

Estudos de um compartimento cilíndrico em poliuretano para aplicação de pulso de campo elétrico em alimentos líquidos

Studies of a compartment cylindrical in poliurethane for application of pulse electric field in liquid foods

Melissa D. S. Correia da Silva¹

Maria Lucia Masson²

Renê Robert³

Rubens Correia da Silva Júnior⁴

Resumo

A câmara cilíndrica em poliuretano projetada para aplicações de Pulsos de Campo Elétrico (PCE) em alimentos líquidos foi estudada utilizando amostras de leite (50 ml) previamente contaminada com *Escherichia coli* ATCC 11229. O tratamento consistiu de aplicações de pulso do tipo duplo exponencial (1,2 - 50 μ s) de curta duração e alta tensão (kV) sobre o leite dentro da câmara de tratamento; esta composta de eletrodos de carbonos planos e paralelos, acoplada a um gerador de impulso e interligada a um medidor de corrente e tensão (osciloscópio), para produzir campo elétrico de alta intensidade (kV/cm). Verificou-se o projeto e a eficiência da câmara de tratamento para este processo. Para o estudo, variou-se o número de pulso e a tensão. O controle dos testes foi realizado por análises microbiológicas do leite antes e após o tratamento com PCE. Os testes realizados com a câmara de tratamento foram satisfatórios em relação à ausência de contaminação cruzada e ao seu projeto, pois gerou campos elétricos maiores que 20 kV/cm. Observou-se a ocorrência de dissipação da energia interna (detectada pelo osciloscópio) e conseqüente diminuição da intensidade do campo elétrico interno. Não foi possível obter uma redução microbiana esperada (2 a 4 ciclos logarítmicos), pois o intervalo e a duração do pulso juntamente com a dissipação da energia interna prejudicaram a eletroporação da membrana e conseqüentemente a inativação celular. Porém,

1 M. Sc. Engenheira de Alimentos; e-mail: aerosigma@terra.com.br

2 Dr^a Engenheira Química; Prof^a da Universidade Federal do Paraná; e-mail: masson@ufpr.br.

3 Dr. Engenheiro Elétrico; Prof. da Universidade Federal do Paraná/LACTEC; e-mail: rene@lactec.org.br

4 Esp. Administrador; Prof. da Universidade Tuiuti do Paraná; e-mail: rubens.silva@utp.br

Recebido para publicação em 12/09/2006 e aceito em 31/07/2007

ao variar o número de pulsos e a tensão, ocorreu a redução microbiana. Sugere-se trabalhar com pulsos de tipo *square-wave* (onda quadrada) de 1 hertz de frequência e 2 μ s de duração. Faz-se necessário realizar novos estudos para minimizar a dissipação do campo elétrico interno na câmara de tratamento para aumentar a redução microbiana e a eficiência do processo.

Palavras-chave: pulso de campo elétrico; alimentos minimamente processados; leite; *Escherichia coli*.

Abstract

Previously the cylindrical chamber in projected polyurethane for applications of Pulses of Electric Field (PEF) in liquid foods was studied using milk samples (50 ml) contaminated with *Escherichia coli* ATCC 11229. The treatment consisted of applications of pulses of exponential double type (1,2 – 50 μ s) of short duration and high tension (kV) on milk, inside of chamber of treatment, this composed of plain and parallel carbon electrodes, connected to a linked generator of impulse and to a measurer of chain and tension (oscilloscope), to produce electric field of high intensity (kV/cm). It verified the project and the efficiency of the chamber of treatment for this process. For the study, one varied the number of pulses and the tension. The control of the tests was carried through by microbiological analyses of milk before and after the treatment with PEF. The tests carried through with the treatment chamber, had been satisfactory in relation the absence of crossed contamination and to its project, because it generated than electric fields 20 kV/cm. It was observed occurrence of waste of the internal energy (detected for the oscilloscope) and consequence reduction of the intensity of the internal electric field. It was not possible to get a waited microbial reduction (2 to 4 logarithmic cycles), therefore the interval and the duration of the together pulse with the waste of the internal energy had harmed the electroporation of the membrane consequently and the cellular inactivation. However, when varying the number of pulses and the tension occurred variation in the microbial reduction. Soon, how much larger the tension and the number of pulses wrist larger the microbial reduction. It suggests: to work with square-wave type of frequency 1 hertz and 2 μ s of duration. Become necessary to carry though new studies to minimize the waste of internal electric field in the treatment chamber to increase the microbial reduction and sufficiency of the process.

Key words: pulse of electric field; compartment of handling; milk; foods minimamente processed; *Escherichia coli*.

Introdução

O mercado de alimentos vem mostrando um crescimento na procura de alimentos minimamente processados, que apresentam características mais próximas dos produtos frescos *in natura*. Isto ocorre devido aos vários estudos, que demonstram as alterações desfavoráveis que ocorrem aos nutrientes em alimentos processados termicamente, como as conservas em geral, leites e sucos pasteurizados e alimentos desidratados. Com esse novo enfoque do mercado alimentício mundial, os processos de conservação de alimentos não térmicos têm sido objeto de estudo aprofundado nos últimos anos.

O tratamento com pulso de campo elétrico (PCE) envolve aplicação de rápidos pulsos de campo elétrico no alimento disposto entre dois eletrodos dentro de um compartimento de tratamento. O tratamento é conduzido por um gerador, o qual produz pulsos de curta duração (μs), o que mantém o alimento com as características físicas, químicas e nutricionais do alimento “fresco”, proporcionando um aumento de vida de prateleira - *shelf-life*. O efeito do PCE é causado pela indução de uma diferença de potencial (d.d.p.) elétrico sobre a membrana, que por sua vez causa uma separação de cargas na membrana celular, Quin et al (1995). Quando o potencial da transmembrana excede o valor crítico de aproximadamente 1 volt, a repulsão entre as moléculas eletricamente carregadas causa a formação de poros (eletroporação), aumentando a permeabilidade da célula reversível ou irreversivelmente, Mertens e Knorr (1992). Os efeitos

letais do PCE, sobre microorganismos, foram primeiramente descritos por Doevenspeck (1960). Os pesquisadores estudaram primeiramente o efeito sobre os microrganismos em meios artificiais, Gral e Märkl (1996); após, estudaram o efeito sobre os microrganismos em meio real como: o leite e sucos de frutas, obtendo características de processos mais adequadas. Desta forma, demonstraram que a eliminação de bactérias e leveduras com aplicação de PCE dependiam da intensidade do campo elétrico e do tempo de tratamento (aplicação).

O projeto do compartimento de tratamento é muito importante para o desenvolvimento do PCE em tecnologia de pasteurização, por exemplo: placas planas e paralelas produzem um campo elétrico uniforme com intensa distribuição em uma ampla área; cilindro concêntrico proporciona um fluxo regular e uniformidade do produto; ambos são atrativos em aplicações industriais. Outros aspectos no projeto de um compartimento de tratamento têm sido considerados, como:

- simulação para otimização modelo;
- distribuição uniforme do campo elétrico;
- geometria e dimensões;
- mecanismo de construção e materiais, Barbosa, Cárnovas, Górgora-Nieto, Swanson (1999).

O campo elétrico gerado na câmara de tratamento é definido pela geometria e pelo potencial elétrico dos eletrodos Heinz et al (2002). Variações locais no campo elétrico na câmara do tratamento devem ser evitadas, assegurando que cada célula dentro da população de microorganismos

receba o mesmo tratamento. Configurações de câmaras de tratamento diferentes como placas planas e paralelas, cilindros co-axiais e co-esféricos têm sido usados. Placas planas e paralelas são simples no projeto e produzem maior uniformidade na distribuição do campo elétrico, Jeyamkodan, Jayas e Holley (1999).

Desenvolvimentos tecnológicos recentes, em particular o de compartimento de tratamento em processo contínuo, oferecem maiores possibilidades para o crescimento da tecnologia do PCE, e tem estimulado novos de interesses, Wouters, Alvarez e Raso (2001).

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver estudos com o compartimento de tratamento de poliuretano cilíndrico projetado para aplicações de Pulso de Campo Elétrico em alimentos líquidos, utilizando leite estéril previamente contaminado com *Escherichia coli* (cepa ATCC 1129), de modo a verificar a influência da geometria do compartimento sobre a homogeneidade do campo elétrico formado, a intensidade do campo elétrico sobre o alimento líquido e a eficiência do processo.

Material e Métodos

Alimento líquido e o micro-organismo

Foi utilizado 50 ml de leite do tipo C integral com condutividade elétrica $\sigma = 4,24$ mS/cm e capacidade de calor específico $C_p = 4,14$ kJ/kg K. As amostras de leite (50 ml) foram previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 min. O microorganismo selecionado foi *E. coli* (cepa ATCC 11229), fornecido pelo CEPPA (Centro

de Tecnologia e Pesquisa de Alimento do Paraná da Universidade Federal do Paraná), o qual foi reativado em 5 ml de caldo enriquecedor BHI (*Brain Heart infusion* – Cód 0037-17-8) a 36° C por 24 h e diluído em Peptona Bacteriológica 0,1% (BIOBRAS Diagnóstico – Cód. 177-2) até concentração final de $2,5 \times 10^4$ UFC/ ml para efetuar a inoculação no leite, antes dos testes com PCE.

Equipamentos

O leite previamente contaminado foi tratado em uma câmara de tratamento de poliuretano cilíndrica (Figuras 1 e 2) com eletrodos de carbono planos e paralelos [2], com uma distância entre os eletrodos de 0,5 cm, área de 19,62 cm² e volume de 9,82 ml (aproximadamente 10 ml). A câmara de tratamento foi conectada a um gerador de pulso - Impulse Teste P35 da HAEFELY® (Tecnologia de alta tensão) interligado a um registrador de tensão e corrente - Osciloscópio (TEKTRONIX TDS 744 A). O gerador de pulso produziu pulsos do tipo duplo exponencial - $A(e^{-t/1,2} + e^{-t/50}) = U(t)$ - de 1,2µs (tempo de subida) por 50 µs (tempo de descida) e frequência de pulsos de 6 pulsos/min. Nas figuras 1 e 2, pode-se observar a estrutura externa e interna do compartimento de tratamento cilíndrico de poliuretano.

Método de detectar *E. coli* mediante fluorescência por contagem padrão de bactérias aeróbicas mesófilas em placas

A avaliação microbiológica foi realizada pelo método de contagem padrão para bactérias mesófilas SIQUEIRA (1995). Este método consiste em contar

Figura 1. Planta do compartimento de tratamento cilíndrico de poliuretano em mm. Visão frontal (à esquerda), lateral (abaixo), estrutura interna (à direita), eletrodo de carbono com 5 mm espessura e 50 mm de diâmetro (à direita abaixo)

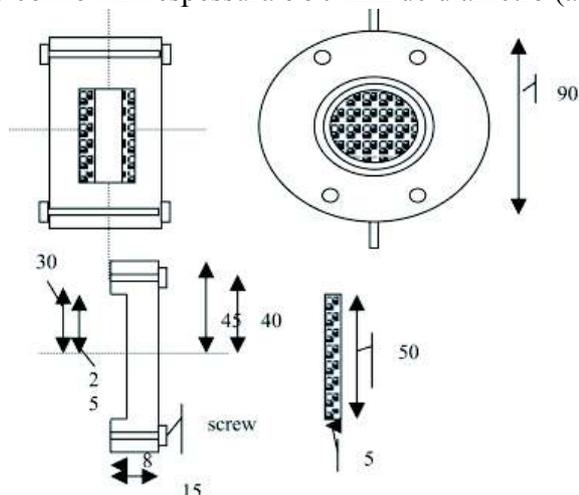


Figura 2. Parte interna do compartimento de tratamento de poliuretano: 3 espaçadores de borracha (evitar a atração entre os eletrodos durante a formação do campo elétrico), eletrodo de carbono (placas planas e paralelas com 5 mm de espessura), canal de entrada e saída do material líquido (2 mm), parafusos de silicone, vedante de borracha circular



colônias fluorescentes mediante exposição à luz UV. A concentração do inóculo de *E. coli* ATCC 11229 foi previamente definida para a realização dos testes com PCE, a qual foi de $2,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ UFC/ml sendo inoculado 1 ml do inóculo em 50 ml de leite esterilizado. O leite

contaminado foi inoculado em placas com PCA (Plate Count Agar) + MUG (4-metilumbelifereil- β -D-glucorônico) antes e após dos testes com PCE. O MUG em contato com a enzima GUD (β -D-glucoronidase), liberada pela *E. coli*, produz o 4-metilumbeliferona

– substância que quando exposta à luz UV produz fluorescência, [9].

Método de tratamento de alimento líquido por Pulso de Campo Elétrico (PCE)

O leite previamente contaminado com *E. coli* ATCC 11229, foi inserido no compartimento de poliuretano cilíndrico com auxílio de seringas descartáveis (10 ml) a uma temperatura de 10° C, e então submetido ao tratamento com PCE. Os testes foram realizados em duplicatas. O tratamento com pulso de campo elétrico (PCE) consistiu de aplicações de pulsos de curta duração (12/50 µs) sobre o alimento. Variou-se a tensão de 15 a 30 kV e o número de pulsos de 5 a 20 pulsos com intervalo entre um pulso e outro de 10 segundos (6 pulsos/min). O osciloscópio registrou as variações de corrente e tensão decorrentes do processo. Após as aplicações dos pulsos, os leites tratados foram transferidos para erlenmeyers de 125 ml esterilizados e em seguida inoculados em profundidade em

PCA + MUG nas diluições de 10⁰ a 10⁵ UFC/ ml e encubados a 36° C por 24 h. As contagens foram realizadas antes e após o tratamento com PCE, e os resultados encontram-se na figura 4 .Os resultados da redução da população de *E.coli* foram calculados como:

$$R = \log (N^{\circ}/N_f) \quad (1)$$

Sendo:

R - redução microbiana;

N^o - número de células de *E.coli* antes da aplicação com PCE ;

N_f - número de células após a aplicação com PCE .

Forma do Pulso

A forma do pulso utilizada nas aplicações de PCE foi do tipo dupla exponencial conforme figura 3 e de acordo com a seguinte fórmula:

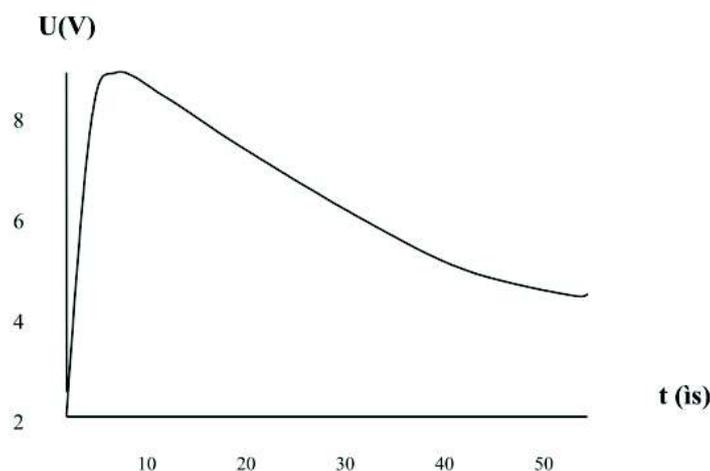
$$Y(t) = 10 * (e^{-t/150} - e^{-t/1,2}) \quad (2)$$

Sendo:

t₁ - tempo de subida = 1,2 µs

t₂ - tempo de descida = 50 µs

Figura 3. Forma do pulso do tipo dupla exponencial



Resultados e Discussão

O compartimento de tratamento em poliuretano cilíndrico foi desenvolvido de forma que facilitasse a assepsia do equipamento e garantisse a sanidade do alimento durante o processo. O projeto do compartimento possibilita a variação do tipo do eletrodo e da distância entre os mesmos variando a espessura do eletrodo de acordo com a intensidade do campo desejado, podendo deste modo aumentar ou reduzir a intensidade do campo elétrico interno. O sistema de entrada e saída do alimento líquido é por injeção, o que evita contaminação cruzada. O formato cilíndrico faz com que diminua a dissipação do campo elétrico pela ausência de pontas nas extremidades Barbosa, Cánovas, Górgora-nieto e Swanson (1999). A presença de espaçadores evita a aproximação das placas por atração causada pelo campo elétrico.

O projeto do compartimento de poliuretano foi desenvolvido para atingir a máxima intensidade de campo elétrico possível, pois, de acordo com Jacob, Foster e Berg (1981), quanto maior a intensidade do campo elétrico aplicado, maior a inativação microbiana. A intensidade do campo elétrico é dada pela razão entre a tensão aplicada (kV) e a distância entre os eletrodos (cm). A máxima tensão gerada pelo Impulse Tester P35 foi de 30 kV, o que gerou campos de até 60 kV/cm. Zimmermann 1986, constatou que quando suspensões de células são submetidas a pulso de campo elétrico de 2 a 20 kV /cm por um intervalo de tempo, ns à μ s e um potencial ao redor de 1V é alcançado em resposta a um campo elétrico externo, a membrana celular se rompe. Constatou também, que a

extensão da permeabilidade da membrana depende da intensidade e da duração do pulso aplicado. Heinz,^[5] constatou que a eficácia do tratamento com PCE pode ser estimada considerando primeiramente as propriedades físicas do alimento como a condutividade elétrica σ e a capacidade de aquecimento específica C_p . Embora um efeito direto da condutividade do meio, no mecanismo de campo elétrico, induz à permeabilidade da membrana, esta pode ser alterada se a duração do pulso, no campo elétrico supercrítico, for maior que 1 μ s, pois a energia do pulso dissipa podendo ocorrer simultaneamente um aquecimento do meio da suspensão, sendo isto crucial para a eficiência do tratamento. No decorrer dos testes observou-se que ocorreu uma dissipação da energia interna detectada pelo osciloscópio e conseqüentemente uma diminuição da intensidade do campo elétrico interno formado, não apresentando variações na temperatura do meio. O gerador de pulsos Impulse Tester P35 gerou pulsos de 1,2 μ e 10 Hertz (intervalos de 10 s entre um pulso e outro). Heinz, et al (2002); Alvarez et. al.(2003). utilizaram geradores de pulso de 2 μ e 2,3 μ e intervalos de pulsos de 1 s. Segundo Kinoshita e Tsong, (1990), o tempo de vida de um poro formado na membrana celular pelo PCE é de 1 s. Mesmo aplicando pulsos de alta intensidade (20 a 60 kV/cm) não foi possível obter uma redução microbiana esperada (2 a 4 ciclos logarítmicos), pois a frequência de 10/s, entre um pulso e outro, a duração do pulso e a dissipação da energia interna prejudicaram a eletroporação da membrana e conseqüentemente a inativação celular. Estes resultados podem ser melhores observados no gráfico da figura 4.

Na figura 4 A, foi relacionada a intensidade do campo elétrico aplicada sobre o leite e a redução microbiana de células de *E. coli* tratadas com pulso de campo elétrico. Pôde-se observar que apesar de apresentar uma mínima redução microbiana, esta variou de forma crescente com o aumento da intensidade do campo elétrico, o que significa que, aumentando a intensidade do campo elétrico, aumenta-se a redução microbiana.

Na figura 4 B foi relacionado o número de pulsos aplicados sobre o leite e a redução microbiana de células de *E. coli* tratadas com pulso de campo elétrico. Também apresentou uma mínima redução microbiana, porém pôde-se observar que houve uma variação crescente na redução microbiana com o aumento do número de pulsos aplicados, o que significa que

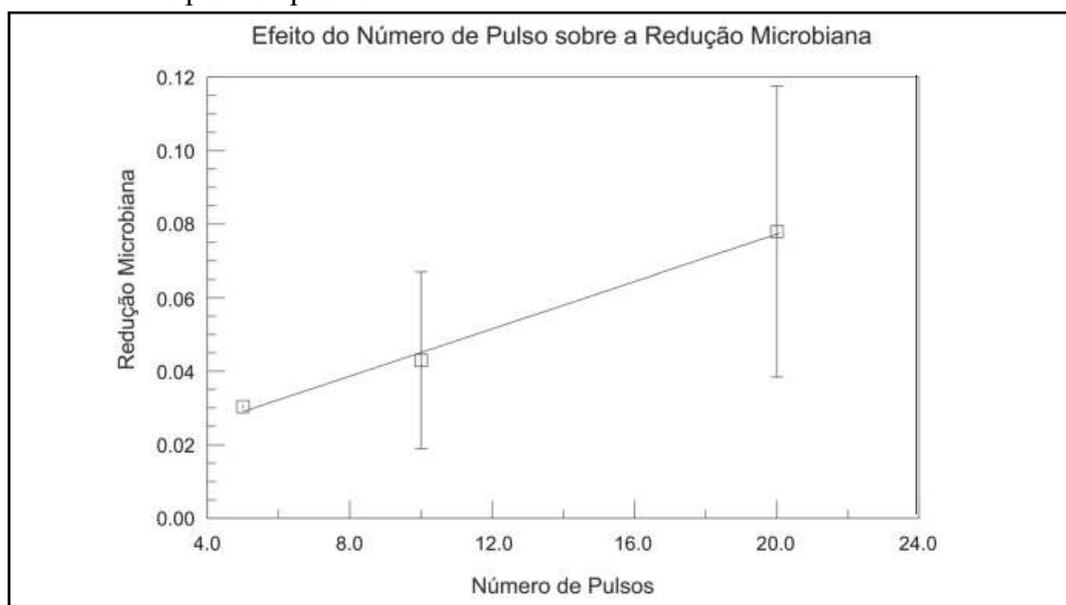
a redução microbiana é diretamente proporcional ao número de pulsos.

Através das análises microbiológicas constatou-se ausência de contaminação cruzada, o que significa que o compartimento de tratamento cilíndrico, conserva a sanidade do alimento durante o processo.

Conclusões

Os resultados obtidos nas condições deste estudo permitiram concluir que o projeto do compartimento de tratamento de poliuretano cilíndrico adequou-se ao tratamento com pulso de campo elétrico no que se refere à sanidade do alimento durante o processo (ausência de contaminações cruzada) e a capacidade de gerar campos elétricos maiores que 20 kV/cm (60 kV/cm), porém, faz-se

Figura 4. Relação entre a redução microbiana $R = \log(N^0/N_f)$, onde N^0 é o número de células *E. coli* antes do tratamento e N_f é o número de células após o tratamento com PCE e : A) Intensidade de campo elétrico, B) Número de pulsos aplicados



necessário investigar a dissipação da energia dentro da câmara de tratamento, a qual pode estar relacionada com o tipo de alimento tratado (condutividade elétrica, capacidade de calor específico), espaço interno (presença de ar) ou com o potencial elétrico dos eletrodos. Intervalos de pulsos acima de 1s prejudicam a eletroporação e diminuem a eficiência do tratamento com PCE; sugere-se trabalhar com pulsos de 1 hertz de frequência e de 2 μ s de duração. Pode-se confirmar que a redução microbiana ($\log N^0/\log N_f$) é diretamente proporcional ao número de pulsos aplicados e à intensidade de campo elétrico (kV/cm), ou seja, quanto maior o número de pulsos e da intensidade do campo elétrico, maior a redução microbiana, conforme JACOB, FOSTER e BERG (1981) havia constatado.

Referências

- ALVAREZ,R.; VIRTO, J.; RASO S.e CONDON.Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Inonovative Food Science and Technologies*, n .4,p. 195-202, 2003.
- BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V.; GÓNGORA-NIETO, M. Marcela; SWANSON, Barry G. *Presevation of foods with pulsed electric fields*. Washington: Academic Press, 1999.
- DOEVENSPECK, H. Verfahren und vorrichtung zur gewinnung der einzelnen phasen aus dispersen systemen. *DE*, n. 1 p. 237-541, 1960.
- GRAL, T.; MÁRKL, H. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, n. 45, p. 148-157, 1996.
- HEINZ, V.; ALVAREZ, I.; ANGERSBACH, A. e KONORR, D. Preservation of liquid foods by high intensity fields – basic concepsts for process design. *Trends in Food Science & Technology*, n. 12, p. 103-111, 2002.
- JACOB, H.E.; FOSTER, W.; BERG,H. Microbial implication of electric field effects. II Inactivation of yeast cell and repair of their cell envelope *Z. Allg. Mikrobiol*, n. 21, p.225- 233, 1981.
- JEYAMKODAN, S.; JAYAS, D. S. e HOLLEY, R.A.Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection*, n. 62, p. 1088-1096, 1999.
- KINOSITA,K, JR; TSONG, T.Y. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, n. 471, p.227-242, 1977b.
- MERK, E. *Manual de meios de cultivo Merk* ®. Darmstad, 1990. P. 275-272.
- MERTENS, B.; KONORR, D. Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technol.*, v. 5, n.46, p.124-133, 1992.

POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Magnetic-field inactivation of microorganisms and generation of microbiological changes. *Food Technol.* V. 12, n.47, p. 85-93, 1993.

QUIN, B.L.;POTHADAMURY, R.U.;VEGA, H.; MARTIN, O.; CANOVAS, G.V.B.; SWANSON, B.G. Food pasteurization using high intensity pulsed electric fields. *Food Technology*. December, p. 55-60, 1995.

SIQUEIRA, R. S. *Manual de microbiologia de alimentos*. EMBRAPA/SPI. Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial, Rio de Janeiro, 1995.

TSONG, T.Y. On eletroporation of cell membranes and some related phenomena. *Bioelectrochem. Bioenergetics*, n. 24, p. 271-295, 1990. Review.

WOUTERS, P. C.; ALVAREZ, I. e RASO, J. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science & technology*, n. 12 p. 112-121, 2001.

ZIMMERMANN, U. Electrical breakdown, eltropermeabilization and electrofusion. *Rev. Phys. Biochem. Pharmacol.*, n. 105 p. 176-256, 1986.