEF) For Permeabilization Of Cell Membranes In Food- And Bioprocessing – Applications, Process And Equipment Design And Cost Analysis. Ph.D. Technical University Berlin.
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(6), 537–546.
- Toepfl, S., Siemer, C., Saldaña-Navarro, G. and Heinz, V., 2014. Overview of Pulsed Electric Fields Processing for Food. In: D. Sun, ed., 2nd ed. London: Academic Press, pp.93-114.
- Tsong, T. Y., 1991, Electroporation of cell membranes, *Biophys. J.* 24: 271-295.
- Vernhes, M. C., Benichou, A., Pernin, P., Cabanes, P. A., & Teissié, J. (2002). Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water Research*, 36(14), 3429–3438.
- Wang, M.-S., Zeng, X.-A., Sun, D.-W., & Han, Z. (2015). Quantitative analysis of sublethally injured *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 672–677.
- Weaver, J. C , and Chizmadzhev, Y. A., 1996, Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41: 135-160.
- Weaver, J., 1995. Electroporation Theory. In: J. Nickoloff, ed., *Electroporation Protocols for Microorganisms*, 1st ed. New Jersey: Humana Press, pp.1-26.
- Wouters, P. C., Dutreux, N., Smelt, J. P. P. M., & Lelieveld, H. L. M., 1999. Effects of Pulsed Electric Fields on Inactivation Kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5364–5371.

Wouters, P., Alvarez, I. and Raso, J., 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 12(3-4), pp.112-121.

Zhao, W., Yang, R., Lu, R., Wang, M., Qian, P., & Yang, W., 2008. Effect of PEF on microbial inactivation and physical–chemical properties of green tea extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 425–431.

Zimmermann, U., 1986, Electric breakdown, electropermeabilization and electrofusion, *Rev. Phys. Biochem. Pharmacol.* 105: 196-256.

Zimmermann, U., Pilwat, G. and Riemann, F., 1974. Dielectric Breakdown of Cell Membranes. *Biophysical Journal*, 14(11), pp.881-899.