



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



***Campos Elétricos Pulsados e Moderados
para o Estímulo de Bactérias e Leveduras em
Processos Biotecnológicos: Uma Revisão***

Autor: Greice Calloni

Orientadores: Prof^a Dr^a Daniele Misturini Rossi

Prof^a Dr^a Júlia Ribeiro Sarkis

Porto Alegre, outubro de 2020.

Autor: Greice Calloni

***Campos Elétricos Pulsados e Moderados para o
Estímulo de Bactérias e Leveduras em Processos
Biotecnológicos: Uma Revisão***

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química*

Orientador: Prof^a Dr^a Daniele Misturini Rossi

Prof^a Dr^a Júlia Ribeiro Sarkis

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a, Ligia Damasceno Ferreira Marczak, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a, Lilian Raquel Hickert, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais e irmão pelo amor e suporte incondicionais. Sem eles não teria chegado até aqui.

Ao meu namorado Filipe, que sempre foi compreensivo e soube me apoiar nos momentos difíceis.

Agradeço às minhas professoras orientadoras, Daniele e Júlia, por todo o apoio fornecido para elaboração deste trabalho.

A todos os professores que tive o privilégio de ser aluna, em especial aos professores do curso de Engenharia Química desta Universidade.

Agradeço aos amigos que a Universidade me proporcionou, os quais tornaram essa página de minha vida muito mais bonita.

Muito Obrigada!

RESUMO

Tecnologias de campos elétricos, tais como Campos Elétricos Pulsados (PEF) e Campos Elétricos Moderados (MEF), têm emergido para assistir processos de transformação, esterilização e extração com interesses científicos e industriais. Uma aplicação ainda pouco explorada, porém promissora, é a utilização destas tecnologias para estimular o crescimento microbiológico e manipular ganhos produtivos. Bactérias e leveduras são capazes de sintetizar componentes de alto valor, como nutrientes, enzimas, álcoois, ácidos e biopolímeros. O interesse pelo emprego de rotas biotecnológicas de produção tem aumentado com a crescente demanda por alternativas ecologicamente corretas. Desta forma, surge a necessidade de aprimoramento dos processos biotecnológicos para torná-los mais viáveis e competitivos no mercado. Pesquisas publicadas nestas últimas décadas apontam que a utilização de campos elétricos permite aumentar o crescimento celular, reduzir o tempo de fermentação, elevar a produtividade de compostos químicos e enriquecer a extração de proteínas. Esta monografia consiste em uma revisão da literatura sobre a utilização das técnicas de PEF e MEF para estimular bactérias e leveduras. Os objetivos do trabalho são elucidar os mecanismos envolvidos no estímulo celular, discutir os resultados de trabalhos relevantes sobre o tema publicados nas últimas duas décadas, apresentar estudos que já demonstraram aplicações de PEF e MEF com interesse comercial, e, por fim, propor sugestões de estudos futuros com base nas lacunas observadas. As tecnologias elétricas demonstram grande potencial para revolucionar a indústria de alimentos e bioprocessos. Estudos para o entendimento dos fundamentos envolvidos no estímulo elétrico são de extrema importância para permitir a otimização e a evolução das tecnologias elétricas, garantindo sua aplicação em larga escala.

Palavras-chave: PEF, MEF, estímulo celular, bactérias, leveduras.

ABSTRACT

Electric field technologies, such as Pulsed Electric Fields (PEF) and Moderate Electric Field (MEF) have emerged to assist transformation, sterilization, and extraction processes in scientific and industrial fields. However, the utilization of these technologies to stimulate microbial growth and manipulate productive outcomes is a less exploited application, although promising. Bacteria and yeast cells are able to synthesize high value components, such as nutrients, proteins, alcohols, acids, and biopolymers. The interest in biotechnological production pathways has augmented due to the accelerated demand for environmentally friendly alternatives. As a result, the necessity to enhance biotechnological processes to make them viable and competitive on the market has arisen. Studies published in the last decades indicate that the utilization of electric field can increase microbial growth, reduce fermentation time, augment chemical compounds productivity, and enhance protein extraction. The present monograph consists of a literature review on the employment of PEF and MEF techniques to stimulate bacteria and yeast. The aim of this work is to elucidate the mechanisms involved in the cellular stimulus, to discuss the results of relevant papers published regarding this theme on the last two decades, to present the studies on the application of PEF and MEF for commercial purposes, and, lastly, to propose suggestions for future studies based on the gaps observed. The electrical technologies have demonstrated a great potential to revolutionise food and bioprocess industries. Studies on a fundamental understanding about the electric stimulus are incredibly important to the optimization and evolution of the electric field technologies, thus ensuring their scale up.

Keywords: PEF, MEF, cellular stimulus, bacteria, yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da aparelhagem de tratamento PEF contínuo.	13
Figura 2 - Sistema de MEF em escala laboratorial.....	14
Figura 3 - Célula suspensa em meio aquoso eletrolítico A) no potencial transmembrana de descanso e B) exposta a campo elétrico externo - surgimento de voltagem transmembrana induzida, C) que irá levar à eletroporação.	16
Figura 4 - Representação dos termos da equação de Laplace para uma célula esférica submetida a um campo elétrico uniforme.	17
Figura 5 – Eletroporação (EP) não detectável, reversível, irreversível e danos térmicos em função da intensidade do campo e duração do pulso. Dois pontos estão destacados, os quais resultam em eletroporação reversível em duas combinações diferentes de parâmetros.....	19
Figura 6 - Representação simplificada do envelope celular de bactérias e leveduras.	20
Figura 7 - I) Molécula de fosfolipídio, A) membrana plasmática sem poros, B) com um poro hidrofóbico, C) transição reversível para um poro hidrofílico; D) transição irreversível para um poro hidrofílico instável em expansão.	22
Figura 8 - Fases do crescimento microbiano	31
Figura 9 - Cinética de crescimento (células viáveis) de <i>Hanseniaspora sp.</i> para fermentação assistida por PEF e grupo controle	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais trabalhos publicados sobre a utilização de PEF e MEF com objetivos subletais em bactérias e leveduras.	27
Tabela 2 - Principais resultados publicados de aplicações das tecnologias de campo elétrico.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
CA	Corrente elétrica alternada
EOR	Espécie oxigênio reativa
EP	Eletroporação
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
MEF	Campo elétrico moderado
NsPEF	Campo elétrico pulsado em nanosegundo
OH	Aquecimento ôhmico
PEF	Campo elétrico pulsado
SI	Sistema Internacional de Unidades

LISTA DE SÍMBOLOS

N/C	newtons por Coulomb
K ⁺	íon potássio
°C	graus Celsius
Ca ⁺²	íon cálcio
Cl ⁻	íon cloreto
d	distância entre eletrodos
ΔV_i	diferença de potencial elétrico
ΔV_o	diferença de potencial elétrico de descanso
E	intensidade do campo elétrico
<i>f</i>	fator de forma da célula
<i>g</i> (λ)	função complexa de condutividades
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Hz	Hertz
I	corrente elétrica
J/ml	Joule por mililitro
kJ/kg	quilojoule por quilograma
kV/cm	quilovolts por centímetro
λ	condutividade elétrica
Mc	massa na câmara de tratamento
ms	milissegundos
mV	milivolts
Na ⁺	íon sódio
nm	nanômetro
ns	nanossegundos
pH	potencial hidrogeniônico
r	raio da célula
t	tempo
$\theta(M)$	ângulo entre a direção do campo e a normal à superfície no ponto M
τ_m	constante de tempo
U	tensão elétrica
UFC/ml	unidade formadora de colônias por mililitro
μ s	microssegundos
V/m	volt por metro
kV/cm	quilovolt por centímetro
W	fornecimento de energia específico
μ g/ml	micrograma por mililitro
τ_c	largura efetiva do pulso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS	11
1.2	METODOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DA MONOGRAFIA	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	CAMPO ELÉTRICO PULSADO (PEF).....	12
2.2	CAMPO ELÉTRICO MODERADO (MEF).....	14
2.3	FENÔMENOS ENVOLVIDOS NO ESTÍMULO CELULAR.....	15
2.3.1	A membrana plasmática sob ação do campo elétrico: o fenômeno da eletroporação	15
2.3.2	Voltagem induzida na membrana celular	17
2.3.3	Estrutura celular de bactérias e leveduras.....	19
2.3.4	Modelo da formação de poros aquosos	22
2.3.5	Efeito nas proteínas de transporte presentes na membrana	23
2.3.6	Propriedades da membrana: permeabilidade e peroxidação lipídica.....	23
2.4	PRINCIPAIS TRABALHOS PUBLICADOS SOBRE A UTILIZAÇÃO DE PEF E MEF EM NÍVEIS SUBLETAIS.....	25
2.4.1	Estresse oxidativo, expressão de genes, rotas metabólicas e tamanho celular.....	26
2.4.2	Fase de crescimento do microrganismo para aplicação do tratamento	31
2.4.3	Parâmetros de Processo	34
2.4.3.1	Intensidade do campo elétrico	34
2.4.3.2	Tempo de tratamento	36
2.4.3.3	Frequência	37
2.5	APLICAÇÕES NOTÁVEIS DESTAS TECNOLOGIAS.....	39
2.5.1	Produção de alimentos e bebidas	40
2.5.2	Extração de compostos de microrganismos	41
2.5.3	Processos Fermentativos	42
3	TÓPICOS A SEREM PESQUISADOS NESTA ÁREA	44
4	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

As tecnologias elétricas são técnicas emergentes com potencial para trazer ganhos à indústria de alimentos e aos bioprocessos. Dentre elas destacam-se as técnicas de campos elétricos pulsados (PEF, do inglês, *pulsed electric fields*) e campos elétricos moderados (MEF, do inglês, *moderate electric fields*). Tecnologias que empregam campos elétricos já vêm sendo utilizadas industrialmente para a inativação de microrganismos presentes em alimentos e para a extração de compostos de células vegetais. Foram observados, entretanto, efeitos do campo elétrico não letais às células, que seriam benéficos para processos biotecnológicos de interesse industrial. O estímulo de microrganismos por campos elétricos pode levar à aceleração de processos fermentativos e ao aumento de produtividade de biocompostos.

O desenvolvimento de novas tecnologias para aprimoramento de bioprocessos permite viabilizar rotas biotecnológicas de síntese, tornando-as competitivas em relação às técnicas convencionais, além de otimizar processos fermentativos e extrativos existentes, gerando vantagens econômicas e ambientais.

Microrganismos, tais como bactérias e leveduras, são fontes promissoras para produção de compostos de alto valor agregado e apresentam vantagens relevantes, como a possibilidade de obter energia de resíduos, altas taxas de conversão, alta produtividade e reduzido ciclo biológico. Pesquisas têm obtido resultados promissores com a utilização de tecnologias elétricas para o estímulo de células bacterianas e fúngicas. Um dos principais fenômenos envolvidos no estímulo celular é a eletroporação, que consiste, basicamente, no aumento de porosidade da membrana celular. No regime de eletroporação reversível, as células mantêm sua viabilidade e a troca de nutrientes com o meio extracelular é enriquecida.

Embora diversos estudos reportem aplicações bem sucedidas das tecnologias de campos elétricos pulsados e moderados em microrganismos, as informações ainda são escassas e alguns mecanismos ainda não são entendidos. Por esta razão, o presente trabalho almeja revisar e discutir as principais descobertas reportadas na literatura nas últimas décadas com relação aos efeitos do campo elétrico sobre bactérias e leveduras, a fim de estimular e encorajar o interesse para o desenvolvimento desta área de estudo.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é apresentar uma revisão da literatura com relação à aplicação das tecnologias elétricas PEF e MEF a níveis subletais em bactérias e leveduras para o enriquecimento de processos biotecnológicos.

Os objetivos específicos são:

- estudar o efeito dos campos elétricos nas estruturas celulares de bactérias e leveduras;
- analisar os estudos publicados sobre o tema nos últimos vinte anos com respeito aos parâmetros de processo utilizados e resultados obtidos;
- identificar as potenciais aplicações de PEF e MEF em processos industriais.

1.2 METODOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DA MONOGRAFIA

Foram utilizadas as bases de dados Scopus e Science Direct para coleta de material bibliográfico. Para seleção dos artigos foram buscadas publicações contendo as palavras “campo elétrico” ou “eletrotecnologia” e “fermentação” ou “crescimento microbiano” ou “microrganismo” presentes no título, resumo ou palavras-chave do artigo. O período de publicação avaliado foi a partir do ano 2000. Apenas publicações em inglês foram incluídas. Ao fazer a triagem do resultado da busca, os artigos que envolviam inativação, eletroporação irreversível, pré-tratamento de biomassa, células vegetais e humanas, manipulação genética, campos magnéticos ou eletromagnéticos, células de eletrólise microbiana e manipulação elétrica para avaliar movimento e adesão de células não foram incluídos. Nas sessões de definição de conceitos e explicações de fenômenos desta monografia foram incluídos revisões e capítulos de livros, sem limitação para datas.

A monografia está organizada de forma que a primeira parte consiste na descrição dos fenômenos envolvidos no estímulo celular por campos elétricos. A segunda seção foca na discussão dos resultados de estudos sobre o impacto do campo elétrico para promoção da atividade de bactérias e leveduras. São discutidos os efeitos sobre as células, bem como os parâmetros de processos empregados. A seção seguinte trata das aplicações notáveis das tecnologias de campo elétrico. Na parte final são apontadas necessidades de pesquisa futuras com base nas lacunas observadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAMPO ELÉTRICO PULSADO (PEF)

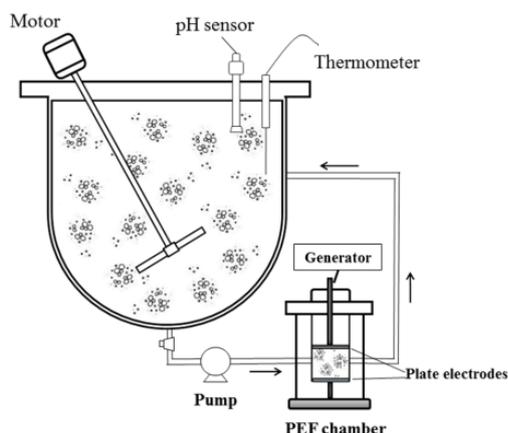
O princípio da técnica de campo elétrico pulsado é a aplicação intermitente de pulsos de corrente elétrica contínua, geralmente de voltagem da ordem de quilovolts, por um curto tempo (microsegundos ou milissegundos), através de um produto localizado entre dois eletrodos (MARTÍNEZ et al., 2020).

O conceito de campos elétricos pulsados (PEF) relacionado à mudança de comportamento de microrganismos foi proposto em 1967. Nos anos 1980, o campo elétrico foi identificado como um mecanismo de ruptura de membranas celulares e passou-se então a usar a tecnologia para extração assistida de conteúdo intracelular e transferência de material genético através da membrana permeabilizada. Os efeitos letais do PEF passaram a ser avaliados nos anos 1990 no estudo da inativação não-térmica de microrganismos presentes em alimentos. A primeira pasteurização comercial de alimentos usando PEF ocorreu em 2005 nos EUA (RAVISHANKAR; ZHANG; KEMPKES, 2008). Desde então, vários estudos vêm sendo realizados com aplicação desse tratamento em células vegetais, animais e em microrganismos, nas áreas de medicina, produção de alimentos, extração de compostos, entre outros.

Uma unidade de processamento PEF geralmente conta com uma câmara de tratamento PEF que pode operar em modo estático ou contínuo. Nesta câmara dois ou mais eletrodos conectados ao gerador ficarão em contato com a solução a ser tratada com pulsos elétricos. O sistema conta com quatro elementos principais: gerador do pulso, sistema de movimentação do fluido no caso de processo contínuo, e aparelhagem para monitoramento e controle, como de temperatura e pH, por exemplo (GALV; CARCIOCHI, 2018; JIN, 2016). Um esquema representativo da aparelhagem encontra-se na Figura 1.

Os parâmetros de processos associados com o gerador de pulso incluem a potência de saída, a forma, a largura, a frequência e a polaridade do pulso. Os parâmetros do pulso podem ser monitorados utilizando um osciloscópio acoplado ao sistema. As formas mais comumente usadas em tratamentos PEF são pulsos quadrados e pulsos com decaimento exponencial. A largura ou duração do pulso corresponde ao tempo que ele é sustentado na voltagem efetiva. A frequência é a taxa de repetição do pulso, dada em hertz (Hz) no SI. Os pulsos podem ser monopolares, quando todos os pulsos negativos ou positivos são usados, ou bipolares, quando metade dos pulsos são negativos e metade positivos. O tempo entre um pulso positivo e negativo é chamado tempo de atraso (JIN, 2017).

Figura 1- Representação esquemática da aparelhagem de tratamento PEF contínuo.



Fonte: Galv e Carciochi (2018).

A intensidade do campo elétrico (E) é outro parâmetro importante e está associado ao gerador de pulso (potência de saída) e ao design da câmara de tratamento. A unidade do SI é newtons por coulomb (N/C) ou volts por metro (V/m). Se um campo uniforme é usado, como o formado entre duas placas paralelas com diferença de potencial constante entre elas, a intensidade do campo elétrico pode ser obtida dividindo-se a tensão aplicada (U) pela distância entre os eletrodos (d), conforme Equação 1. Esta é a relação mais utilizada para estimar a intensidade do campo nos trabalhos com campos elétricos (JIN, 2017).

$$E = \frac{U}{d} \quad (1)$$

O tempo de tratamento corresponde ao tempo que o produto está exposto ao PEF e está associado com as características do pulso aplicado (largura, frequência) e número de câmaras de tratamento (JIN, 2017).

Outro parâmetro usado em estudos de PEF é o fornecimento de energia específico (W), expresso em kJ/kg, o qual depende da voltagem aplicada (U), corrente elétrica (I), largura efetiva do pulso (τ_c) e da massa na câmara de tratamento (M_c), conforme Equação 2 (JIN, 2017).

$$W = \frac{U \times I \times \tau_c}{M_c} \quad (2)$$

Mais recentemente surgiu uma derivação da técnica de PEF tradicional, na qual altas intensidades de campo elétrico (ordem de dezenas de kV/cm) com duração de nanossegundos (variando de poucos ns até 600 ns) são utilizadas para eletroporação. Referida frequentemente como campo elétrico pulsado em nanossegundo (nsPEF) a técnica tem demonstrado capacidade de penetração inclusive em estruturas internas à membrana celular (PAKHOMOVA et al., 2012; TEISSIE, 2017a).

Baseado na quantidade possível a ser processada, os equipamentos de PEF podem ser classificados como escala laboratorial, piloto ou industrial. A empresa Elea, na Alemanha, é

líder mundial no fornecimento de equipamentos PEF nas diferentes escalas para os setores de alimentos, bebidas e científico.

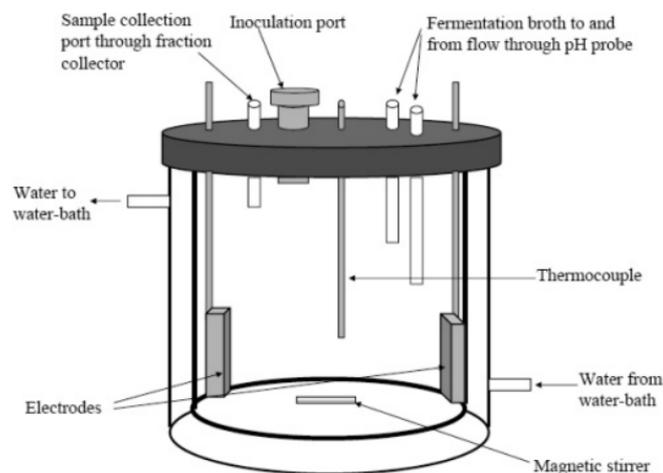
2.2 CAMPO ELÉTRICO MODERADO (MEF)

A tecnologia de campo elétrico moderado (MEF) consiste na aplicação de campo elétrico de frequência na ordem de 50 Hz e intensidade de até 1000 V/cm (KULSHRESTHA et al., 2008). A técnica emergiu da observação de efeitos não-térmicos na faixa de intensidades de campo elétrico dos processos de aquecimento ôhmico (OH), os quais são estudados na indústria de alimentos para inativação de microrganismos. No entanto, o MEF diferencia-se do aquecimento ôhmico por ter como objetivo a permeabilização controlada e, possivelmente, reversível das células tratadas, podendo ou não incluir aquecimento (SASTRY, 2004; SASTRY, 2009).

Nessa técnica a corrente elétrica flui pela amostra localizada entre dois eletrodos tipicamente em direção periodicamente reversa (CA) e sem interrupção por um período significativo de tempo. Parâmetros importantes nos estudos de MEF são a intensidade do campo, a frequência e a forma da onda (ROCHA et al., 2018).

Um sistema comumente utilizado em aplicações de MEF em escala laboratorial está representado na Figura 2. Basicamente, o equipamento é constituído por um vaso encamisado, dois eletrodos imersos na solução em seu interior, uma fonte de energia acoplada a sistema para modulação da frequência e geração da função de onda e a aparelhagem para aquisição de dados.

Figura 2 - Sistema de MEF em escala laboratorial.



Fonte: Loghavi; Sastry; Yousef (2008).

Campos elétricos moderados têm intensidades inferiores aos tratamentos com PEF. O tempo de exposição do produto ao MEF em geral é na ordem de minutos, já ao PEF é na ordem

de microssegundos. Tratamentos MEF que utilizam correntes alternadas são análogos aos tratamentos com sequências de pulsos. O número de pulsos por segundo é simplesmente a frequência (KULSHRESTHA et al., 2008).

A técnica MEF, em comparação a PEF, apresenta menor número de artigos publicados até então. É uma tecnologia cuja aplicação em processos fermentativos está sendo estudada mais recentemente.

2.3 FENÔMENOS ENVOLVIDOS NO ESTÍMULO CELULAR

A seção a seguir tratará dos principais fenômenos envolvidos durante o estímulo celular pela ação de campos elétricos. Vários mecanismos parecem estar envolvidos e alguns deles ainda carecem de pesquisa para a sua validação.

2.3.1 A membrana plasmática sob ação do campo elétrico: o fenômeno da eletroporação

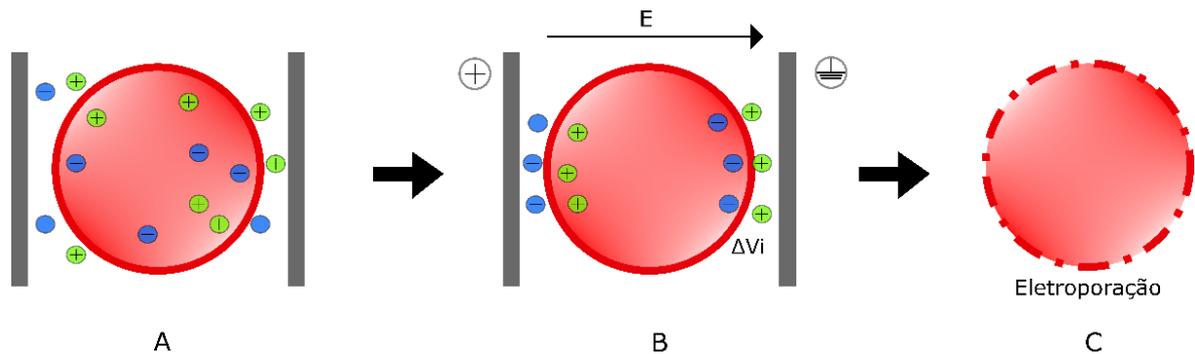
As membranas celulares dos microrganismos são estruturas semipermeáveis formadas por duas camadas lipídicas que contêm proteínas imersas. Esta estrutura, de cerca de 5 nm de espessura, tem comportamento flexível, próximo de um gel, e tem a função básica de separar o meio externo do meio citoplasmático interno da célula (IVORRA, 2010). Diferentes proteínas estão imersas na bicamada lipídica, algumas das quais agem como canais ou bombas, fornecendo um caminho para o transporte de moléculas através da membrana. Sem estas proteínas a membrana celular seria uma barreira praticamente impenetrável (KOTNIK et al., 2012).

Naturalmente, entre os dois lados de todas as membranas celulares existem íons livres, principalmente Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{+2} que são responsáveis por: (1) controlar o volume da célula através de forças osmóticas, (2) desempenhar um papel em diferentes processos metabólicos e de transdução de sinais e (3) criar um forte campo elétrico, na ordem de 10^7 V/m, entre os dois lados da membrana celular (PANAGOPOULOS et al., 2000). A diferença de potencial entre os dois lados da membrana devido a diferentes concentrações de cargas gera a chamada *voltagem transmembrana de descanso*, que está na ordem de 10 mV. Manter essa diferença de potencial é vital para a célula (PAGÁN; MAÑAS, 2006).

O citoplasma celular, bem como o ambiente externo às células, é um material condutivo eletricamente, enquanto a membrana celular é considerada um dielétrico. Assim, a estrutura formada pelo meio externo, membrana plasmática e meio interno é um condutor-dielétrico-condutor, fazendo com que uma célula imersa em um meio se comporte como um capacitor

(IVORRA, 2010). Deste modo, quando um campo elétrico externo é aplicado nas células ocorre o acúmulo de cargas livres sobre as duas interfaces da membrana, gerando um aumento do potencial transmembrana. Quando a voltagem induzida na membrana atinge um determinado limite ocorre um fenômeno de aumento de porosidade celular denominado *eletroporação* ou *eletropermeabilização* (PAGÁN; MAÑAS, 2006). A Figura 3 ilustra estes fenômenos.

Figura 3 - Célula suspensa em meio aquoso eletrolítico A) no potencial transmembrana de descanso e B) exposta a campo elétrico externo - surgimento de voltagem transmembrana induzida, C) que irá levar à eletroporação.



Fonte: adaptado de Martínez et al. (2020).

A eletroporação consiste em diferentes fases. A primeira delas é a formação do poro devido ao atingimento do potencial transmembrana limite, o que dura poucos microssegundos. A segunda fase é uma expansão do tamanho dos poros, que acontece numa faixa de centenas de microssegundos a milissegundos e permanece enquanto durar a aplicação do pulso. A terceira fase consiste no fechamento dos poros, que pode durar vários minutos ou até inexistir (KANDUSER; MIKLAVČIČ, 2008).

A parte da membrana plasmática que está permeabilizada pela ação do campo elétrico fornece um caminho para o transporte de diferentes moléculas para dentro e para fora da célula. Este fato possibilita a aplicação da eletroporação como um método para inserção de DNA, plasmídeos ou outras moléculas no interior de células eucariotas e procariotas. A quantidade de moléculas que passarão através da membrana celular depende do tamanho, propriedades e concentração extracelular das moléculas e do nível de permeabilidade adicional adquirida pela célula (PUC et al., 2003; CHEN et al., 2006).

Existem três mecanismos gerais para o transporte de substâncias através de membranas permeabilizadas: difusão, eletroforese e eletro-osmose. Uma vez que a membrana seja permeabilizada pela ação do campo elétrico, os três mecanismos podem contribuir para o transporte através da membrana. A extensão de cada um dos mecanismos vai depender do tipo de molécula transportada e dos parâmetros de campo elétrico aplicados (PUC et al., 2003).

2.3.2 Voltagem induzida na membrana celular

Uma célula sob a ação de um campo elétrico externo pode ser modelada como um capacitor esférico, pois o campo elétrico induz a redistribuição de cargas elétricas dos eletrólitos que circundam a membrana celular, induzindo a formação de um *potencial transmembrana* entre as duas faces da bicamada lipídica (TEISSIE, 2017b).

A diferença de potencial criada entre os dois lados da membrana (ΔV_i) pode ser expressa pela Equação 3 (TEISSIE, 2017b).

$$\Delta V_i (M, E, t) = -fg(\lambda)rE\cos(\theta(M)) \left(1 - e^{\left(-\frac{t}{\tau_m}\right)}\right) \quad (3)$$

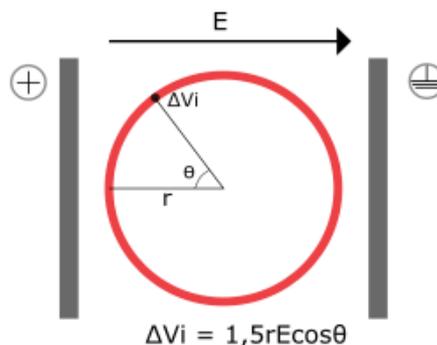
Onde M é o ponto considerado na célula, t é o tempo a partir do acionamento do campo elétrico, f é um fator de forma da célula ($f = 1,5$ para esfera), r é o raio da célula, E é a intensidade do campo elétrico, $\theta(M)$ é o ângulo entre a direção do campo e a normal à superfície da célula no ponto M , $g(\lambda)$ uma função complexa das condutividades (λ) da membrana e da solução externa e τ_m representa a constante de tempo característica da membrana.

Considerando a membrana como um puro dielétrico esférico, tem-se $g(\lambda) = 1$ e quando o estado estacionário é alcançado, como para pulsos com duração de milissegundos, $t \gg \tau_m$. Logo, a equação 2 pode ser simplificada à Equação 4, cuja representação dos termos pode ser observada na Figura 4 (TEISSIE, 2017b). Para células com geometrias diferentes da esférica, a equação para descrever a indução de potencial transmembrana é mais complexa ou até inexistente (IVORRA, 2010).

$$\Delta V_i (M, E) = -1,5rE\cos(\theta(M)) \quad (4)$$

Com essa equação é possível concluir que a maior amplitude ΔV_i em uma célula esférica de raio r sob a ação de uma campo externo E se dará quando $\theta(M) = 0$ ($\cos 0 = 1$) ou $\theta(M) = \pi$ ($\cos \pi = -1$), pois assim $\Delta V_i = |1,5rE|$.

Figura 4 - Representação dos termos da equação de Laplace para uma célula esférica submetida a um campo elétrico uniforme.



Fonte: adaptado de Martínez et al. (2020).

A voltagem transmembrana existente na célula será então a soma da voltagem de descanso (ΔV_0) e da voltagem induzida pela aplicação do campo elétrico ($\Delta V_i(M, E)$) (Equação 5) (TEISSIE, 2017b).

$$\Delta V(E) = \Delta V_0 + \Delta V_i(M, E) \quad (5)$$

A partir das equações se pode deduzir que a intensidade do campo elétrico externo para atingir o limite do potencial transmembrana é inversamente proporcional ao raio da célula. Desta forma, a intensidade do campo elétrico para induzir a eletroporação em pequenas células microbianas é maior do que o requerido para as largas células vegetais e animais (VOROBIEV; LBOVKA, 2017). Do mesmo modo, bactérias requerem maiores intensidades de campo elétrico (5 – 20 kV/cm) do que leveduras (1 – 12 kV/cm) para sofrerem eletroporação (MARTÍNEZ et al., 2020; KOTNIK et al., 2015).

Outro efeito observado é que a eletroporação não será uniforme na membrana. Em particular, as áreas da membrana voltadas para os eletrodos, isto é, perpendiculares à direção do campo, vão experimentar maiores voltagens transmembrana, e desta forma, serão mais facilmente eletroporadas (ZIMMERMANN; PILWAT; RIEMANN, 1974).

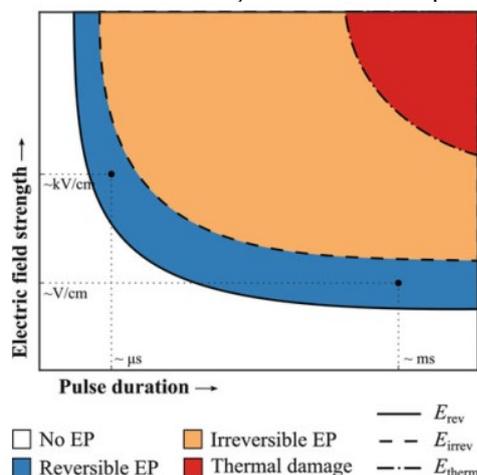
O fenômeno da eletroporação pode ser reversível ou irreversível, a depender dos parâmetros dos pulsos elétricos aplicados. A voltagem transmembrana induzida pelo campo elétrico externo deve atingir um valor crítico para desencadear a formação de poros transientes na membrana celular. Se este valor crítico é excedido, ocorre a formação de poros irreversíveis, o que causa desintegração da membrana e perda de viabilidade celular (KANDUSER; MIKLAVČIČ, 2008).

Kranjc e Miklavcic (2017) apresentam que a exposição das células ao campo externo (E_{ext}) pode levar a quatro diferentes resultados baseados em três intensidades de campo elétrico limites: campo elétrico limite para eletroporação reversível (E_{rev}), campo elétrico limite para eletroporação irreversível (E_{irrev}) e campo elétrico limite para desestruturação térmica (E_{term}).

1. $E_{ext} < E_{rev}$: não ocorre eletro permeabilização da membrana.
2. $E_{rev} < E_{ext} < E_{irrev}$: a permeabilização temporária da membrana é estabelecida. O campo ainda é inferior ao limite de eletroporação irreversível, assim as células permanecem viáveis após o fim da exposição ao campo elétrico.
3. $E_{irrev} < E_{ext} < E_{term}$: a permeabilização permanente da membrana leva à saída de conteúdo intracelular e à morte. Ainda não há presença de dano térmico.
4. $E_{ext} > E_{rev}$: o campo elétrico estabelece altas correntes elétricas, o que causa aumento de temperatura e danos à célula.

Não apenas a intensidade do campo elétrico aplicado como também a duração do pulso exerce influência no tipo de eletroporação que irá se estabelecer. A Figura 5 representa graficamente esta relação.

Figura 5 – Eletroporação (EP) não detectável, reversível, irreversível e danos térmicos em função da intensidade do campo e duração do pulso. Dois pontos estão destacados, os quais resultam em eletroporação reversível em duas combinações diferentes de parâmetros.



Fonte: Kranjc e Miklacic (2017).

A eletroporação tem se tornado uma ferramenta importante na biotecnologia e medicina. A eletroporação reversível é um método estabelecido para inserção de drogas quimioterápicas em células tumorosas (eletroquimioterapia), além de ser usada para inserção de DNA, RNA e proteínas no interior das células sem causar sua deterioração. A eletroporação irreversível, por sua vez, tem emergido como uma alternativa não térmica para preservação de alimentos e extração de compostos de interesse do meio intracelular (KOTNIK et al., 2012; CHEN et al., 2006; PAGÁN; MAÑAS, 2006).

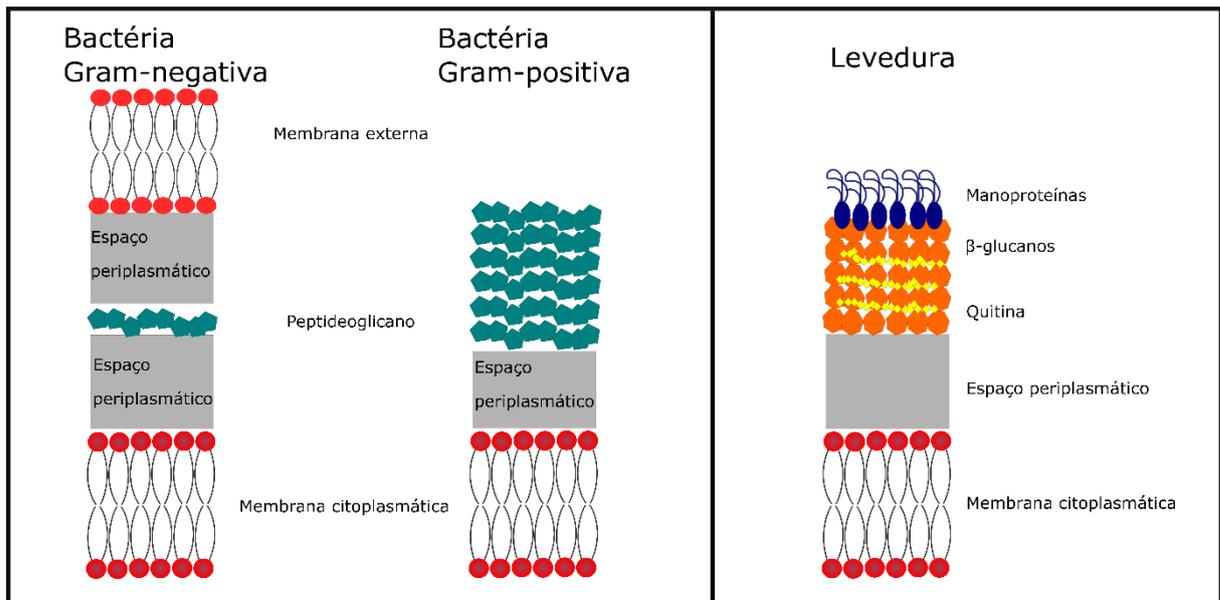
2.3.3 Estrutura celular de bactérias e leveduras

Diferentemente de maioria das células eucariotas, onde a membrana citoplasmática é a única estrutura que separa o conteúdo da célula e o meio extracelular, em microrganismos, como bactérias e leveduras, estão presentes outras estruturas externamente à membrana. A Figura 6 contém uma representação da estrutura celular que delimita bactérias e leveduras.

Bactérias classificadas como gram-negativas apresentam duas estruturas acima da membrana citoplasmática: uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa. Esta última camada difere da membrana interna por ser composta de lipopolissacarídeos, os quais conferem especial resistência contra algumas substâncias, tais como antibióticos e bactericidas. Bactérias gram-positivas, por outro lado, apresentam parede celular formada por uma larga

camada de peptidoglicano e ácido teicóico externa à membrana. Tal camada confere rigidez e resistência física para a célula (PAGÁN; MAÑAS, 2006). A espessura do envelope de bactérias gram-positivas altera-se de acordo com a espécie, podendo variar entre 10 e 100 nm (RAUCH; LEIGH, 2015). As bactérias gram-negativas, por sua vez, têm envelope celular com espessura de, em média, 35 nm (ZERBIB, 2017).

Figura 6 - Representação simplificada do envelope celular de bactérias e leveduras.



Fonte: adaptado de Martínez et al. (2020).

As leveduras, por outro lado, apresentam parede celular com espessura de cerca de 100 a 200 nm (GONZALEZ et. al, 2009 *apud* GANEVA; GALUTZOV; TEISSIE, 2014)¹. A estrutura do envelope de leveduras varia de acordo com a espécie, condições do meio e fase de crescimento. Tomando-se a *S. cerevisiae*, observa-se que a parede celular é composta por manoproteínas e polissacarídeos fibrosos (β -glucanos, principalmente), além de apresentarem quitina como componente minoritário. O conteúdo é empacotado de forma densa e limita a permeabilidade a solutos, além de proporcionar resistência celular (LIPKE; OVALLE, 1998).

O periplasma ou espaço periplasmático é uma matriz aquosa que preenche o espaço entre as camadas do envelope celular de bactérias e leveduras. Esta região é rica em proteínas, como enzimas de degradação, proteínas de ligação e chaperonas (ZERBIB, 2017).

Enquanto a membrana citoplasmática age como uma barreira seletiva para a difusão de solutos e regulação de transporte de íons, a parede celular é uma barreira que, via de regra,

¹ GONZALEZ, M., DE GROOT, P.W.J., KLIS, F.M., & LIPKE, P.N. (2009). In: *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance, and Applications* (A. Moran, P. Brennan, O. Holst, & F.von Itzstein, eds), Academic press, pp. 169–183 *apud* GANEVA; GALUTZOV; TEISSIE, 2014.

permite a passagem de íons e de moléculas relativamente pequenas, mas limita a passagem de macromoléculas (GANEVA; GALUTZOV; TEISSIE, 2014).

A grande variedade de protocolos de parâmetros que existem para eletroporação de células é, em grande parte, resultado das diferentes estruturas que compõem o envelope celular. Mesmo que o principal interesse da aplicação do campo elétrico seja permeabilizar a membrana, toda a estrutura de envelope celular deve ser levada em conta para avaliar a efetividade global do campo elétrico (ZERBIB, 2017).

Tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas podem sofrer a eletroporação, sendo que as gram-positivas geralmente necessitam de intensidades de campo elétrico superiores ou apresentam eficiências mais baixas como resultado de sua espessa camada de peptidoglicano. A eletrotransformação, isto é, a captação artificial de DNA induzida por eletroporação, por exemplo, vem sendo realizada com sucesso em bactérias e leveduras, sem necessidade de remoção prévia de parede celular (KOTNIK, 2017).

Alterações na parede celular de leveduras tratadas com PEF são propostas como causa para a liberação de macromoléculas para o meio extracelular (KANDUSER; MIKLAVČIČ, 2008). Adicionalmente, o aumento de porosidade da parede celular de leveduras foi observado por Ganeva et al. (2014) através de imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Proteínas puderam ser extraídas do espaço periplasmático de *Escherichia coli* recombinante (gram-negativa) com o tratamento PEF. A membrana externa sofreu eletroporação, causando a liberação das proteínas do periplasma para o meio externo, ao passo que a membrana interna permaneceu preservada (SHIINA; OHSHIMA; SATO, 2004).

Vale ressaltar, entretanto, que os mecanismos de permeabilização das diferentes estruturas acima da membrana citoplasmática (camada de peptidoglicano, camada de β -glucanos) dos microrganismos não estão totalmente compreendidos até o momento. Rauch e Leigh (2015) propuseram uma teoria da formação de poros na parede celular de bactérias gram-positivas sob ação de um campo elétrico. Os autores sugerem que a parede de peptidoglicano pode romper através de um mecanismo de cavitação por ação de repulsão entre constituintes presentes na parede celular.

A membrana lipídica é considerada o principal agente no processo de eletropermeabilização. Desta forma, a maior parte do entendimento dos mecanismos básicos de eletroporação tem sido conseguida através de experimentos com modelos de sistemas lipídicos (KOTNIK et al., 2019).

2.3.4 Modelo da formação de poros aquosos

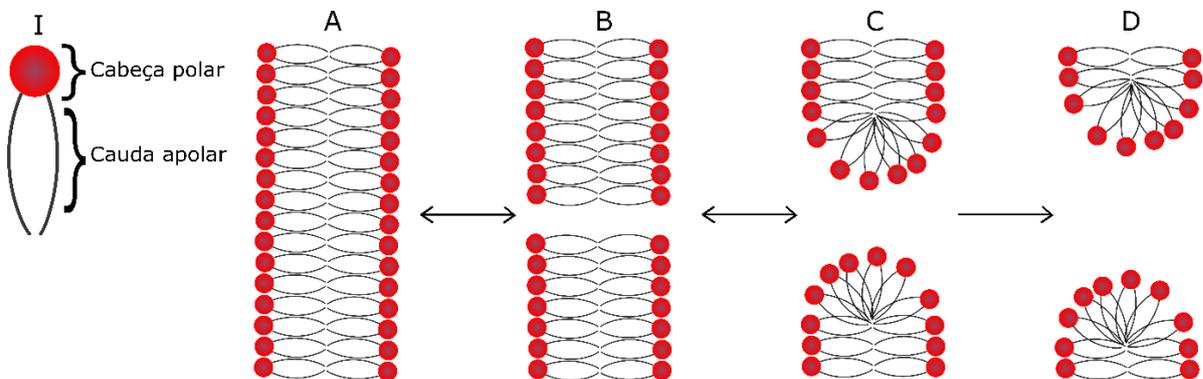
O modelo mais amplamente aceito atualmente para explicar o mecanismo de permeabilização da membrana celular à nível molecular é a teoria da formação de poros hidrofílicos ou aquosos (KOTNIK et al., 2019). Há evidências de que em certas condições de temperatura e tensão superficial, poros aquosos muito pequenos podem naturalmente surgir nas células. Tais poros tem raios menores que um nanômetro e persistem por menos de um nanosegundo. São formados e desfeitos devido às flutuações térmicas e mecânicas, sendo inerentemente instáveis (KOTNIK et al., 2012).

Segundo a teoria de formação de poros hidrofílicos (GLASER et al., 1988), um campo elétrico externo aplicado à membrana celular fornecerá energia para induzir uma voltagem através da membrana e reduzir a energia necessária para a formação espontânea de poros. Esse fenômeno facilita a formação de um grande número de poros, os quais são mais estáveis do que aqueles formados na ausência do campo elétrico externo. O tempo de duração de tais poros, após a remoção do campo, pode ser de milissegundos a minutos (KOTNIK et al., 2012).

No primeiro estágio, os poros formados são inicialmente pequenos e hidrofóbicos, pois as caudas lipídicas ficam voltadas para o meio aquoso. Se estes defeitos se estendem a um raio de 0,3 a 0,5 nm, os lipídios se reorientam formando um canal aquoso ou poro hidrofílico (GLASER et al., 1988). A Figura 7 apresenta um esquema deste fenômeno.

Simulações de dinâmica molecular fornecem as primeiras evidências visuais a nível-molecular de que o campo elétrico promove a formação de poros hidrofílicos em membranas celulares e confirma algumas das principais hipóteses de mecanismos de eletroporação desenvolvidas ao longo das últimas décadas (REMS, 2017).

Figura 7 - I) Molécula de fosfolipídio. A) Membrana plasmática sem poros, B) com um poro hidrofóbico, C) transição reversível para um poro hidrofílico; D) transição irreversível para um poro hidrofílico instável em expansão.



Fonte: adaptado de Kotnik et al. (2012).

2.3.5 Efeito nas proteínas de transporte presentes na membrana

Estudos sugerem que as proteínas presentes na membrana celular são também afetadas pelo campo elétrico, particularmente os canais iônicos dependentes de voltagem (KOTNIK et al., 2019). Uma pesquisa recente usou simulações dinâmicas moleculares e mostrou o envolvimento dos canais iônicos dependentes de voltagem na formação dos poros e na condução de íons em membranas sob ação de campos elétricos pulsados. Poros mais complexos do que os poros hidrofílicos (puramente lipídicos) são formados com a presença de tais proteínas na membrana e estes poros demonstram-se mais estáveis, isto é, levam mais tempo para selar do que os poros hidrofílicos, permitindo o enriquecimento do transporte de espécies. As simulações mostraram alterações de dobramento dos domínios sensores de voltagem dos canais de proteínas, o que os torna disfuncionais (REMS et al., 2020).

Os resultados obtidos por Ewe et al. (2012) condizem com o estudo citado acima. Em seu trabalho com lactobacilos tratados com PEF, foi verificada a falta de dobramento conformacional de proteínas da membrana com a eletroporação, acarretando o aumento da rigidez da membrana na interface lipídio-proteína e subsequente permeabilização da estrutura. Tal alteração permite a criação de canais transientes na membrana celular, que fornecem um caminho para a transferência de moléculas, o que pode promover o crescimento dos lactobacilos.

Estudos sobre o efeito das proteínas presentes na membrana plasmática são ainda pouco numerosos. O mecanismo pelo qual o campo elétrico poderia afetar tais moléculas permanece pouco entendido (KOTNIK et al., 2019).

2.3.6 Propriedades da membrana: permeabilidade e peroxidação lipídica

Além de aplicação do campo elétrico acarretar a formação de poros hidrofílicos na membrana, a indução de alterações químicas nos lipídeos é outro mecanismo comprovado decorrente deste processo (KOTNIK et al., 2019). A aplicação de pulsos elétricos pode levar à formação de espécies oxigênio reativas (EOR) de forma intercelular, como uma resposta de defesa global da célula ao estresse causado na membrana. Fatores como intensidade e duração do pulso serão influentes, pois quanto maior o nível de permeabilização, mantendo a célula viável, maior a geração de EOR. Tais espécies vão ter um papel importante na permeabilização de membranas celulares, pois irão reagir com os hidrogênios da ligação dupla das cadeias lipídicas da membrana, na chamada reação de peroxidação lipídica. Como resultado, a

membrana citoplasmática irá adquirir menor fluidez, o que aumenta a fragilidade da membrana à eletroporação (TEISSIE, 2017a).

Além disso, se o campo elétrico aplicado em uma suspensão celular tiver intensidade e duração suficientes para provocar reações eletroquímicas próximas aos eletrodos, pode haver geração extracelular de EORs. Pakhomova et al. (2012) observaram tal efeito na aplicação de nsPEF com pulsos de 50, 100, 200, ou 300 ns a 4,9 ou 9,8 kV/cm, 1 ou 0,3 Hz a uma solução livre de células. Foi verificada maior geração de EOR para os pulsos mais intensos e com maior espaçamento (0,3 Hz) e formação de H₂O₂ neste meio. Todavia, não foram detectadas EOR quando a solução foi tratada com pulsos mais longos, que são geralmente usados em processos PEF convencionais.

Yeo e Liong (2012) verificaram que a peroxidação lipídica em lactobacilos e bifidobactérias aumentou significativamente com o tratamento PEF. A peroxidação lipídica da membrana foi diretamente proporcional à intensidade do campo elétrico (3,5 a 7,5 kV/cm) e tempo de tratamento (3 a 4 ms), sendo 62,5% maior em comparação ao grupo sem tratamento.

Outro estudo sobre eletroporação reversível em lactobacilos apresentou resultados semelhantes. Ewe et al. (2012) verificaram que o aumento da intensidade (faixa de 2,5 a 7,5 kV/cm) e duração (3 a 4 ms) do campo elétrico levou ao aumento da peroxidação lipídica da membrana dos lactobacilos. De fato, o estresse oxidativo induzido pelo campo elétrico acarretou a redução do conteúdo de ácidos graxos insaturados, o que fez o compartimento lipídico das membranas tratadas tornar-se mais rígido do que o das células não tratadas.

A permeabilidade de bicamadas lipídicas aos íons aumenta em várias ordens de magnitude com o aumento do conteúdo de lipídeos peroxidados. Lipídios oxidados são de longe mais permeáveis do que seus análogos não oxidados e são propensos à formação espontânea de poros, o que enriquece a susceptibilidade da membrana à eletroporação por campos elétricos (KOTNIK et al., 2019).

Uma outra abordagem trata da influência da presença de espécies oxidadas na membrana previamente à aplicação de PEF. Utilizando-se de simulação de dinâmica molecular de bicamadas lipídicas e experimentos com células vivas, Vernier et al. (2009) demonstrou o aumento de sensibilidade à eletropermeabilização de células com danos oxidativos. Seus estudos mostraram que a incorporação de lipídios oxidados em bicamadas fosfolipídicas aumentam a permeabilidade de água nestas áreas oxidadas, sendo que em todas suas simulações os poros inevitavelmente se formaram associados com um ou mais lipídios oxidados. Como as etapas iniciais da eletroporação envolvem a intrusão de moléculas de água no interior da bicamada, conforme o modelo de poros aquosos, a membrana passa a ser mais permeável à

água se contém espécies oxidadas, sendo o lugar da iniciação do poro especificamente associado às moléculas de lipídios oxidadas (VERNIER et al., 2009).

Assim, mudanças no ambiente em que a célula está inserida, como a criação de um meio mais oxidativo, tem potencial para facilitar a eletroporação. Espera-se então que um ambiente com características redutivas teria a capacidade de proteger a célula da eletroporação (VERNIER et al., 2009). Esta é uma descoberta interessante para auxiliar no entendimento dos fenômenos de estresse oxidativo e gerar processos de permeabilização mais eficientes através da modificação oxidativa das propriedades da membrana.

2.4 PRINCIPAIS TRABALHOS PUBLICADOS SOBRE A UTILIZAÇÃO DE PEF E MEF EM NÍVEIS SUBLETAIS

Na Tabela 1 estão apresentados os artigos científicos relacionados à utilização de PEF e MEF para estímulo de bactérias e leveduras. Os resultados destes trabalhos com respeito aos fenômenos observados e parâmetros de processo adotados serão discutidos nesta seção.

Conforme os critérios de busca de artigos descritos anteriormente, foram encontradas 22 publicações, dentro das quais 18 envolvem bactérias, com destaque ao estudo de bactérias lácticas, o que pode indicar o interesse de utilização destas tecnologias em processos fermentativos na indústria de alimentos. Além disso, pode-se observar que o número de estudos publicados com aplicação de tratamentos PEF é consideravelmente maior do que os trabalhos envolvendo MEF (18 contra 4).

Ao total, 13 estudos avaliaram o efeito de diferentes intensidades de campo elétrico, 14 estudos verificaram a influência da duração do tratamento (seja através de diferentes larguras de pulsos, número de pulsos, ou tempo total) e 4 estudos analisaram o efeito da frequência da onda. Ainda, 13 artigos estudaram a aplicação em etapas distintas do crescimento celular e 6 estudos aplicaram o campo no inóculo, previamente à fermentação. A temperatura do tratamento é um fator crítico para o desenvolvimento dos microrganismos, por isso, ela foi mantida sob controle nos estudos avaliados.

Com relação à aparelhagem utilizada para os experimentos com PEF, dos 18 estudos que empregaram a técnica, 6 utilizaram eletroporadores de laboratório, também chamados de Gene Pulser ou Micro Pulser. Os demais realizaram montagem de aparelhagem própria ou equipamentos em escala piloto, com operação tanto de forma contínua quanto estática.

Vale esclarecer que o termo fermentação neste trabalho segue a definição biotecnológica, na qual fermentação se refere a qualquer transformação intermediada por um

microrganismo através de uma sequência de reações bioquímicas, visando à obtenção de um produto de interesse. Do ponto de vista bioquímico, por outro lado, o termo fermentação define um processo de degradação de um substrato, efetuado pela célula microbiana, a fim de produzir energia (ATP), sob condições anaeróbicas.

2.4.1 Estresse oxidativo, expressão de genes, rotas metabólicas e tamanho celular

Células comumente se deparam com alterações físicas e químicas no ambiente ao seu redor. Estes estímulos acarretam mudanças da fisiologia e do comportamento celular, tais como expressão genética, metabolismo, proliferação, diferenciação e morte. Quando os estímulos têm efeito adverso são denominados estresse celular (YANO; MOROTOMI-YANO, 2017).

A análise da abundância de transcrição em vários genes ligados ao aquecimento e à oxidação em *S. cerevisiae* apontou que estresse térmico e PEF apresentam efeitos diferentes. A aplicação de PEF induziu efeitos de oxidação, não sendo notados efeitos térmicos. A hipótese é de que a eletroporação da membrana plasmática induzida pelo PEF acarreta invasão de materiais extracelulares para o interior da célula, o que pode levar à ativação de sistemas de defesas bioquímicos, que inclui a ativação da resposta à oxidação (TANINO et al., 2012).

Além disso, o campo elétrico pode ter influência na regulação da biossíntese de compostos por alguns microrganismos. Guo et al. (2016) observaram o enriquecimento da produção de avermectina ao tratar as células com nsPEF previamente à fermentação. Os autores observaram também, que além do aumento do crescimento celular, o campo elétrico também atuou na regulação direta da biossíntese do composto. Ao avaliar a mudança na expressão de três genes intimamente associados à produção de avermectina, verificaram que dois deles foram enriquecidos durante as fermentações no qual as células foram tratadas com PEF, levando então a maior produção do composto de interesse.

A aplicação de campo elétrico pode causar alteração nas rotas metabólicas preferencias de alguns microrganismos, como uma resposta ao estresse causado por este estímulo. O crescimento celular pode ser adotado como uma rota preferencial à produção de determinado produto de interesse, como observado por Al Daccache et al. (2020b) em seu estudo de fermentação alcoólica de suco de maçã com objetivo de redução do conteúdo de etanol. Os pesquisadores sugerem que o balanço $NAD^+/NADH$, essencial para a etapa de glicólise na formação de etanol, pode ser afetado pelos efeitos do campo elétrico nestas moléculas carregadas eletricamente.

Tabela 1 - Principais trabalhos publicados sobre a utilização de PEF e MEF com objetivos subletais em bactérias e leveduras.

Referência	Microrganismo	Fase em que a célula foi tratada	Tecnologia	Intensidade do campo	Largura do pulso; tempo de tratamento e/ou n° de pulsos; frequência	Temperatura do cultivo ou tratamento (°C)
Bactérias						
SHIINA; OHSHIMA; SATO, 2004	<i>Escherichia coli</i> HB101/pHI301A	Desde o início do cultivo; a partir do meio da fase logarítmica; ou a partir do início da fase estacionária.	PEF	24 kV/cm	30 min; 2 Hz	37 °C
LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2007	<i>Lactobacillus acidophilus</i> OSU 133	Durante toda a fermentação ou apenas início.	MEF	1 V/cm	40 h ou 5 h; 60 Hz	30 °C e 37 °C
LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2008	<i>Lactobacillus acidophilus</i> OSU 133	Durante toda a fermentação ou na fase inicial.	MEF	1 V/cm	40 h ou 5 h; 45, 60 ou 90 Hz	30 °C e 37 °C
TRYFONA; BUSTARD, 2008	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Exponencial inicial, média e tardia, além de estacionária inicial.	PEF	2– 12,5 kV/cm	1 - 3 ms; 3 pulsos	30 °C
LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2009	<i>Lactobacillus acidophilus</i> OSU 133	Fase lag, exponencial ou estacionária.	MEF	2 V/cm	2, 6 ou 20 h; 45, 60, 1.000 ou 10.000 Hz	30 °C
LYE et al., 2011	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BT 1088, <i>L. acidophilus</i> FTCC 0291, <i>L. bulgaricus</i> FTCC 0411, <i>L. bulgaricus</i> FTDC 1311 e <i>L. casei</i> BT 1268	Inóculo	PEF	2,5, 5,0 ou 7,5 kV/cm	3,0, 3,5 ou 4 ms	37 °C
YEO; LIONG, 2012	<i>Bifidobacterium sp.</i> FTDC 8943 e <i>Bifidobacterium longum</i> FTDC8643, <i>Lactobacillus casei</i> FTDC2113 e <i>Lactobacillus casei</i> BT 1268	Inóculo	PEF	2,5; 5,0 ou 7,5 kV/cm	3,0, 3,5 ou 4,0 ms	37 °C

Continua na página seguinte

Tabela 1 (continuação)

Referência	Microrganismo	Fase em que a célula foi tratada	Tecnologia	Intensidade do campo	Largura do pulso; tempo de tratamento e/ou n° de pulsos; frequência	Temperatura do cultivo ou tratamento (°C)
EWE et al., 2012	<i>Lactobacillus casei</i> BT 1088, <i>Lactobacillus fermentum</i> BT 8219, <i>L. casei</i> BT 8633 e <i>Lactobacillus gasseri</i> FTDC 8131	Inóculo	PEF	2,5; 5,0 ou 7,5 kV/cm	3,0, 3,5 ou 4,0 ms	37 °C
KRIEGER et al., 2013	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	Início ou final da fase exponencial.	PEF	7, 10, 15, 20 kV/cm	1.738 - 10.426 pulsos; 24 - 144 Hz	37 °C
NAJIM; ARYANA, 2013	<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> LB-12 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-K	Inóculo	PEF	1 kV/cm	3 µs; 2 Hz	40,5 °C
HABERL MEGLIC; MAROLT; MIKLAVCIC, 2015	<i>Escherichia coli</i>	Fase estacionária	PEF	5, 10, 20 kV/cm	100 µs ou 1 µs; 8 ou 32 pulsos; 1 Hz, 1 kHz	22 °C
HABERL-MEGLIČ et al., 2016	<i>Escherichia coli</i> K12 TOP10	Início da exponencial, meio da exponencial ou estacionária	PEF	5 kV/cm	1 ms; 8 pulsos; 1 Hz	4, 22, 37, 45 °C
GUO et al., 2016	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Inóculo	PEF	5 - 30 kV/cm	100 ns; 20 ou 100 pulsos	20 - 23 °C
OHBA; UEMURA; NABETANI, 2016	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	A partir do meio da fase exponencial, em diferentes intervalos.	PEF	7 - 11 kV/cm	1µs; 150 - 400 pulsos	25 °C
GÓRAL et al., 2018	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> B 442, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1937 e <i>Lactococcus lactis</i> JBB 500	Após 24 h de incubação.	PEF	2 kV/cm	20 µs; 15 min; 1 Hz	30 e 37 °C
CHANOS et al., 2020	<i>Streptococcus thermophilus</i> DIL 5218 e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSMZ 20081T	Inóculo	PEF	1 ou 3,67 kV/cm	5 ou 50 pulsos; 0,5 ou 4 Hz	42 °C
PANKIEWICZ et al., 2020	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> B 442	Após 8, 12, 16, 20, ou 24 h de incubação.	PEF	3 kV/cm	75 µs; 10min; 1 Hz	37 °C

Continua na página seguinte

Tabela 1 (continuação)

Referência	Microrganismo	Fase em que a célula foi tratada	Tecnologia	Intensidade do campo	Largura do pulso; tempo de tratamento e/ou n° de pulsos; frequência	Temperatura do cultivo ou tratamento
Leveduras						
CASTRO et al., 2012	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante	Durante todo o processo fermentativo.	MEF	0,5, 1,0 ou 2,0 V/cm	< 30 h; 50 Hz	30°C
MATTAR et al., 2014	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Durante a fase lag ou após a fase lag.	PEF	20 - 2.000 V/cm	10 ⁻⁵ a 1 s	30°C
MATTAR et al., 2015	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inóculo	PEF	100 - 6.000 V/cm	100 µs; 1.000 pulsos	30°C
AL DACCACHE et al., 2020a	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Lag e logarítmica, lag e início da exponencial ou logarítmica	PEF	72 - 285 V/cm	100 µs; 5,36 ou 10,72 s	30 °C
AL DACCACHE et al., 2020b	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Lag, logarítmica, inóculo ou inóculo e logarítmica	PEF	285 V/cm	100 µs; 10,72, 21,43 ou 32,15 s	30 °C

Fonte: a autora (2020).

Castro et al. (2012) estudaram o efeito do campo elétrico na conversão de substrato por *S. cerevisiae* crescendo em lactose. Eles verificaram que, enquanto o rendimento de β -galactosidase aumentou com o aumento da intensidade do campo elétrico, o rendimento do etanol diminuiu, possivelmente devido a uma mudança em direção ao metabolismo respiratório, no qual o acúmulo de biomassa é favorecido, ao invés da produção de etanol.

O estímulo de microrganismos com campos elétricos pode influenciar as características dos metabólitos sintetizados. O estudo de Ohba, Uemura e Nabetani, (2016) demonstrou que, embora os exopolissacarídeos produzidos com tratamento PEF tenham apresentado mesma composição do que o da fermentação convencional, a massa molecular dos compostos foi reduzida. Tal fato aponta uma alteração no mecanismo de síntese com a aplicação do campo elétrico. Os autores postulam que as forças eletrostáticas do campo elétrico sobre moléculas negativamente carregadas envolvidas na biossíntese de tais compostos podem ter levado à liberação imatura dos polissacarídeos.

Outro efeito do campo elétrico sobre as células é a alteração do tamanho celular. Os resultados, entretanto, são contraditórios, pois alguns estudos apontam para o encolhimento celular (KRIEGER et al., 2013; MATTAR et al., 2014) com a aplicação do campo elétrico e outros reportam o aumento (AL DACCACHE et al., 2020a).

Condições de estresse por PEF aplicada no início e ao fim da fase exponencial de crescimento de *Lactobacillus johnsonii* apontaram alterações no tamanho das células quando comparado a um grupo controle. A aplicação de campo elétrico levou ao encolhimento dos microrganismos, sendo mais significativo quando o tratamento foi aplicado no início da fase log e quando a maior intensidade do campo foi aplicada (KRIEGER et al., 2013). Resultado semelhante foi encontrado em células de *S. cerevisiae*. A aplicação do campo elétrico diminuiu o diâmetro das células, quando comparado ao grupo sem tratamento. Maior a intensidade do campo, menor o diâmetro verificado. Células tratadas durante a fase inicial tiveram maior redução de tamanho do que as tratadas ao final da fase lag (MATTAR et al., 2014).

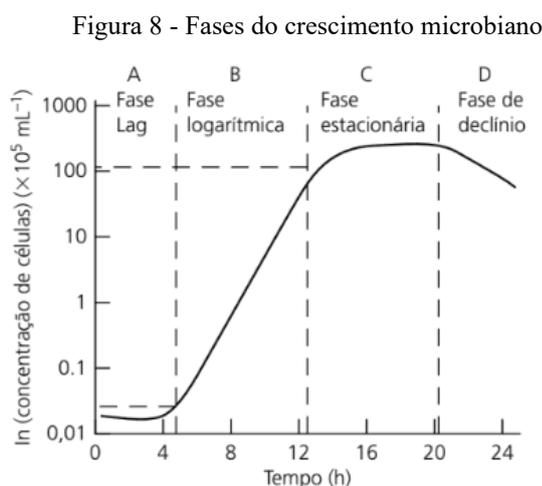
O menor valor de diâmetro celular pode refletir mais alta atividade celular de consumo de nutrientes. O tamanho da cultura em crescimento é definida por limitações difusivas de nutrientes e alta densidade local de células (MATTAR et al., 2014). Por outro lado, Al Daccache et al. (2020a) observaram o aumento significativo do tamanho de células da levedura *Hanseniaspora* sp. após o tratamento PEF.

Portanto, com os estudos até aqui publicados, não se pode generalizar os efeitos do campo elétrico sobre o tamanho das células. Os resultados encontrados são fortemente

dependentes da espécie e gênero do microrganismo, das condições de cultivo escolhidas, dos parâmetros do campo elétrico, entre outros fatores.

2.4.2 Fase de crescimento do microrganismo para aplicação do tratamento

As fases que podem ocorrer em um cultivo descontínuo de um microrganismo estão apresentadas na Figura 8 e descritas a seguir, conforme Hiss (2009, p. 26–32).



Fonte: Fellows (2018, p. 64).

Fase lag: o nome da fase vem da língua inglesa, na qual *lag* significa atraso, defasagem. Representa um período de adaptação do microrganismo transferido de um pré-cultivo para um novo meio, no qual ocorre a síntese de enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes deste meio. Sua duração varia conforme a idade do microrganismo, estado fisiológico e concentração. É de interesse prático minimizar a sua duração a fim de aumentar a produção por hora de biomassa ou de outro composto de interesse comercial ou científico.

Fase logarítmica ou exponencial: ocorre a fissão celular. A lei de crescimento exponencial é universal, válida para todos os microrganismos procarióticos e eucarióticos. A velocidade específica de crescimento apresenta o valor máximo e constante nesta fase. Diferentes espécies de microrganismos apresentam diferentes tempos de duplicação, o qual também é função da composição do meio e da temperatura.

Fase estacionária: a concentração de biomassa atinge seu valor máximo e constante devido ao equilíbrio entre a velocidade de crescimento e morte. A exaustão de nutrientes, a presença de inibidores e o fornecimento de algum estresse ao meio, tal como cisalhamento, resfriamento brusco ou alta temperatura, acarreta o surgimento desta fase. No entanto, a resistência do microrganismo a estes agentes é maior nesta fase do que na fase logarítmica, o

que indica diferença de estrutura celular entre ambos os estados. Esta fase pode ter a duração muito curta ou até inexistir.

Fase de declínio: ocorre autólise ou rompimento das células por ação de enzimas intracelulares.

A composição da membrana plasmática bem como sua rigidez são alteradas em função das condições de crescimento celular, como temperatura de incubação, composição do meio e fase de crescimento (TRYFONA; BUSTARD, 2008). Portanto, a etapa de crescimento celular escolhida para aplicação do campo elétrico terá diferentes efeitos nos microrganismos. Alguns estudos aplicam campo elétrico no inóculo previamente ao processo fermentativo, enquanto outros avaliam o tratamento com campos elétricos durante as fases de crescimento celular.

Al Daccache et al. (2020b) testaram diferentes tratamentos em leveduras: a) PEF durante a fase lag b) PEF durante a fase logarítmica c) PEF no inóculo seguido de fermentação convencional e d) PEF no inóculo e na fase logarítmica de fermentação. A velocidade específica máxima de crescimento celular teve maior aumento (10 vezes) com o tratamento PEF durante a fase lag (caso a), o que proporcionou redução de dez horas para atingimento da fase estacionária. O segundo maior aumento (3,3 vezes) foi com o tratamento aplicado no inóculo (caso c). Neste mesmo estudo, é interessante observar que, embora uma mesma quantidade de energia tenha sido usada para o estímulo do cultivo durante a fase lag (caso a) e durante a fase logarítmica (caso b), os impactos na cinética de reação foram consideravelmente diferentes, com a taxa de fermentação significativamente maior para as células tratadas durante a fase lag. Estas observações podem ser explicadas pela extensão da eletroporação atingida pela célula em cada fase de crescimento.

O estudo de Mattar et al. (2014) mostrou que, para uma mesma intensidade de campo e tempo efetivo de tratamento de suspensões de *S. cerevisiae*, a permeabilização celular foi maior para a amostra tratada com campo elétrico durante a fase lag do que após o final da fase lag de crescimento.

O trabalho de Loghavi, Sastry e Yousef (2009) teve resultados semelhantes. A aplicação de campos elétricos moderados (MEF) em *Lactobacillus acidophilus* levou à maior permeabilização celular quando o tratamento foi realizado na fase lag. Em relação à aplicação na fase logarítmica ou na estacionária, a maior permeabilização foi atingida com estímulo na fase logarítmica de crescimento.

De forma geral, células são mais permeáveis na fase lag, algumas na exponencial, mas praticamente não o são na fase estacionária. Esta observação pode ser resultado do aumento da concentração de proteínas em relação aos lipídios na membrana, à medida que a célula

envelhece. O aumento da concentração de proteínas altera as propriedades dielétricas da membrana e tende a reduzir sua permeabilização (LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2009). A baixa permeabilização na fase estacionária pode ser justificada pelo fato de que as células apresentam parede celular mais espessa e menos porosa do que em fases de crescimento anteriores (GANEVA; GALUTZOV; TEISSIE, 2014).

Alguns estudos, entretanto, obtiveram resultados distintos dos expostos acima. Tryfona e Bustard (2008) testaram aplicação de PEF em diferentes estágios do crescimento de *Corynebacterium glutamicum*: exponencial inicial, média e tardia, além de estacionária inicial. Maior permeabilização celular foi conseguida na fase médio e tardia exponencial. Entretanto, conforme apontado pelos autores, dois outros estudos para a mesma bactéria encontraram maior permeabilização na fase inicial exponencial (BONAMY et al., 1990; HAYNES; BRITZ, 1989). Os autores atribuem a variação aos diferentes parâmetros de eletroporação utilizados nos experimentos.

Al Daccache et al. (2020a) estudaram a aplicação de campo elétrico pulsado durante a a) fase lag e logarítmica, b) fase lag e início da logarítmica e c) fase logarítmica do crescimento. Neste estudo, contudo, a maior taxa de crescimento específico foi observada para o tratamento PEF na fase lag e logarítmica (caso a), com redução de 1 hora na duração da fase lag (1,5 h para o experimento controle). Vale observar que a energia fornecida ao sistema com aplicação de PEF durante as duas fases (caso a) foi o dobro da utilizada no caso b e c. Pode ser então que, assim como no trabalho de Tryfona e Bustard (2008), a energia fornecida nos tratamentos das fases iniciais do crescimento não tenha sido suficiente para atingir o regime de “saturação”, conforme definido por Mattar et al. (2014).

Mattar et al. (2014) observaram que, no chamado regime de “saturação” da eletroporação, isto é, faixa na qual a viabilidade celular (UFC/ml) é constante para diferentes potências fornecidas (faixa de 10^{-1} J/ml a 10^1 J/ml), houve maior permeabilização das células para o tratamento PEF durante a fase inicial do que para o tratamento após o final da fase lag. Em contraste, para o regime “logarítmico”, no qual o aumento de viabilidade celular é proporcional à potência fornecida em faixa inferior à anterior (10^{-7} J/ml a 10^{-1} J/ml), a permeabilização das células foi praticamente inobservável (MATTAR et al., 2014).

O estudo de Mattar et al. (2014) aponta a existência de diferentes mecanismos em função da potência fornecida, pois se a potência não atingir o valor de saturação, a permeabilização das células não será significativa, e com isso, não haverá os impactos desejados no crescimento celular.

2.4.3 Parâmetros de Processo

Tratando-se da aplicação de campos elétricos com interesses biotecnológicos, os parâmetros do campo elétrico escolhidos vão definir a resposta dos microrganismos aos estímulos. Os parâmetros mais avaliados são a intensidade do campo elétrico, o tempo de tratamento, a quantidade de energia fornecida, a frequência da onda e a largura, o número e o intervalo de aplicação dos pulsos. Se alguns destes parâmetros excedem seus valores ótimos, ocorre a eletroporação irreversível das células e elas perdem sua viabilidade (PUC et al., 2003).

Os parâmetros da eletroporação influenciam o transporte transmembrana e, assim, a quantidade de moléculas que entram na célula. Até hoje não existe protocolos universalmente eficientes. Dessa forma, parâmetros ótimos devem ser encontrados para maximizar a eficiência de cada processo. A otimização pode ser conduzida através de extensos experimentos ou de simulações com modelos preditivos construídos com base em dados teóricos e experimentais (PUC et al., 2003). Nesta seção, serão discutidos os parâmetros mais relevantes avaliados nos artigos da literatura estudada.

2.4.3.1 Intensidade do campo elétrico

A intensidade de campo elétrico é um fator chave para atingir os objetivos desejados na eletroporação. Este parâmetro irá influenciar a permeabilidade das células, o que pode impactar a viabilidade e o metabolismo celular. Os estudos de Chanos et al. (2020), Tryfona e Bustard (2008), Ewe et al. (2012) e Yeo e Liong (2012) observaram redução da viabilidade celular imediatamente após a aplicação de campo elétrico pulsado, que foi testado em faixas distintas entre 1 e 12,5 kV/cm nos diferentes estudos. A morte celular foi tanto maior quanto maior a intensidade do campo elétrico.

Tryfona e Bustard (2008) notaram o aumento de permeabilidade celular com o aumento da intensidade do tratamento elétrico. As células aparentaram suportar campos entre 2 kV/cm e 5 kV/cm, nos quais a viabilidade ficou entre 91% e 92% e as taxas de permeabilidade entre 47,5% e 49%. Entretanto, a taxa de permeabilidade das bactérias aumentou consideravelmente para intensidades do campo superiores a 5 kV/cm, alcançando 72% em 9 kV/cm.

Embora aconteça redução inicial de viabilidade celular logo após o tratamento com PEF, trabalhos mostraram que ao longo do processo de fermentação estas células aumentaram a sua capacidade de reprodução celular, que foi maior para as maiores intensidades de campo elétrico testadas (EWE et al., 2012; YEO; LIONG, 2012). Este é um indício de que as células têm a

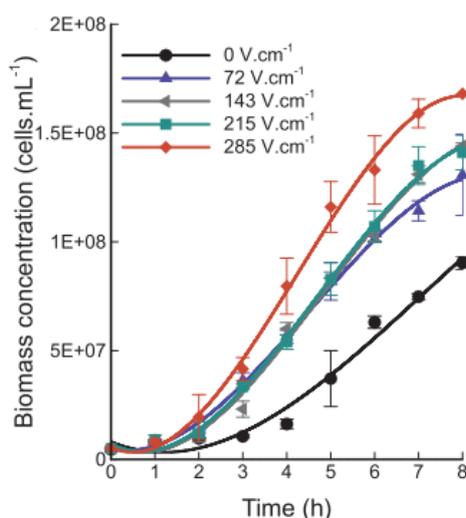
habilidade de resselar seus poros com o término da aplicação do campo e de que a eletroporação na cultura inicial afeta o transporte de nutrientes, o qual é fundamental para o metabolismo e reprodução celular durante a fermentação (YEO; LIONG, 2012).

Gaudreau, Champagne e Jelen (2005) postulam que a liberação de conteúdo intracelular que contém fatores promotores de crescimento, como proteínas, enzimas, vitaminas, nucleotídeos e aminoácidos, poderia estimular o crescimento celular dos microrganismos intactos ou com membrana não danificada irreversivelmente.

Adicionalmente, Chanos et al. (2020) verificaram que mesmo com a redução do número inicial de células, as culturas tratadas por PEF apresentaram maior capacidade de acidificação do meio, quando comparada à cultura sem tratamento. Entretanto, os autores observaram que fases lag mais curtas estão relacionadas a voltagens mais baixas. Isso indica que o aumento de performance observado pode estar relacionado a outros efeitos que não o enriquecimento da absorção de nutrientes, a saber, reposta ao estresse, metabolismo e genoma do microrganismo.

O trabalho de Al Daccache et al. (2020a) elucida a relação entre a concentração de biomassa e a intensidade do campo elétrico aplicada. Como demonstrado na Figura 9, a mais alta intensidade de campo produziu a maior concentração celular, enquanto as demais intensidades resultaram em valores semelhantes de crescimento da biomassa. A aplicação de PEF resultou em rendimentos de biomassa e velocidade máxima de crescimento superiores ao grupo sem tratamento.

Figura 9 - Cinética de crescimento (células viáveis) de *Hanseniaspora* sp. para fermentação assistida por PEF e grupo controle.



Fonte: Al Daccache et al. (2020a).

A maior intensidade de campo elétrico testada foi a que proporcionou os maiores ganhos no crescimento celular durante a fermentação nos estudos de Guo et al. (2016), Castro et al.

(2012), Lye et al. (2011), Mattar et al. (2015), embora utilizem faixas distintas de campos elétricos.

Como observado pelos resultados dos estudos acima, o nível de permeabilização conseguido na membrana é dependente da intensidade do campo elétrico utilizada. Em geral, maiores intensidades causam maiores níveis de permeabilização. Entretanto, valores elevados podem levar à alta taxa de morte celular. Embora a viabilidade de células se reduza imediatamente após o tratamento PEF, vários estudos apontaram maior crescimento celular destas células durante a fermentação, que, em geral, é maior tanto maior a intensidade do campo elétrico. O enriquecimento na captação de nutrientes pela célula devido ao fluxo facilitado para o seu interior é um dos possíveis mecanismos que justificam o aumento de performance celular.

2.4.3.2 Tempo de tratamento

O segundo parâmetro relevante nas aplicações de campos elétricos é o tempo de tratamento, o qual é uma função do número e duração de pulsos no caso da técnica de PEF, e do tempo que a corrente alternada é mantida ativa, para os estudos com MEF.

Nos trabalhos com MEF avaliados nesta monografia, o tempo de tratamento está na ordem de horas e as diferentes condições testadas objetivavam a avaliação do tratamento em fases de crescimento celular distintas. A duração do estímulo elétrico propriamente não foi um interesse dos estudos.

A pesquisa de Ohba, Uemura e Nabetani (2016) com campo elétrico pulsado de intensidade variando entre 7 e 11 kV/cm e número de pulsos entre 150 e 400 em bactérias mostrou que mais de 250 - 300 pulsos reduziram a biossíntese de exopolissacarídeos (EPS), comparado à fermentação sem tratamento PEF. O dano causado à célula pelos pulsos repetitivos, mesmo com voltagens mais baixas, prejudicou a biossíntese do composto. Por outro lado, baixos números de pulsos (150 - 250) combinados a campos elétricos na faixa de 8 - 9 kV/cm propiciaram as melhores taxas de produção de EPS.

GUO et al. (2016) verificaram que a aplicação de 20 pulsos de nsPEF a 20 kV/cm propiciou uma taxa de sobrevivência ao longo da fermentação de 233%, enquanto 100 pulsos a 30 kV/cm levou à redução da viabilidade das células, quando comparada ao experimento controle. Ao passo que tratamentos brandos levam ao aumento de proliferação celular, tratamentos com alta intensidade de campo e número de pulsos têm efeitos inibitórios.

A influência do número de pulsos na viabilidade mostrou-se depende da intensidade do campo. No trabalho de Haberl-Meglic, Marolt e Miklavcic (2015) foi verificado que em altas

voltagens (20 kV/cm) a viabilidade de células se reduziu com o aumento do número de pulsos (de 8 para 32). No entanto, em baixas voltagens (10 kV/cm) não se observou efeito significativo do número de pulsos na viabilidade celular. Neste mesmo estudo, o aumento da duração do pulso (100 μ s para 1 ms) aumentou a extração de proteínas, mas não impactou significativamente a viabilidade celular.

A permeabilidade adquirida pela membrana com o tratamento elétrico pode explicar os fenômenos observados. Conforme verificado por Yeo e Liong (2012), o aumento da intensidade e duração do campo elétrico levou ao aumento de permeabilidade de três das quatro cepas de lactobacilos e bifidobactérias avaliadas. O diferente comportamento de uma das espécies foi atribuído à menor sensibilidade da sua membrana. Ainda, o estudo de Ewe et al. (2012) verificou aumento de permeabilidade celular com a maior duração do pulso (3,5 e 4 ms). Lye et al. (2011) constatou maior crescimento celular com o aumento da largura do pulso utilizada (3 a 4 ms).

Portanto, nos estudos com PEF, a tendência é que a duração de pulso seja avaliada em conjunto com a intensidade de campo elétrico. Com maior número de pulsos espera-se maior efeito de eletroporação celular, o que irá impactar no crescimento das células, viabilidade e produção ou extração de compostos.

Adicionalmente, o intervalo de tratamento foi verificado com um parâmetro importante. Ao utilizar um intervalo de tempo, na ordem de minutos, entre as aplicações de pulsos, foi observado o favorecimento da viabilidade celular e da permeabilização (TRYFONA; BUSTARD, 2008) e maior liberação de α -amilase (SHIINA; OHSHIMA; SATO, 2004). Essa constatação pode ser explicada pelo fato de as células terem tempo para retornar a sua forma original, ou pelo menos fechar parcialmente os poros, antes da aplicação de um novo pulso (TRYFONA; BUSTARD, 2008).

2.4.3.3 Frequência

A frequência é um parâmetro relevante nas aplicações de campos elétricos, principalmente na tecnologia de MEF. Na técnica PEF, pulsos mais largos (de maior duração) ou mais espaçados são equivalentes a baixas frequências de onda.

Loghavi, Sastry e Yousef (2008) investigaram os efeitos de MEF em diferentes frequências (45, 60 e 90 Hz) na cinética de crescimento e na síntese de bacteriocinas por lactobacilos. Os tratamentos levaram a menores durações da fase lag do que a fermentação convencional, para uma mesma temperatura e forma de onda. A redução da fase lag foi tanto

maior quanto menor a frequência utilizada. Para explicar tal fato os autores usam a teoria de que em baixas frequências há tempo suficiente para a formação de carga na membrana celular, logo maior eletroporação é esperada. A utilização de MEF a 60 Hz e ondas não puramente senoidais com altos harmônicos (originais da rede elétrica) não resultou em redução da fase lag equivalente às observadas em 45 ou 90 Hz. Componentes de alta frequência em harmônicos poderiam decrescer o efeito de eletroporação. Entretanto, a produção de bacteriocinas foi máxima nesta condição. É possível que o estresse causado por certas frequências e forma de onda tenha aumentado a produção de moléculas defensivas, como as bacteriocinas (LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2008).

Em trabalho posterior, os mesmos autores investigaram a permeabilização das células em frequências na faixa de 45 a 10.000 Hz aplicadas na fase lag da fermentação. A 45 Hz ocorreu a maior permeabilização entre as frequências e o grupo de controle, a 60 Hz a permeabilização foi maior do que 1.000 e 10.000 Hz. Para as frequências mais elevadas (1.000 e 10.000 Hz) não se observou diferença significativa no número de células permeabilizadas quando comparado ao grupo controle (LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2009).

Jiahui et al. (2009) calcularam o potencial transmembrana resolvendo a equação de Laplace para um modelo de célula esférica. Neste modelo, o valor do potencial transmembrana aumenta com a redução da frequência do campo externo e há uma faixa de frequências nas quais o potencial transmembrana diminui rapidamente. Deste modo, frequências mais baixas de campo elétrico induziriam maiores potenciais transmembrana, o que faz com que o potencial limite para eletroporação seja atingido mais facilmente. Este estudo teórico está de acordo com os resultados experimentais observados nos trabalhos aqui citados.

O efeito da frequência foi avaliado em dois dos estudos encontrados de PEF. Haberl-Meglic, Marolt e Miklavcic (2015) não observaram diferença significativa na viabilidade celular e extração de proteínas com o aumento da frequência de 1 Hz para 1 kHz. O estudo de Chanos et al. (2020) apontou para a interação da frequência com as variáveis de processo intensidade do campo e número de pulsos. Nesta pesquisa, o efeito da frequência em parâmetros associados à capacidade de acidificação da cultura foi dependente do nível das demais variáveis. A redução da fase lag de pH, por exemplo, foi associada a combinação de alta frequência (4 Hz) e alto número de pulsos (50 pulsos).

Portanto, os estudos de MEF apontam que frequências mais baixas tendem a provocar maiores efeitos de eletroporação, que pode ser explicado pelo fato de que nestas condições há tempo suficiente para o surgimento e estabilização das cargas na membrana celular. Todavia, este efeito foi pouco estudado em trabalhos com PEF e os resultados são menos conclusivos.

2.5 APLICAÇÕES NOTÁVEIS DESTAS TECNOLOGIAS

Alguns dos estudos de aplicação de campos elétricos em bactérias e leveduras com objetivos não letais verificaram a potencial utilização das tecnologias elétricas para produção de alimentos mais ricos nutricionalmente, extração de proteínas e otimização de processos fermentativos. A Tabela 2 apresenta os principais resultados publicados de aplicações com interesse industrial de campos elétricos (PEF ou MEF) em bactérias e leveduras. Os comentários sobre os estudos serão discutidos nas seções que seguem.

Tabela 2 - Principais resultados publicados de aplicações das tecnologias de campo elétrico.

Microrganismo	Tecnologia	Aplicação	Resultados*	Referência
<i>Escherichia coli</i> HB101/pHI301A	PEF	Extração de α -amilase	Liberação de 30% da α -amilase produzida pela célula.	SHIINA; OHSHIMA; SATO, 2004
<i>Lactobacillus acidophilus</i> OSU 133	MEF	Produção de bacteriocinas (lacidina A)	Atividade de bacteriocina cerca de 3 vezes maior.	LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2007
<i>L. acidophilus</i> BT 1088, <i>L. acidophilus</i> FTCC 0291, <i>L. bulgaricus</i> FTCC 0411, <i>L. bulgaricus</i> FTDC 1311 e <i>L. casei</i> BT 1268	PEF	Enriquecimento da habilidade de remoção de colesterol por lactobacilos	Aumento da assimilação de colesterol em 127,2%.	LYE et al., 2011
<i>Bifidobacterium sp.</i> FTDC 8943, <i>Bifidobacterium longum</i> FTDC8643, <i>L. casei</i> FTDC2113 e <i>L. casei</i> BT 1268	PEF	Desenvolvimento de fermentado de leite de soja com bioatividade aumentada	<i>B. longum</i> FTDC8643 apresentou os maiores ganhos. Enriquecimento de compostos bioativos em 28,1% (daidzeína), 3,4% (gliciteína) e 86,5% (genisteína).	YEO; LIONG, 2012
<i>L. casei</i> BT 1088, <i>Lactobacillus fermentum</i> BT 8219, <i>L. casei</i> BT 8633, <i>Lactobacillus gasseri</i> FTDC 8131	PEF	Produção de leite de soja suplementado com biotina e enriquecido em agliconas	Aumento da concentração de daidzeína (36%), gliciteína (62%) e genisteína (85%). Efeitos superiores notados em algumas das cepas estudadas.	EWE et al., 2012
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LB-12 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-K	PEF	Aumento de benefícios probióticos de bactérias	Aumento da tolerância ácidas das bactérias, maior crescimento celular e aumento da atividade de protease.	NAJIM; ARYANA, 2013
<i>Escherichia coli</i>	PEF	Extração de proteínas	Obtenção de cerca de 64% das proteínas extraídas pelo método convencional.	HABERL MEGLIC; MAROLT; MIKLAVCIC, 2015

Continua na página seguinte.

Tabela 2 (continuação)

Microrganismos	Tecnologia	Aplicação	Resultados*	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Actiflore F33	PEF	Estímulo de levedura produtora de vinho	Esgotamento mais acelerado dos açúcares do meio, redução de 20 h no tempo de fermentação (total de 150 horas).	MATTAR et al., 2015
<i>Streptomyces avermitilis</i>	PEF	Enriquecimento da produção de avermectinas	Maior produção de avermectinas (42%) e redução do tempo de fermentação de 7 para 5 dias.	GUO et al., 2016
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	PEF	Produção de exopolissacarídeos	Aumento de 94% na produção de exopolissacarídeos.	OHBA; UEMURA; NABETANI, 2016
<i>Escherichia coli</i> K12 TOP10	PEF	Extração de proteínas	Extração de cerca de 18% do total de proteínas.	HABERL-MEGLIČ et al., 2016
<i>L. rhamnosus</i> B 442, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1937 e <i>Lactococcus lactis</i> JBB 500	PEF	Produção de sorvete suplementado com magnésio	Aumento da concentração de Mg ⁺² na ordem de 6 a 2 vezes, a depender da cepa.	GÓRAL et al., 2018
<i>Streptococcus thermophilus</i> DIL 5218 e <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSMZ 20081T	PEF	Fermentação de leite para produção de iogurte	Aumento da capacidade de acidificação das culturas tratadas, com aceleração de até 12 min no tempo de acidificação.	CHANOS et al., 2020
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> B 442	PEF	Produção de sorvete de valor probiótico enriquecido com cálcio	Aumento de 5 vezes na acumulação de cálcio pelas bactérias. Sorvete com maior conteúdo de matéria seca, proteínas, gordura, carboidratos e reduzidas taxas de derretimento.	PANKIEWICZ et al., 2020
<i>Hanseniaspora</i> sp.	PEF	Melhora da performance fermentativa de suco de maçã	Produção de biomassa 75% superior e redução da fase lag de crescimento em 1h.	AL DACCACHE et al., 2020a
<i>Hanseniaspora</i> sp.	PEF	Produção de sidra com baixo teor de álcool	Decréscimo de álcool em 1,6% (v:v) com consumo de energia inferior aos métodos tradicionais. Redução de 10 h no tempo para atingir fase estacionária.	AL DACCACHE et al., 2020b

*Resultados provenientes da comparação com grupo controle no qual o campo elétrico não foi aplicado, a menos que especificado contrário. Fonte: a autora (2020).

2.5.1 Produção de alimentos e bebidas

Vários dos estudos citados na Tabela 2 utilizam campo elétrico em microrganismos probióticos, como lactobacilos e bifidobactérias, os quais favorecem o bem estar do hospedeiro através da manutenção do balanço microbiológico, proteção contra infecções e imunomodulação (PANKIEWICZ et al., 2020). A aplicação de campos elétricos em

microrganismos probióticos proporcionou o aumento da concentração de compostos bioativos em fermentados de leite de soja, os quais passam a ser mais ricos nutricionalmente (EWE et al., 2012; YEO; LIONG, 2012). Considerando o enriquecimento em agliconas, o leite de soja produzido pode ser útil para a prevenção de desordens de dependência hormonal (YEO; LIONG, 2012).

Adicionalmente, estudos demonstraram que o consumo de lactobacilos pode reduzir o colesterol sanguíneo, o que contribui para a redução do desenvolvimento de doenças coronárias (LIONG; SHAH, 2005). A eletroporação demonstrou aumentar a capacidade de captação de colesterol por lactobacilos em vitro (LYE et al., 2011). Dessa forma, células eletroporadas são candidatas promissoras para incorporação em laticínios a fim de desenvolver novos alimentos funcionais com efeito de redução do nível de colesterol do hospedeiro.

Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas têm ganhado atenção devido às propriedades de textura promovidas em produtos de fermentação do leite e aos benefícios à saúde do consumidor. No trabalho de Ohba, Uemura e Nabetani (2016) a produção de EPS pôde ser aumentada em 94% com a aplicação de campos elétricos, comparada à fermentação convencional.

Os resultados de Pankiewicz et al. (2020) mostram que o tratamento PEF permitiu aumentar em 5 vezes a incorporação de íons cálcio por lactobacilos. Góral et al. (2018) observou acréscimo de 2 a 6 vezes na assimilação de íons magnésio por bactérias lácticas. Tais cepas eletroporadas foram utilizadas para produção de sorvetes probióticos enriquecidos com cálcio e magnésio, respectivamente.

O interesse na produção de bebidas com baixo teor de etanol tem ganhado mais atenção devido às questões sociais e de saúde associadas ao consumo de álcool. A fermentação assistida por campos elétricos pulsados parece ser uma técnica promissora para superar problemas com os processos atualmente disponíveis para redução de teor alcoólico em bebidas, como o consumo de energia, conforme resultados do estudo de Al Daccache et al. (2020b).

2.5.2 Extração de compostos de microrganismos

Proteínas sintetizadas por microrganismos têm aplicação na medicina, indústria de alimentos, farmacêutica e têxtil. Um dos métodos promissores para extração de produtos intracelulares é a eletroporação (HABERL-MEGLIČ et al., 2016).

A extração de proteínas de microrganismos através de campos elétricos vem ganhando importância, uma vez que é um método rápido (poucos segundos), livre de produtos químicos

e economicamente efetivo. Quando os parâmetros de processo são corretamente ajustados, a técnica permite a manutenção da viabilidade celular, que dispensa trabalho adicional com a separação de contaminantes decorrentes de desintegração total das células. Endotoxinas liberadas a partir de membranas danificadas exigem etapas adicionais de purificação que podem representar até 80% do custo de produção em largas escalas. A eficiência da extração é fortemente dependente dos parâmetros de processo adotados, os quais devem ser cuidadosamente estudados para maximizar rendimentos (HABERL MEGLIC; MAROLT; MIKLAVCIC, 2015).

Em alguns casos, a quantidade de proteína extraída é ligeiramente inferior ao processo convencional, como no estudo de Haberl-Meglic, Marolt e Miklavcic (2015), no qual 20,29 µg/ml foram extraídos pela técnica convencional e cerca de 13 µg/ml com PEF. Apesar disso, os ganhos com velocidade da extração e redução de contaminantes representam vantagens competitivas do método.

Outro benefício é a possibilidade de extração seletiva de proteínas intracelulares, como estudado por Shiina, Ohshima e Sato (2004). Neste trabalho, foi verificada a formação de poros reversíveis apenas na membrana externa de bactérias gram-negativas, o que permitiu a liberação de α -amilase do espaço periplasmático. Além disso, a utilização de PEF permitiu maximizar a produtividade, pois após a liberação de α -amilase durante o pulso, há mais espaço livre intracelular para se continuar produzindo e armazenando esta enzima, que pode então ser novamente extraída da célula com auxílio do campo elétrico.

Segundo Haberl-Meglic et al. (2016), “o tratamento com campos elétricos pulsados pode ser realizado em modo batelada ou contínuo e é facilmente implementado em linhas de extração já existentes”. Ademais, de forma geral, a utilização de tecnologias de eletroporação não requerem alto consumo energético, o que aumenta a atratividade da técnica de PEF na área industrial. No entanto, existe uma dificuldade para determinação dos parâmetros (intensidade do campo, frequência, número e duração de pulsos) que permitem otimização do gasto de energia (BARBA et al., 2015).

2.5.3 Processos Fermentativos

Os estudos mostram a importância prática em adotar fermentação assistida com campos elétricos para enriquecimento de processos fermentativos, com ganhos em aumento de produção de biomassa, redução de tempo de fermentação e maiores rendimentos de produtos de interesse.

O aumento da proliferação celular é uma observação recorrente nos estudos de aplicação de campos elétricos em bactérias e leveduras, para parâmetros de processo corretamente selecionados. Notadamente, este efeito foi observado nos estudos de Al Daccache et al. (2020b), no qual houve aumento de 45% na concentração de biomassa, e Castro et al. (2012) com 188% de acréscimo.

Vários trabalhos apontam a redução do tempo de fermentação com o emprego de estímulos elétricos. Mattar et al. (2015) demonstraram que a cinética de fermentação de levedura produtora de vinho em meio sintético foi acelerada pelo pré-tratamento do inóculo com campos elétricos. Houve maior taxa de consumo de açúcares e de crescimento de biomassa, além de redução de cerca de 20 horas (de um total de 150 horas) do tempo de fermentação de uma batelada. Najim e Aryana (2013) observaram decréscimo de 1 hora na duração da fase lag para bactérias lácticas pré-tratadas com PEF. Chanos et al. (2020) observaram decréscimo de até 12 minutos na fase lag do pH com aplicação de PEF em bactérias lácticas. Castro et al. (2012) constataram redução de 6 horas do tempo de fermentação de *S. cerevisiae* recombinante com aplicação de MEF durante o processo fermentativo. Por fim, Guo et al. (2016) puderam reduzir o tempo de fermentação de *Streptomyces avermitilis* de 7 para 5 dias com a utilização de nsPEF.

Em relação ao enriquecimento da fermentação para produção de substâncias de interesse comercial, vale destacar os trabalhos de Guo et al. (2016) e Loghavi, Sastry e Yousef (2007). O primeiro obteve um aumento de 42% na síntese de avermectinas, as quais são um grupo de agentes inseticidas e vermícidas com amplo uso na agricultura, veterinária e medicina. O segundo trabalho, por sua vez, alcançou produtividade de bacteriocinas (lacidina A) 3 vezes maior com a aplicação de MEF durante cinco horas iniciais de fermentação. Bacteriocinas são substâncias com efeito antimicrobiano, que podem ser isoladas de microrganismos e utilizadas como bioconservantes de alimentos e como uma alternativa aos antibióticos de uso médico (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

3 TÓPICOS A SEREM PESQUISADOS NESTA ÁREA

- Entendimento dos mecanismos envolvidos no estímulo celular

Ainda permanecem lacunas no entendimento dos mecanismos envolvidos no estímulo celular por campos elétricos. A compreensão dos efeitos do campo elétrico a nível celular e molecular é fundamental para permitir a modelagem e otimização dos processos, garantindo o sucesso e a expansão das tecnologias elétricas. Ademais, é necessário entender o papel das estruturas externas à membrana celular que compõem a parede celular de bactérias e leveduras, bem como das proteínas presentes. Poucos estudos foram efetuados neste campo até então. O avanço na área de microscopia eletrônica, bem como no uso de simulações computacionais têm grande potencial para contribuir na elucidação dos mecanismos envolvidos à nível molecular.

- Desenvolvimento de estudos com foco em aplicações comerciais de MEF e PEF

Há poucos trabalhos publicados com respeito às aplicações das técnicas de MEF e PEF associadas à produção de compostos de interesse comercial. Seria de grande valia visualizar o impacto dessas técnicas na síntese de compostos de origem microbiológica com interesse industrial, como fármacos e biopolímeros. Métodos tradicionais de processamento, como a fermentação, podem ser combinados às tecnologias elétricas emergentes buscando sustentabilidade na produção de alimentos e outros compostos. Estudos trazendo evidências da efetividade econômica do uso de tecnologias de campos elétricos quando levadas para larga escala são de alta relevância para estimular o interesse e o investimento neste campo.

- Entendimento do papel da composição do meio extracelular

Alguns estudos apontaram que alterações na composição, pH e capacidade oxidativa do meio extracelular podem influenciar a resposta da célula ao campo elétrico. Esta área permanece pouco explorada, porém seu entendimento pode viabilizar manipulações dos efeitos atingidos com a eletroporação. Além disso, seria importante esclarecer o impacto do campo elétrico nas propriedades físicas e químicas do meio líquido em que a célula está imersa. Este conhecimento é principalmente útil para utilização de PEF e MEF na produção de alimentos e bebidas, a fim de garantir que não haja impacto na qualidade e segurança do produto.

- Avaliação da dependência do tempo na resposta da membrana celular

Existe a necessidade de avaliar a duração do tratamento elétrico efetivamente requerida para atingir a eletroporação. A aplicação intermitente de campo elétrico, permitindo um tempo de descanso à célula, assim como o efeito da frequência da onda, principalmente na técnica PEF, merecem ser mais estudadas.

4 CONCLUSÃO

A revisão da literatura mostra que as tecnologias de campos elétricos moderados (MEF) e campos elétricos pulsados (PEF) têm alta potencialidade para serem aplicadas em bactérias e leveduras com interesse de enriquecer processos biotecnológicos. Através da escolha apropriada de parâmetros elétricos, é possível expandir a aplicação das técnicas de campo elétrico para o estímulo, e não apenas inativação, de microrganismos.

A aplicação subletal de PEF e MEF em microrganismos para melhora de processos é uma área de estudo relativamente nova. Os trabalhos relevantes publicados nas últimas duas décadas apontam como vantagens da utilização destas tecnologias o aumento da proliferação celular, a redução do tempo de fermentação, a extração de moléculas sem redução de viabilidade celular e a maior produtividade de compostos de interesse comercial e científico.

Embora os equipamentos de PEF e MEF sejam relativamente simples de serem instalados, a escolha apropriada dos parâmetros operacionais corresponde a uma das principais dificuldades a serem superadas. Não existe até o momento procedimentos universais válidos para um determinado gênero ou espécie celular. É necessário otimizá-los experimentalmente ou computacionalmente de acordo com as características do produto em que a tecnologia elétrica vai ser aplicada.

Os resultados observados com as aplicações das tecnologias de campo elétrico são decorrentes de efeitos físicos e químicos em níveis microscópios e estruturais. O campo elétrico pode aumentar o transporte de nutrientes através da formação de poros e ativação de proteínas de transporte da membrana. Graças a simulações computacionais e imagens de microscopia eletrônica, os mecanismos envolvidos no estímulo celular por campos elétricos vêm sendo mais compreendidos nos últimos anos. Entretanto, permanece a necessidade de estudos para esclarecer completamente todos os mecanismos.

A utilização de PEF para estímulo celular tem sido mais investigada e está mais consolidada até então do que a tecnologia MEF. Todavia, os resultados promissores obtidos com MEF, bem como a vantagem de se obter permeabilização celular com menores intensidades de campo elétrico do que em PEF, devem encorajar o estudo mais aprofundado desta tecnologia.

Em vista do que foi exposto neste trabalho, pode-se concluir que a área de campos elétricos em níveis subletais tem amplo potencial para ser explorada de forma a trazer ganhos econômicos e ambientais para bioprocessos industriais.

REFERÊNCIAS

- AL DACCACHE, M. et al. Pulsed electric field-assisted fermentation of *Hanseniaspora* sp. yeast isolated from Lebanese apples. **Food Research International**, v. 129, n. August 2019, p. 108840, 2020a.
- AL DACCACHE, M. et al. Control of the sugar/ethanol conversion rate during moderate pulsed electric field-assisted fermentation of a *Hanseniaspora* sp. strain to produce low-alcohol cider. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 59, n. May 2019, p. 102258, 2020b.
- BARBA, F. J. et al. Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. **Food Research International**, v. 77, p. 773–798, 2015.
- BONAMY, C. et al. Interspecies electro-transformation in *Corynebacteria*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 66, n. 1–3, p. 263–269, 1990.
- CASTRO, I. et al. The Effect of the Electric Field on Lag Phase, β -Galactosidase Production and Plasmid Stability of a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain Growing on Lactose. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 8, p. 3014–3020, 2012.
- CHANOS, P. et al. Application of mild pulsed electric fields on starter culture accelerates yogurt fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 3, p. 621–630, 2020.
- EWE, J. A. et al. Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk by electroporation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 580–596, 2012.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2018.
- GALV, L.; CARCIOCHI, R. A. Fermentation Assisted by Pulsed Electric Field and Ultrasound : A Review. p. 1–12, 2018.
- GANEVA, V.; GALUTZOV, B.; TEISSIE, J. Evidence that pulsed electric field treatment enhances the cell wall porosity of yeast cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1540–1552, 2014.
- GAUDREAU, H.; CHAMPAGNE, C. P.; JELEN, P. The use of crude cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 83–90, 2005.
- GLASER, R. W. et al. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. **BBA - Biomembranes**, v. 940, n. 2, p. 275–287, 1988.
- GÓRAL, M. et al. Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. **Food Chemistry**, v. 239, p. 1151–1159, 2018.
- GUO, J. et al. Raising the avermectins production in *Streptomyces avermitilis* by utilizing nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs). **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–10, 2016.

HABERL-MEGLIČ, S. et al. The effect of temperature and bacterial growth phase on protein extraction by means of electroporation. **Bioelectrochemistry**, v. 112, p. 77–82, 2016.

HABERL MEGLIC, S.; MAROLT, T.; MIKLAVČIČ, D. Protein Extraction by Means of Electroporation from *E. coli* with Preserved Viability. **Journal of Membrane Biology**, v. 248, n. 5, p. 893–901, 2015.

HAYNES, J. A.; BRITZ, M. L. Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 61, n. 3, p. 329–333, 1989.

HISS, H. **Cinética de Fermentações**. 1. ed. São Paulo: Clude de Autores, 2009.

IVORRA, A. Tissue Electroporation as a Bioelectric Phenomenon: Basic Concepts. **Irreversible Electroporation, Series in Biomedical Engineering**, p. 22–61, 2010.

JIAHUI, L. et al. Analysis for relationship of transmembrane potential-pulsed electric field frequency. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 4, p. 261–265, 2009.

JIN, T. Z. Pulsed Electric Fields for Pasteurization: Defining Processing Conditions. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 2271–2294.

KANDUSER, M.; MIKLAVČIČ, D. Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview. In: VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. (Eds.). . **Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials**. New York: Springer Science Business Media, LLC, 2008. p. 1–38.

KOTNIK, T. et al. Cell membrane electroporation - Part 1: The phenomenon. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 28, n. 5, p. 14–23, 2012.

KOTNIK, T. et al. Electroporation-based applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 480–488, 2015.

KOTNIK, T. Lightning-Triggered Electroporation as a Mechanism for Horizontal Gene Transfer. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 370–384.

KOTNIK, T. et al. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. **Annual Review of Biophysics**, v. 48, n. 1, p. 63–91, 2019.

KRANJC, M.; MIKLACIC, D. Electric Field Distribution and Electroporation Threshold. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 1043–1058.

KRIEGER, L. K. et al. Cell length alternations as a stress indicator for *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 310–315, 2013.

KULSHRESTHA, S. et al. Moderate Electrothermal Treatments of Cellular Tissues. In: VOROBIEV EUGENE; NIKOLAI LEOVKA (Eds.). . **Electrotechnologies for Extraction**

from **Food Plants and Biomaterials**. New York: Springer Science & Business Media, 2008. p. 83–95.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 55–66, 2005.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735 LP – 3740, 1 ago. 1998.

LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E. Effect of moderate electric field on the metabolic activity and growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 872–881, 2007.

LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E. Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 1, p. 148–153, 2008.

LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E. Effect of moderate electric field frequency and growth stage on the cell membrane permeability of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 1, p. 85–94, 2009.

LYE, H. S. et al. Electroporation enhances the ability of lactobacilli to remove cholesterol. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4820–4830, 2011.

MARTÍNEZ, J. M. et al. Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 530–552, 2020.

MATTAR, J. R. et al. Stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures by Pulsed Electric Fields. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 11, p. 3328–3335, 2014.

MATTAR, J. R. et al. *S. cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments. **Bioelectrochemistry**, v. 103, p. 92–97, 2015.

NAJIM, N.; ARYANA, K. J. A mild pulsed electric field condition that improves acid tolerance, growth, and protease activity of *Lactobacillus acidophilus* LA-K and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* LB-12. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3424–3434, 2013.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

OHBA, T.; UEMURA, K.; NABETANI, H. Moderate pulsed electric field treatment enhances exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 9, p. 1120–1128, 2016.

PAGÁN, R.; MAÑAS, P. Fundamental Aspects of Microbial Membrane Electroporation. In: RASO, J.; HEINZ, V. (Eds.). **Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry**. Food Engin ed. Boston, MA: Springer, Boston, MA, 2006. p. 73–94.

PAKHOMOVA, O. N. et al. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 527, n. 1, p. 55–64, 2012.

PANAGOPOULOS, D. J. et al. A Mechanism for Action of Oscillating Electric Fields on Cells. v. 640, p. 634–640, 2000.

PANKIEWICZ, U. et al. Application of pulsed electric field in production of ice cream enriched with probiotic bacteria (*L. rhamnosus* B 442) containing intracellular calcium ions. **Journal of Food Engineering**, v. 275, n. July 2019, 2020.

PUC, M. et al. Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electropermeabilization. **Bioelectrochemistry**, v. 60, n. 1–2, p. 1–10, 2003.

RAUCH, C.; LEIGH, J. Theoretical evaluation of wall teichoic acids in the cavitation-mediated pores formation in Gram-positive bacteria subjected to an electric field. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 4, p. 595–601, 2015.

RAVISHANKAR, S.; ZHANG, H.; KEMPKES, M. L. Pulsed electric fields. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 5, p. 429–432, 2008.

REMS, L. Lipid Pores: Molecular and Continuum Models. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 3–23.

REMS, L. et al. Pulsed Electric Fields Can Create Pores in the Voltage Sensors of Voltage-Gated Ion Channels. **Biophysical Journal**, v. 119, n. 1, p. 190–205, 2020.

ROCHA, C. M. R. et al. Electric field-based technologies for valorization of bioresources. **Bioresource Technology**, v. 254, n. January, p. 325–339, 2018.

SASTRY, S. K. Ohmic Heating and Moderate Electric Field Processing. **Food Science and Technology International**, 2009.

SENSOY, I.; SASTRY, S. K. Extraction Using Moderate Electric Fields. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. 7–13, 2004.

SHIINA, S.; OHSHIMA, T.; SATO, M. Extracellular release of recombinant α -amylase from *Escherichia coli* using pulsed electric field. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, p. 1528–1533, 2004.

TANINO, T. et al. Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. **Journal of Electrostatics**, v. 70, n. 2, p. 212–216, 2012.

TEISSIE, J. Involvement of Reactive Oxygen Species in Membrane Electropermeabilization. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017a. p. 473–485.

TEISSIE, J. Critical Electric Field and Transmembrane Voltage for Lipid Pore Formation in Experiments. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland:

Springer International Publishing, 2017b. p. 25–43.

TRYFONA, T.; BUSTARD, M. T. Impact of pulsed electric fields on *Corynebacterium glutamicum* cell membrane permeabilization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 375–382, 2008.

VERNIER, P. T. et al. Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 2009.

VOROBIEV, E.; LBOVKA, N. Selective Extraction of Molecules from Biomaterials by Pulsed Electric Field Treatment. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 665–770.

YANO, K.; MOROTOMI-YANO, K. Cell Stress Responses to Pulsed Electric Fields. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 290–304.

YEO, S. K.; LIONG, M. T. Effect of electroporation on viability and bioconversion of isoflavones in mannitol-soymilk fermented by lactobacilli and bifidobacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 396–409, 2012.

ZERBIB, D. Bacterial Cell Envelopes: Composition, Architecture, and Origin. In: MIKLAVČIČ, D. (Ed.). . **Handbook of Electroporation**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 417–434.

ZIMMERMANN, U.; PILWAT, G.; RIEMANN, F. Dielectric Breakdown of Cell Membranes. **Biophys J**, p. 881–899, 1974.