

UNIVERSIDADE REGIONAL DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES - CAMPUS DE
ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA DE MELLO SILVA

**INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

ERECHIM, RS – BRASIL
MARÇO DE 2011

JULIANA DE MELLO SILVA

INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Orientadores: Marcio Antonio Mazutti

José Vladimir de Oliveira

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO DE 2011

Juliana de Mello Silva

INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Marcio Antonio Mazutti, D. Sc
Orientador

Prof. José Vladimir de Oliveira, D. Sc.
Orientador

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc
URI – Erechim

Prof. Luciane Maria Colla, D. Sc
UPF – Passo Fundo

Erechim, 04 março de 2011

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Estela e Leonardo, pelo amor e carinho, e por mais uma vez me apoiarem de forma incondicional permitindo que mais este sonho se tornasse realidade, e ainda assim por me mostrarem que apesar de algumas dificuldades, com estudo, força e dedicação, eu fui capaz de superá-las.

Ao meu irmão Leonardo que é fundamental na minha vida e a quem eu tanto amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos, me concedendo força, determinação, paciência e sabedoria para seguir adiante.

Aos meus familiares por todo amor, apoio e incentivo em minha vida e trajetória profissional, que sempre estiveram presentes com uma palavra amiga, de paz, me mostrando o quanto é importante ter fé e o apoio da família em todos os momentos.

Ao meu orientador Marcio Mazutti pela amizade, orientação e por me receber em seu projeto, depositando confiança em meu trabalho e possibilitando um aprimoramento profissional, assim como pelos ensinamentos preciosos, confiança e incentivo.

Ao meu orientador Vladimir pela orientação, confiança, amizade e pela oportunidade de crescimento profissional e enriquecedores ensinamentos.

Ao profº Rogério Cansian pelas contribuições que ajudaram a enriquecer esse trabalho.

A minha amiga e irmã Kátia Rezzadori pela amizade, pela força e apoio, por ter acrescentado valiosos ensinamentos, pela ajuda e disposição a qualquer momento, sempre com muito carinho e atenção; Poiaaa, sua ajuda foi muito importante e fundamental.

A minha amiga Muriel que mesmo longe, sempre me apoiou e me deu forças para que eu continuasse estudando. Muri obrigada pela tua amizade e por todos momentos que passamos.

Aos estagiários e colegas do Laboratório de Termodinâmica e Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela ajuda, apoio e momentos alegres que passamos juntos.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos
URI-Campus de Erechim.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Juliana de Mello Silva

Março / 2011

Orientadores: Marcio Antonio Mazutti

José Vladimir de Oliveira

A utilização de métodos inovadores de estabilização microbiológica em alimentos como alternativa ao método térmico tem se mostrado promissora para a obtenção do melhor compromisso entre segurança e qualidade. O processo a alta pressão consiste em uma tecnologia inovadora de processamento de alimentos com utilização de pressões elevadas, que possui vantagens em relação às tecnologias térmicas convencionais, mantendo as características sensoriais do alimento bem próximas do original e garantindo um alimento seguro do ponto de vista microbiológico, por prolongado período de vida útil. Este trabalho é focado no uso de dióxido de carbono supercrítico para a inativação de *Escherichia coli* patogênica. Foi utilizada a metodologia de planejamento experimental para avaliar os efeitos da pressão (80-280 bar), da taxa de despressurização (10-110 bar.min⁻¹) e dos ciclos de pressão (1-5 ciclos) na inativação utilizando o método estático sintético. O número de ciclos de pressão e a pressão mostraram influência significativa na inativação de *E. coli* com CO₂ supercrítico, indicando que o aumento do número de ciclos de pressão e a pressão do sistema melhoram a eficiência da inativação. A inativação microbiana seguiu uma cinética de primeira ordem, onde as taxas aumentaram com o aumento da pressão de 80-160 bar. Os tempos de redução decimal (D) variaram de 1,03 a 5,35 min. A dependência da pressão da taxa de inativação específica de *E.coli* pode ser descrita pelo valor *z*, o qual foi encontrado como sendo 113,64. Os resultados apresentados são úteis para fornecer uma esterilização não térmica efetiva dos alimentos em escala piloto/industrial.

Palavras-chave: Inativação. *Escherichia coli*. Dióxido de carbono.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

INACTIVATION OF *Escherichia coli* USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

Juliana de Mello Silva

March / 2011

Advisors: Marcio Antonio Mazutti

José Vladimir de Oliveira

The use of innovative methods for microbial sterilization as an alternative to thermal method has shown to be promising to obtain the best compromise between safety and quality. The high pressure process consists of an innovative technology of food processing, which has advantages over conventional thermal technologies, while maintaining the sensory characteristics of food very close to the original and ensuring a safe food from microbiological point of view by extending shelf-life. This work is focused on the use of supercritical carbon dioxide to inactivate of pathogenic *Escherichia coli*. It was used the experimental design methodology to evaluate the effects of pressure (80-280 bar), depressurization rate (10-110 bar.min⁻¹) and pressure cycling (1-5 cycles) on the inactivation using the static-synthetic method. The number o pressure cycles and the pressure showed significant influence on inactivation of *E. coli* with supercritical CO₂, indicating that the increase in the number of pressure cycles and system pressure improve the efficiency of the inactivation. Microbial inactivation followed first order reaction kinetics, where the rates increased with increasing pressure from 80 to 160 bar. The decimal reduction times (D) ranged from 1.03 to 5.35 minutes. The pressure dependence of the *E. coli* specific inactivation rates can be described by the z value, which was found to be 113.64. The results reported here are useful to provide an effective non-thermal sterilization of foods in pilot/industrial scale.

Key-words: Inactivation. *Escherichia coli*. Carbon dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de fases P-T para um fluido puro.....	20
Figura 2 - (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO ₂ puro. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ($T < T_c$) para fluido supercrítico ($T \geq T_c$), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da P_c	21
Figura 3 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.....	29
Figura 4 - (a) Vista geral da unidade (b) Célula de equilíbrio de volume variável.....	30
Figura 5 - Detalhe da janela de safira mostrando o posicionamento do termopar.....	30
Figura 6 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do primeiro DCC na inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico.....	35
Figura 7 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do segundo DCC na inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico.....	38
Figura 8 (a – e) – Avaliação cinética da inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico: a) 80 bar; b) 100 bar, c) 120 bar, d) 140 bar e e) 160 bar.....	39
Figura 9 – Figura 9 - Determinação da constante de inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico considerando uma cinética de primeira ordem para as pressões de 80, 100, 120, 140 e 160 bar.	42
Figura 10 – Determinação da constante z para a inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis das variáveis independentes avaliadas nos dois DCC.....	33
Tabela 2 – Matriz contendo os resultados experimentais obtidos no primeiro DCC para a avaliação da inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico.....	34
Tabela 3 – Matriz contendo os resultados experimentais obtidos no segundo DCC para a avaliação da inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico fixando-se o tempo total de processo em 160 minutos.....	37
Tabela 4 – Efeito da pressão do sistema na constante de inativação e no tempo de redução decimal obtidos na inativação de <i>Escherichia coli</i> com CO ₂ supercrítico.....	43

INDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	4
2.2. MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRESERVAÇÃO.....	5
2.3. NOVOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	6
2.3.1. Processamento a alta pressão.....	7
2.3.1.1. Processamento a alta pressão utilizando dióxido de carbono.....	12
2.3.2. Inativação de microrganismos a altas pressões.....	13
2.3.2.1. Inativação de microrganismos usando dióxido de carbono supercrítico.....	17
2.4. APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS.....	19
2.4.1. Mecanismo de ação bactericida do dióxido de carbono.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	26
3.2. DESCRIÇÃO DO APARATO EXPERIMENTAL.....	26
3.3. DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS A ALTAS PRESSÕES.....	31
3.4. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DO MICRORGANISMO <i>Escherichia coli</i>	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> USANDO CO ₂	34
4.2. AVALIAÇÃO CINÉTICA DA INATIVAÇÃO DA <i>Escherichia coli</i> COM CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	39
5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES.....	46
6. SUGESTÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A procura por tecnologias não convencionais de processamento de alimentos vem, norteando grande parte das pesquisas nas instituições públicas e privadas. A demanda por produtos de melhor qualidade nutricional e sensorial, com características mais próximas ao produto *in natura*, tem levado à busca de processos capazes de preservar o produto contra os agentes deteriorantes, sem acarretar os efeitos adversos dos processamentos convencionais, notadamente dos processos envolvendo tratamento térmico. Como a obtenção de alta qualidade é um dos desafios da indústria de alimentos, técnicas de preservação moderadas, capazes de reter a qualidade inicial dos alimentos, estão sendo consideradas interessantes por processadores de alimentos.

Dentre as inovações tecnológicas para preservação de alimentos, encontra-se o processamento por alta pressão ou, do inglês, *high pressure processing*. Esta tecnologia consiste em submeter alimentos a altas pressões, com o objetivo de inibir microrganismos patógenos e inativar enzimas, enquanto deixa intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos. Com isto, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de causar a degradação mínima do sabor e de nutrientes quando comparada à pasteurização térmica tradicional (GOULD, 2001). Chen (2007) afirma em seu trabalho que a principal vantagem desta tecnologia é que ela pode inativar os microrganismos sem afetar os atributos de qualidade dos alimentos.

Alta pressão de dióxido de carbono (HPCD) é uma tecnologia não-térmica de preservação de alimentos. Reduz o número de microrganismos presentes em alimentos líquidos por várias ordens de magnitude. No tratamento a alta pressão com dióxido de carbono, o alimento entra em contato com o CO₂ pressurizado por um determinado período de tempo. O CO₂ pressurizado tem a capacidade de difundir através dos sólidos e dissolver materiais, resultando em uma ação bactericida. Os mecanismos pelos quais o CO₂ pressurizado inativa microrganismos têm sido extensivamente estudado nos últimos anos (KARAMAN E ERKMEN, 2001; FERRENTINO et al. 2010; ZHANG et al., 2006). O conhecimento do mecanismo exato de inativação poderia ajudar na interpretação da cinética

de curvas de sobrevivência identificando os parâmetros que são os fatores que causam a inativação (FERRENTINO et al., 2010).

Os efeitos biocida do HPCD foram quantificados em várias espécies de bactérias e foram resumidos por Zhang et al. (2006), Spilimbergo e Bertucco (2003) e Garcia Gonzalez et al. (2007). A utilização do CO₂ como agente esterilizante tem vários benefícios potenciais, uma vez que não é inflamável, não-tóxico, inerte na maioria das situações que ele não reage com polímeros e apresenta temperatura crítica baixa (31,1 °C), que é apenas ligeiramente acima da temperatura ambiente. Assim, degradações térmicas não são um problema quando um processo é operado em torno da temperatura crítica, o CO₂ supercrítico tem estado de baixa viscosidade e tensão superficial zero, assim podem penetrar rapidamente em estruturas complexas e materiais porosos. Finalmente, o CO₂ é barato e facilmente disponível, o que torna a esterilização com CO₂ economicamente viável (ZHANG et al., 2006).

A presença de *Escherichia coli* em alimentos como carne, peixe e leite é um indicador de contaminação fecal, causando surtos de diarreia, gastroenterite e síndrome urêmica hemolítica (KARAMAN e ERMEN, 2001). Estudos sobre os efeitos do CO₂ comprimido sobre *Escherichia coli* têm sido relatados (BALLESTRA et al, 1996; ERKMEN, 2001; KARAMAN e ERKMEN, 2001; GUNES et al., 2006; KIM et al., 2007). Karaman e Erkmén (2001) avaliaram a cinética de inativação de *Escherichia coli* por dióxido de carbono a alta pressão e verificaram que as taxas de inativação aumentaram com a crescente pressão de 25-100 atm, temperatura de 20-48 °C e tempo de exposição. Kim et al. (2007) utilizaram dióxido de carbono supercrítico para a inativação de *Escherichia coli* patogênica O157:H7 e *Escherichia coli* genérica. Para ambas as linhagens foram verificadas diminuição da ordem de 8 log na contagem microbiana em 15-30 min, na faixa de tratamento de 80-150 bar e 35-45 °C. Além disso, foi relatada a deformação e o colapso das células tratadas com CO₂ supercrítico.

Todos estudos acima citados relataram os efeitos da pressão, temperatura, estado fisiológico, meio de crescimento e tempo de exposição sobre a cinética de inativação de *Escherichia coli*. No entanto, os autores não avaliaram os efeitos da taxa de despressurização e ciclos de pressão. Alguns autores verificaram que as células foram mecanicamente rompidas pela rápida expansão das emissões de CO₂ no interior das células durante a descarga de *flash* de pressão (FRASER, 1951; FOSTER et al., 1962). Os ciclos de pressão envolvem repetidas liberações e compressões de CO₂. A operação de ciclos de pressão pode melhorar a

desativação devido ao aumento da ruptura celular e transferência de massa (ZHANG et al., 2006). Fraser (1951) alcançou mais de 90% de ruptura celular somente após dois ciclos de pressão, pelo menos um aumento de 15% a partir de uma única etapa de pressurização. Dillow et al. (1999) observaram aumento significativo na redução de log com ciclos de pressão.

Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho é avaliar os efeitos da pressão (80-280 bar), da taxa de despressurização ($10-110 \text{ bar.min}^{-1}$) e dos ciclos de pressão (1-5 ciclos) na inativação de *Escherichia coli* por dióxido de carbono supercrítico usando o método estático sintético.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

A conservação de alimentos tem por objetivo oferecer ao indivíduo, alimentos e produtos alimentícios, não só dotados de qualidades nutritivas, organolépticas e de palatabilidade normais, mas principalmente isentos de micro-organismos nocivos e suas toxinas.

Segundo Evangelista (2001), muitos dos processos de conservação e preservação de alimentos utilizados antigamente foram precursores dos empregados nos dias de hoje. O calor, o frio, a exposição ao sol, defumação e a salga constituíram e fizeram parte de processos pioneiros para a manutenção do tempo de “vida útil” dos alimentos.

O principal fundamento da conservação de alimentos é prevenir as alterações, sejam elas de ordem física, química ou biológica. Assim, é de extrema importância que a matéria prima alimentícia a ser submetida aos processos de conservação tenha um número inicial de microrganismos o mais baixo possível (SILVA, 2000).

De acordo com Matser et al. (2004), para estender a vida útil dos alimentos, através do processamento (congelamento, secagem, pasteurização ou a esterilização), muitas vezes é necessária à utilização de métodos tradicionais de pré-conservação dos produtos, os quais, possuem a desvantagem de um aquecimento lento e taxa de resfriamento rápido, e isso afeta negativamente a qualidade do produto. Os cientistas de alimentos e da indústria alimentar estão, portanto, à procura de novos métodos que podem destruir micro-organismos indesejáveis, com menos efeitos adversos sobre a qualidade do produto.

A conservação de alimentos consiste em empregar técnicas capazes de protegê-los contra a ação de agentes deteriorantes, principalmente os microrganismos, assegurando-lhes características similares àquelas do produto *in natura*. Os métodos e processos empregados na conservação de alimentos, não se apóiam apenas na redução parcial ou integral da ação de elementos deterioradores, mas também na modificação ou eliminação dos diversos fatores

indispensáveis ao desenvolvimento microbiano, tornando o meio inadequado à sua sobrevivência e multiplicação (SILVA, 2000).

2.2. MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRESERVAÇÃO

Os métodos tradicionais de preservação de alimentos consistem na utilização de calor ou refrigeração/congelamento. A conservação de alimentos pelo calor significa aplicação de métodos e de técnicas resultantes de processos controlados industrialmente como pasteurização, tindalização, branqueamento, esterilização, entre outros (SILVA, 2000). Os métodos de conservação pelo calor visam à eliminação de microrganismos inconvenientes e, quando isso não é possível, procuram impedir ou retardar o seu crescimento (EVANGELISTA, 2001).

A conservação de alimentos através da refrigeração/congelamento é um processo que pode retardar as reações químicas e enzimáticas, diminuindo também o ritmo de crescimento de microrganismos e a velocidade geral, podendo-se inclusive eliminar parte desses microrganismos, em temperaturas de congelamento menores que -10 °C, que normalmente paralisam o crescimento dos sobreviventes (SILVA, 2000). Segundo Evangelista (2001), os principais processos empregados pelo frio são: pré-refrigeração, refrigeração, congelamento, supergelação e liofilização. A indicação de cada um dos diferentes processos de frio é feita de acordo com o tipo, constituição e composição química do alimento e o tempo requerido para sua conservação, sem que haja sensíveis perdas de seu valor nutritivo e de seus caracteres organolépticos.

Segundo Silva (2000), a maioria dos alimentos contém teor de água suficiente para permitir a ação de suas próprias enzimas e de microrganismos que nele se encontram, de modo que, para preservá-los, faz-se necessária a remoção da maior quantidade de água possível. Assim, os processos de conservação de alimentos pelo controle de umidade, geralmente são conseguidos pela remoção da umidade.

De acordo com Evangelista (2001), alguns aditivos, ácidos, gases, sal e açúcar são empregados como meios de conservação de alimentos. Os aditivos conservadores previnem ou retardam os processos de deterioração de produtos alimentícios. A adição de sal impede o desenvolvimento microbiano, por tornarem o substrato inadequado pela elevação da pressão osmótica do produto. Da mesma forma, Silva (2000), sugere que a presença do açúcar

aumenta a pressão osmótica do meio, criando assim condições desfavoráveis para o crescimento de microrganismos, em consequência da redução da atividade de água do substrato.

2.3. NOVOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Costa et al. (1999) afirmam que as novas tendências em tecnologia, além de preservar as características do alimento, devem buscar segurança ao meio ambiente, revelando preocupação com o equilíbrio entre a produção e o consumo de alimentos. Uma das consequências desta demanda é o crescente interesse por tecnologias de processamento/conservação que não provoquem alterações indesejáveis no alimento e também não agredam o meio ambiente, sendo denominadas de “tecnologias não convencionais”, “tecnologias emergentes”, “tecnologias limpas” ou “tecnologias de baixo impacto ambiental”.

Com o processo de globalização da economia, as indústrias de alimentos a nível mundial têm buscado mudanças gerenciais visando aumento de produtividade e melhoria de qualidade dos produtos, de forma a fazer frente a mercados cada vez mais competitivos e a conquistar nichos de mercado específicos. Nesse sentido, a pesquisa e desenvolvimento de tecnologias alternativas de conservação, que propiciem a obtenção de produtos com melhores características sensoriais e nutricionais comparativamente aos processos envolvendo tratamento térmico, vêm sendo realizada em centros de pesquisa de empresas e em universidades em diversos países. Dentre essas tecnologias destacam-se o tratamento ôhmico, o processamento por campos eletromagnéticos, a tecnologia de ultrassom, a irradiação ionizante, a esterilização por membranas e, em especial, a tecnologia de alta pressão (ROSENTHAL e SILVA, 1997).

De acordo com Franco e Landgraf (2005), o conhecimento dos fatores extrínsecos e intrínsecos que agem sobre um determinado alimento permite prever sua “vida de prateleira”, sua estabilidade microbiológica, bem como, conhecer a capacidade de crescimento e/ou produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes. Porém, o conhecimento de cada uma dessas características isoladamente é pouco útil, devido aos efeitos entre elas. O estudo destas interações entre os vários fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a capacidade de sobrevivência e de multiplicação dos microrganismos nos alimentos

deu origem ao famoso conceito dos obstáculos de Leistner. Assim, o conceito de teoria dos obstáculos se baseia na utilização simultânea de mais de uma forma de controle microbiano nos alimentos, como salga, acidificação, processamento térmico, adição de conservantes químicos.

Uma das tecnologias pode ser o processamento de alta pressão. Alta pressão é utilizada para inativação de microrganismos através de danos nas membranas, desnaturação de proteínas e diminuição do pH intracelular (MATSER et al., 2004). A tecnologia a alta pressão consiste na aplicação de pressões extremamente elevadas na ordem de 500-10.000 bar, aos alimentos, de modo a se obter a destruição ou inativação de microrganismos e enzimas deteriorantes. A transmissão da pressão ocorre de forma isostática, ou seja, instantânea e uniformemente por todo o alimento, e, portanto de modo distinto do que ocorre no tratamento térmico, em que a penetração de calor depende do tempo e da geometria do produto (ROSENTHAL e SILVA, 1997).

2.3.1. Processamentos a alta pressão

O tratamento a altas pressões foi reconhecido como uma técnica de preservação em potencial há aproximadamente um século atrás, com trabalhos realizados por Hite em 1889. Primeiramente, o processo à alta pressão hidrostática foi utilizado com sucesso para melhorar a qualidade do leite e também para demonstrar a susceptibilidade de microrganismos presentes em frutas (JAY, 2005). Desde então, o processamento por altas pressões em alimentos tem sido extensamente estudado durante o último século.

Coelho (2002) cita em seu artigo que Hite e Bridgman foram os primeiros a escrever sobre a aplicação da alta pressão hidrostática em biomoléculas. Data de 1899 quando Hite desenvolveu um equipamento capaz de produzir pressões da ordem de 100.000 psi (em torno de 680 MPa) submetendo vários alimentos e bebidas a alta pressão. Em 1914, Bridgman fez a primeira observação sistemática do efeito da pressão em proteína. Ele observou que a aparência da albumina do ovo submetida a 7500 bar (~750 MPa) era semelhante ao seu cozimento a 100 °C, e que o efeito era irreversível. Isto levou a uma excepcional contribuição para a influência da pressão em biomoléculas nos últimos 50 anos, incluindo aí os alimentos.

Embora tenha sido inicialmente investigada a mais de um século, as pesquisas em tecnologia de alta pressão aplicadas em alimentos se restringiram a iniciativas isoladas até o final dos anos 80. No início dos anos 90, com a implementação de um Programa de Alta Pressão pelo Governo Japonês, envolvendo aproximadamente 30 participantes, incluindo Indústrias de Alimentos, Universidades e Institutos de Pesquisa, as pesquisas foram bastante incrementadas resultando no surgimento de diversos produtos comerciais produzidos por alta pressão (ROSENTHAL e SILVA, 1997).

A alta pressão é vista como uma tecnologia promissora para melhorar a segurança microbiológica dos produtos alimentares, preservando suas características sensoriais e nutricionais. O processamento a alta pressão fornece um meio para manter a qualidade dos alimentos, evitando a necessidade de tratamentos térmicos excessivos ou conservantes químicos. O processo a altas pressões proporciona uma oportunidade única para os processadores de alimentos para desenvolverem uma nova geração de produtos alimentícios com valor agregado tendo qualidade e *shelf-life* superiores aos produzidos convencionalmente (YORDANOV e ANGELOVA, 2010).

Para compreender os efeitos da alta pressão sobre os componentes alimentares é necessário conhecer seus princípios básicos como o princípio isostático, ou seja, a pressão é transmitida de maneira uniforme e instantânea por todo o alimento, independente da sua forma ou tamanho. O princípio de “Le Chatelier”, de acordo com o qual todo e qualquer fenômeno (transição de fase, mudança na configuração molecular, reação química) acompanhado de decréscimo de volume é incrementado pela alta pressão e, se acompanhado de aumento de volume é dificultado pela alta pressão (CHEFTEL, 1995). Ainda de acordo com Cheftel (1995), uma das principais vantagens da utilização da alta pressão para o processamento de alimentos é o não rompimento das ligações químicas covalentes, as quais apresentam pequena compressibilidade, devido à mínima distância entre os átomos envolvidos na ligação, resultando na preservação dos principais compostos responsáveis pelo aroma, sabor e valor nutritivo, conservando a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos.

A tecnologia de alta-pressão apresenta potencial de aplicação, não só com o objetivo de conservação, mas também para modificar a funcionalidade e melhorar as propriedades reológicas e sensoriais dos alimentos. A sua maior vantagem consiste na possibilidade de inativar microrganismos e enzimas com máxima retenção de vitaminas e de compostos responsáveis pelo sabor, cor e aroma, originando alimento de melhor qualidade

(SANGRONIS et al., 1997). Segundo Yordanov e Angelova (2010), esta tecnologia também pode ser utilizada para alterar as propriedades funcionais e sensoriais dos diversos componentes dos alimentos, especialmente proteínas.

O tratamento a altas pressões causa a inativação de microrganismos e enzimas, enquanto deixa intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos (SMELT, 1998). Com isto, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de causar a degradação mínima do sabor e de nutrientes quando comparada à pasteurização térmica tradicional. Por serem produtos cujas características de sabor e frescor são degradadas quando submetidos a tratamento térmico, os sucos de frutas tornam-se produtos cuja conservação através do tratamento à alta pressão possa ser de grande vantagem. O produto tratado através do uso de alta pressão tende a apresentar características nutritivas, funcionais e sensoriais mais próximas às do produto natural, quando comparado ao produto tratado termicamente (CAMPOS et al., 2003).

Segundo Mermelstein (1999) existem dois métodos utilizados para o processamento de alimentos por alta pressão: o método de alta pressão hidrostática, no qual o produto é processado já dentro da embalagem final e o método de homogeneização a ultra-alta pressão ou alta pressão dinâmica, onde o produto é processado de forma contínua e depois embalado de forma asséptica.

A aplicação do processo de alta pressão hidrostática (APH) em alimentos é reconhecida desde 1890 como um método potencial de preservação pela sua habilidade em inativar microrganismos, certas enzimas e modificar as propriedades funcionais de alguns constituintes do alimento (MILLS et al., 1998).

O processo de alta pressão hidrostática consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um recipiente pressurizado, utilizando um meio que transfere pressão ao produto. Em sistemas comerciais, as pressões utilizadas enquadram-se na faixa de 400 a 700 MPa (CAMPOS et al., 2003). Na pressurização realizada em espaço confinado, emprega-se fluido (que no caso da alta pressão hidrostática é a água) que atua como meio de transferência da pressão. A pressão é aplicada de igual modo em todas as direções, o que permite aos sólidos a retenção de seu formato original (TORREZAN, 2003).

No processamento hidrostático, o produto é embalado em uma garrafa ou bolsa plástica e colocado no interior do vaso de pressão para ser processado. O processamento de produtos líquidos pode ser realizado através de um sistema semicontínuo (fora da embalagem)

utilizando três vasos de pressão e um sistema de válvulas automáticas de modo que na primeira câmara a pressão do produto é aumentada até a pressão de processo, quando é liberado; na segunda câmara o produto fica sob pressão e tempo especificados para o processo; na terceira câmara o produto é descomprimido e encaminhado para o envase asséptico (MERMELSTEIN, 1999; RITZ et al., 2001).

De acordo com Lavinas et al. (2007), o primeiro produto processado por alta pressão hidrostática foi introduzido no mercado japonês em 1990 e gradualmente, outros alimentos foram processados por esta técnica em outros países. No mercado americano foi lançado com sucesso pasta de abacate tratada por pressão. Na França, sucos de laranja e de uva processados por pressão hidrostática estão disponíveis no mercado. Segundo San Martín, Barbosa-Cánovas e Swanson (2002) apud Lavinas et al. (2007), a vida-de-prateleira de sucos de frutas foi estendida de 5 a 8 d para sucos não-tratados para aproximadamente três semanas quando pressurizados e mantidos estocados sob refrigeração. Como os sucos de frutas apresentam baixo pH e características sensoriais que são degradadas quando submetidas ao tratamento térmico, esses produtos são indicados para preservação pelo tratamento de alta pressão hidrostática.

A utilização de elevadas pressões hidrostáticas no processamento de alimentos que possuem água na sua composição, como por exemplo, o leite, suco de frutas e a carne conduzem a uma total ou, no mínimo, parcial de desativação dos microrganismos, assim como de enzimas. Além disso, o processamento com altas pressões pode provocar mudanças na estrutura das principais substâncias, como por exemplo, proteínas, lipídeos, polissacarídeos, provocando mudanças nas propriedades físicas destes alimentos, como a viscosidade e consistência. Sabe-se também que o processamento em altas pressões pode provocar mudanças no equilíbrio de dissociação da água, sais, ácidos e outras moléculas, dependendo, de alguma forma, do valor da pressão, da temperatura, bem como do tempo de duração da pressão utilizada. Essas mudanças podem ser tanto reversíveis como irreversíveis (COELHO, 2002).

Apesar dos primeiros relatos de homogeneização ser do início do século vinte, somente agora, a homogeneização a ultra-alta pressão (HUAP) tem se desenvolvido. Este processo baseia-se no mesmo princípio dos homogeneizadores tradicionais, mas operam em níveis de pressões muito mais altos (HAYES e KELLY, 2003). O desenvolvimento do processo de HUAP permitiu ainda a utilização do mesmo como método de preservação, na

medida em que causa inativação microbiana. Inicialmente desenvolvido para a indústria de laticínios, atualmente o processo é aplicado pela indústria farmacêutica, química e biotecnológica para dispersar, misturar e processar emulsões e suspensões (DIELS et al., 2005a).

O processo de HUAP é também chamado de Alta Pressão Dinâmica (APD). Este processo é realizado para alimentos fluidos com o uso de um equipamento dotado de dois pistões intensificadores de pressão que operam em sincronia, bombeando, pressurizando e empurrando o fluido na direção de uma válvula de homogeneização (TORREZAN, 2003).

O mecanismo de inativação de microrganismos no processo de HUAP não é plenamente elucidado, mas seu efeito sobre as células é de rompimento (DIELS et al., 2005b). Atribui-se a morte celular ao atrito, cisalhamento, fricção e cavitação que ocorre no momento em que o fluido passa pela válvula de homogeneização (KLENIG e MIDDELBERG, 1998), seja pelo espaço restrito para a passagem do fluido, pelas altas velocidades atingidas ou pela queda brusca de pressão. Acredita-se que todos esses mecanismos sejam válidos, mas não existe consenso sobre qual é o mais relevante para o processo (INNINGS e TRÄGARDH, 2007). Mecanismos como turbulência, velocidade e magnitude da queda de pressão e viscosidade dinâmica também foram propostos (DOULAH et al., 1975). Dois parâmetros afetam fortemente a inativação microbiana pelo processo de HUAP: a viscosidade do fluido e a temperatura (THIEBAUD et al., 2004).

A viscosidade é inversamente proporcional à inativação, onde níveis mais baixos de inativação são obtidos em fluidos mais viscosos. Isto pode ser explicado pela redução da cavitação, turbulência e pressão de impacto de fluidos viscosos. Um aumento na temperatura de entrada da amostra (de 4 para 24 °C) dê uma determinada pressão resulta no aumento da inativação microbiológica pelo processo de HUAP. Como a viscosidade do fluido geralmente diminui com o aumento de temperatura e vice-versa, este efeito da temperatura na inativação microbiana pode ser parcialmente explicado como um efeito indireto da viscosidade do fluido (THIEBAUD et al., 2004).

Meyer et al. (2000) apud Torrezan (2003) citam que os custos envolvidos na aquisição dos equipamentos e de processamento limitam o uso da tecnologia de alta pressão. Avanços têm sido realizados no desenho e construção desses equipamentos para tornar os custos de processamento mais competitivos em relação à esterilização e ao congelamento. Estima-se que os custos para modificar a linha de processamento já existente e obter o produto sob alta

pressão estejam em torno de US\$ 0,0455/libra, considerando-se a depreciação dos equipamentos como sendo de 10 anos. Esse custo é similar ao do tratamento de presunto cozido citado por Hugas et al. (2002) apud Torrezan (2003) como sendo de 0,1 euros/Kg.

Embora a tecnologia de alta pressão seja pouco empregada comercialmente, SAN MARTÍN et al. (2002) mencionam que já está sendo comercializado na Espanha, presunto fatiado tratado sob alta pressão. Com o uso dessa tecnologia, a vida-de-prateleira do produto passou de 3 para 8 semanas.

2.3.1.1. Processamento a alta pressão utilizando dióxido de carbono

Nas duas últimas décadas, o uso de dióxido de carbono à alta pressão (HPCD) emergiu como uma tecnologia promissora para a pasteurização de alimentos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). Atualmente, existe um crescente interesse na inativação de microrganismos em meios de crescimento e de alimentos usando alta pressão com dióxido de carbono sendo um processo alternativo aos tradicionais métodos térmicos.

O processamento com HPCD envolve o contato dos alimentos com um fluido supercrítico (ou seja, pressurizado), durante um determinado tempo, podendo ser de forma contínua ou semi-contínua (ZHANG et al., 2006). Este processo inativa efetivamente os microrganismos vegetativos e devido o uso de baixas temperaturas, mantém as características originais do produto. O mecanismo de inativação de bactérias por HPCD é, no entanto, ainda não totalmente elucidado, embora várias teorias foram apresentadas nos últimos anos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007; ZHANG et al., 2006).

A maioria das pesquisas com HPCD tem sido conduzidas usando suspensões de culturas puras de diferentes microrganismos e o método é preferencialmente aplicado a produtos alimentares líquidos, como sucos, cerveja, vinho e leite (DAMAR e BALABAN, 2006; GARCÍA-GONZALEZ et al., 2007). No entanto, são poucas as pesquisas realizadas com alimentos sólidos. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados é focada na inativação microbiana, enquanto que as informações disponíveis sobre os efeitos nas propriedades sensoriais, nutricionais e antioxidantes dos alimentos submetidos são ainda muito restritas.

Por essas razões mais pesquisas são necessárias para estudar o efeito específico da HPCD em alimentos. As condições de tratamentos devem ser otimizadas a fim de obter a maior descontaminação para cada produto e a menor perda sensorial, visto que a

comercialização bem sucedida deste método depende fortemente do impacto do CO₂ nas propriedades organolépticas dos produtos (CALVO e TORRES, 2010).

Karaman e Erkmén (2001) afirmam que os tratamentos a alta pressão com dióxido de carbono afetam os sistemas biológicos causando desnaturação protéica, mudança na fase lipídica, ruptura das membranas e das paredes celulares. Estudos realizados por Enomoto et al. (1997), Hong e Pyun, (2001), Liao et al., (2007) apud Liao et al. (2010), mostraram um efeito perceptível na inativação de alta pressão de dióxido de carbono (HPCD) sobre microrganismos em alimentos líquidos como uma técnica não-térmica.

Estudos realizados por Damar e Balaban (2006) demonstraram que a inativação microbiana alcançada pela HPCD variou de 2-12 logs com pressões abaixo de 50 MPa e temperaturas entre 5 a 60 °C. De acordo com Zhang et al. (2006), pelo menos 12 bactérias gram positivas, 10 bactérias gram negativas, 8 esporos bacterianos e 8 fungos como filamentos e esporos têm sido estudados com esta técnica.

Kamihira et al. (1987), Arreola et al. (1991), Lin et al. (1993), Dillow et al. (1999), Hong et al. (1999), Spilimbergo et al. (2003) apud Liao et al. (2010) relatam que o tempo de exposição, pressão, temperatura, número inicial de células, números de ciclos de pressão, pH do meio inicial, atividade de água, fase de crescimento ou idade celular, espécies de microrganismos e tipos de tratamento, podem ter efeitos sobre a inativação microbiana por HPCD.

Bae et al. (2009) investigaram o efeito de dióxido de carbono supercrítico nas temperaturas de 65 e 70 °C, pressões de 80, 100 e 120 bar e tempo de 10 – 40 min sobre os esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã. Esporos de *A. acidoterrestris* foram completamente inativados pelo dióxido de carbono supercrítico para os níveis acima de 65 °C, 100 bar por 40 min e também a 70 °C, com 80 bar durante 30 min.

2.3.2. Inativação de microrganismos a altas pressões

Segundo Cheftel (1995) apud Lavinhas et al. (2007), os primeiros estudos que avaliaram o efeito da alta pressão hidrostática (APH) sobre microrganismos em alimentos foram realizados na França, por CERTES, em 1884, e nos Estados Unidos, por HITE, entre

1899 e 1914. A partir de então, outros pesquisadores têm se dedicado ao estudo da APH em alimentos.

De acordo com Hugas et al. (2002) apud Torrezan (2003), a inativação dos microrganismos pela alta pressão hidrostática é, provavelmente, o resultado de diversos fatores. A alta pressão hidrostática não inibe e nem destrói o local específico da célula ou uma única função celular, porém, pode causar a morte da célula pelo acúmulo de danos dentro da mesma. A membrana celular é o primeiro alvo dos danos causados pelas altas pressões, principalmente pelo efeito de cristalização dos fosfolipídios, alterando sua permeabilidade. Outras funções celulares sensíveis aos efeitos da pressão envolvem troca de íons, composição de ácidos graxos, morfologia dos ribossomos e da célula, desnaturação protéica, atividade enzimática, replicação do DNA, formação do vacúolo, etc.

De acordo com Palou et al. (1999) apud Lavinhas et al. (2007), as células bacterianas vegetativas podem ser inativadas em pressões entre 400 e 600 MPa, enquanto que os esporos (formas mais resistentes) podem suportar até 1000 MPa em temperatura ambiente. Segundo alguns autores, o efeito letal da alta pressão hidrostática sobre as células vegetativas é provocado pela ionização e concomitante precipitação de complexos protéicos (SANGRONIS et al., 1997).

O processamento a alta pressão inativa microrganismos interrompendo as funções celulares responsáveis pela reprodução e sobrevivência, isto sem utilizar o produto abusivo do calor (TORRES e VELAZQUEZ, 2005). Segundo Cheftel (1995), as bactérias Gram positivas são mais resistentes aos efeitos da alta pressão hidrostática do que as Gram negativas. Já os fungos filamentosos e leveduras são muito sensíveis, enquanto que os vírus são bastante resistentes.

A aplicação de alta pressão pode causar danos à fisiologia microbiana e sua viabilidade, tanto danificando as células como inativando-as. Assim, exercem efeito direto sobre a segurança dos alimentos, podendo prolongar a sua vida-de-prateleira (TORREZAN, 2003). Ainda de acordo com Torrezan (2003), as membranas biológicas têm sido identificadas como as mais afetadas pela pressão. As membranas são compostas por uma camada de fosfolipídios envolvidos por proteínas funcionais que (entre outras funções) exercem papel importante no transporte de íons e outras substâncias para as células.

O efeito da pressão sobre os microrganismos depende de fatores relacionados com os microrganismos propriamente ditos (espécie, formato, tipo de Gram, fase de crescimento e

idade da cultura), com a natureza do meio (pH, composição do alimento ou meio de dispersão, presença de sais e/ou nutrientes, atividade de água, força iônica e tipos de íons presentes) e com as variáveis de pressão (níveis de pressão, tempo e temperatura e tipo do tratamento – contínuo ou descontínuo) (CAMPOS et al., 2003; TORREZAN, 2003).

Quanto à forma, vegetativa ou esporulada, as bactérias na forma vegetativa apresentam maior sensibilidade à pressão que na forma esporulada, pois nesta forma a resistência de muitas espécies à pressão é alta, resistindo a tratamentos a 1000 MPa pelo processo ultrapressão. Dessa forma, a aplicação mais comum da tecnologia de alta pressão na preservação de alimentos é naquelas onde o pH é baixo e a sobrevivência dos esporos não causa maiores problemas pela inabilidade dos mesmos em se desenvolver nestas condições. A forma da bactéria influencia na resistência à pressão; em geral, cocos são mais resistentes que bastonetes, pois possui uma maior resistência mecânica (MALICKI et al., 2005).

Hugas et al (2002), Cheftel e Culioli (1997), Sherry et al. (2002) apud Torrezan (2003), mencionam que a morfologia das células dos microrganismos influencia sua sensibilidade aos efeitos da pressão, sendo os bacilos mais sensíveis do que os cocos. As células anteriormente estressadas (por exemplo, aquecimento subletal ou choque a frio) apresentaram maior resistência à pressão. A temperatura exerce importante papel na inativação microbiana durante o tratamento sob alta pressão hidrostática. A inativação microbiana é menor na temperatura ótima de crescimento e maior acima ou abaixo dessa. As células anteriormente estressadas podem ser mais ou menos sensíveis ao tratamento térmico. Assim, a combinação de alta pressão com temperaturas moderadas de tratamento podem proporcionar excelentes estabilidades microbianas.

ALPAS et al. (1999) estudaram a resistência de estirpes de quatro patógenos veiculados por alimentos (*Staphylococcus aureus* 485 e 765, *Listeria monocytogenes* CA e OH₂, *Escherichia coli* O157: H7 933 e 931, *Salmonella enteritidis* FDA e *Salmonella typhimurium* E21274). Mostraram que *S. aureus* 485, *L.monocytogenes* CA, *E.coli* O157: H7 933 e *S.enteritidis* FDA foram mais resistentes à pressão do que as outras estirpes da mesma espécie.

A alta pressão hidrostática produz alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que ocorrem na membrana e na parede celular dos microrganismos (SANGRONIS et al., 1997). Além disso, aumenta a permeabilidade da célula, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução de microrganismos (CALDERÓN-

MIRANDA et al., 1998). Embora muitos estudos abordem o efeito da APH sobre os microrganismos, as causas da inativação microbiana são ainda pouco compreendidas (CHEFTEL, 1995).

Lavinas et al. (2007) citam que a capacidade de destruição ou inativação de microrganismos pelo processo de alta pressão hidrostática pode variar devido a diversos fatores tais como: nível, tempo e temperatura de pressurização, do tipo e da fase de crescimento dos microrganismos utilizados, além da composição do meio ou do alimento.

Dogan e Erkmen (2003) apud Lavinas et al. (2007) mostraram que a sensibilidade de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e submetida à alta pressão hidrostática foi maior com a elevação do nível de pressão do que com o aumento do tempo de exposição ao tratamento. Entretanto, não existe relação proporcional entre o aumento do nível de pressão e a redução da população microbiana.

Kalchayanand et al. (1998) apud Lavinas et al. (2007), sugeriram que a pressurização por longo tempo associada com baixo nível de pressão, utilizado para minimizar efeitos adversos na textura e cor do alimento, pode não ser vantajosa para a inativação microbiana.

Gola et al. (2000) apud Torrezan (2003) inocularam a mistura de oito cepas de *E. coli* O157:H7 (nível de contaminação de $10^6 - 10^7$ UFC/mL) em carne bovina crua moída e solução tampão fisiológica. Compararam seu comportamento quando submetidas a altas pressões hidrostáticas de 400, 500, 600 e 700 MPa a 15 °C durante diferentes tempos de tratamento. A cinética de inativação apresentou dois tipos de inclinações. Os experimentos mostraram reduções decimais de 2,5, 5,2 e 3,2 para os tratamentos a 400 MPa (10 min), a 500 MPa (5 min) e a 600 MPa (1 min) em solução tampão, respectivamente. O tratamento da carne a 600 MPa (2 min) provocou redução na contagem de *E. coli* O 157:H7 de $7,5 \times 10^5$ para 75 UFC/g, enquanto que a 700 MPa (1 min) causou cinco reduções decimais. Para os tratamentos sob pressão de 400 MPa (10 min), 500 MPa (3 min) e 600 MPa (2 min) as reduções decimais foram respectivamente de 2,7, 3,2 e 4,7 em solução tampão e de respectivamente, 1,4, 3,1 e 4 na carne. Tal fato evidencia que as cepas mostraram-se ligeiramente mais resistentes ao tratamento quando inoculadas na carne. É importante ressaltar que a temperatura aumentou cerca de 3°C a cada 100 MPa durante a etapa de pressurização do produto.

O lombo bovino marinado, produto cru com alta atividade de água e baixo teor de sal, sem a adição de nitrito, apresenta microbiota variada de microrganismos patogênicos e

deterioradores naturais da carne decorrentes do seu manuseio e preparo. GARRIGA et al. (2002) estudaram o lombo bovino fatiado marinado e embalado a vácuo, tratado sob alta pressão hidrostática a 600 MPa por 6 min a 31 °C. Esse tratamento foi efetivo para controlar o crescimento de bactérias aeróbicas, psicrofílicas e bactérias lácticas e, especialmente, os riscos associados a *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*.

As mudanças na qualidade e os efeitos do uso de alta pressão hidrostática na sobrevivência de microrganismos em lingüiças frescas de porco foram investigadas por Huang et al. (1999) apud Torrezan (2003). As lingüiças de porco, inoculadas com três cepas de *Listeria monocytogenes* (10^7 UFC/g), foram submetidas a pressões de 414 e 552 MPa, em temperaturas de 25 e 50 °C e intervalos de tempo de 2, 4, 6, 8 e 10 min. Significativa redução na contagem de *Listeria monocytogenes* foi verificada à pressão de 414 MPa/50 °C por 2 min. Tal condição mostrou também completa inativação dos microrganismos presentes na lingüiça de porco fresca e mudanças mínimas na sua qualidade.

A capacidade do processo de alta pressão de destruir e/ou inativar microrganismos varia grandemente de acordo com o nível de pressão e tempo de tratamento, e com o tipo de microrganismo contaminante. Enquanto que fungos, leveduras e células vegetativas são, em geral, sensíveis ao tratamento por alta pressão, certos esporos bacterianos apresentam alta resistência ao processo (ROSENTHAL e SILVA, 1997).

2.3.2.1. Inativação de microrganismos usando dióxido de carbono pressurizado

Atualmente, existe um crescente interesse na inativação de microrganismos em meios de crescimento e de alimentos com alta pressão de dióxido de carbono (HPCD) como uma alternativa aos tratamentos térmicos, devido aos aspectos benéficos sobre os atributos de qualidade, características físicas e sensoriais de alimentos pressurizados (ERKMEM, 2001). Segundo Calvo et al. (2007), o tratamento a alta pressão com dióxido de carbono tem sido aplicado principalmente em alimentos líquidos, como sucos, cerveja, vinho e leite. No entanto, os alimentos sólidos têm sido pouco estudados.

Kincal et al. (2005) avaliaram suco de laranja tratado com dióxido de carbono pressurizado e mostraram uma redução de 5 log na carga microbiana, mantendo a qualidade química e sensorial do produto tratado. Pouca diferença foi detectada em °Brix, pH e cor,

enquanto a acidez aumentou ligeiramente para as amostras tratadas com alta pressão em comparação com as amostras não tratadas.

Suco de maçã preparado a partir de ‘purê de maçã Annurca’ foi tratado com um sistema de alta pressão com dióxido de carbono. O pH, °Brix e a carga microbiana do suco de maçã pressurizado foram comparados com o suco termicamente processado. Processos térmicos foram realizados em 3, 50, 65 e 85 °C e tempos de tratamento variando entre 10 e 140 min. A análise cinética de inativação microbiana indicou a redução de 5 log da flora natural do suco de maçã, foi conseguido a 85 °C e 60 min de tempo de tratamento por processo térmico convencional e a 16 MPa, 60 °C e 40 min para o processo de alta pressão com dióxido de carbono. Não houve diferença significativa entre as amostras tratadas e não tratadas em °Brix ($p = 0,05$). Foram detectadas diferenças significativas nos valores de pH entre as amostras não tratadas e as tratadas com dióxido de carbono pressurizado ($p = 0,05$). A análise estatística de °Brix e pH não mostraram diferenças entre as amostras não tratadas e as tratadas com dióxido de carbono pressurizado nas duas primeiras semanas de armazenamento a 4 °C. Esses resultados reforçam o potencial do uso desta tecnologia em aplicações industriais (FERRENTINO et al., 2009).

A cinética de inativação de *Salmonella typhimurium* com dióxido de carbono pressurizado na faixa de 1,51 para 7,56 MPa a 35 °C foi investigada em soluções de meios de cultura e solução salina fisiológica. O tempo até atingir uma pressão exerce um importante efeito sobre a sobrevivência de *Salmonella typhimurium*. As taxas de inativação aumentaram com a pressão. A inativação seguiu uma cinética de reação de primeira ordem, com taxa de inativação específica (k) e tempo de redução decimal (D) que variaram de 0,0975 para 1,5561 min^{-1} e de 23,63 para 1,48 min, respectivamente. A dependência da pressão das taxas de inativação de *Salmonella typhimurium* pode ser descrita pelo valor z_p , dependendo das soluções de meios de cultura e solução salina fisiológica (ERKMEN e KARAMAN, 2001).

Estudos realizados por Fabroni et al. (2010) mostraram que o tratamento de suco de laranja com HPCD em pressões de operação (130 bar) e determinada quantidade de CO_2 (0,385 g CO_2 /g suco), pode garantir boa inativação microbiana, estendendo a vida de prateleira do suco de laranja fresco. As propriedades nutricionais e antioxidantes do suco tratado por HPCD mantiveram-se praticamente inalteradas até o 20º dia de armazenamento refrigerado, em seguida, verificou-se um ligeiro declínio, não relevante em relação às propriedades antioxidantes do produto. Além disso, a avaliação sensorial do produto tratado

por HPCD, por um painel treinado, sugeriu que o suco seria bem aceito pelos consumidores. Os autores consideraram que o tratamento por HPCD, não pode ser considerado uma alternativa ao tratamento térmico, mas uma nova tecnologia para obter a estabilidade e as propriedades sensoriais e antioxidantes. Ainda, sugeriu-se o grande potencial do suco de laranja tratado por HPCD como um novo produto a ser alocado no mercado de sucos de frutas frescas, dentro de um novo quadro de varejo de sucos, com vida útil de 20 dias.

Calvo e Torres (2010) utilizaram o processamento de HPCD para a inativação microbiana em páprica. Os resultados indicaram que o referido processo é viável para o produto em questão. A pressão pode ser mantida em níveis (60-100 bar) e os tempos de tratamento da ordem de 30-45 min. Estas condições foram suficientes para atingir a redução da contagem total microbiana necessária, de acordo com a legislação em vigor. Além disso, a páprica manteve a cor e sua umidade final dentro dos níveis legais para o armazenamento seguro.

2.4. APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

Um fluido supercrítico pode ser definido como uma substância na qual sua temperatura e pressão estão acima dos valores críticos (Figura 1). Entretanto, essa definição é de uso limitado, uma vez que nenhuma informação é dada sobre a densidade da substância. Darr & Poliakoff (1999), define um fluido supercrítico como qualquer substância que se encontra na temperatura, pressão e densidade acima de seus valores críticos. Próximo da densidade crítica, fluidos supercríticos apresentam propriedades que estão muitas vezes entre aquelas de um líquido e um gás. Por exemplo, um fluido supercrítico pode ser relativamente denso e dissolver certos sólidos, exibindo alta difusividade e baixa viscosidade. Ainda, fluidos supercríticos são altamente compressíveis e a densidade pode ser alterada sobre uma vasta faixa de pressão e temperatura (Figura 2a). Esta propriedade pode ser explorada, por exemplo, na separação de produtos reacionais ou no fracionamento de polímeros. Dentre os fluidos supercríticos, o dióxido de carbono tem sido amplamente usado, uma vez que sua utilização pode acarretar em alguns benefícios reais, como, a redução da utilização de solventes orgânicos tóxicos e a facilidade da separação do solvente.

Quando um líquido é aquecido acima de sua temperatura crítica a uma pressão que exceda sua pressão crítica, a transição de líquido para fluido supercrítico é contínua (Figura 2b).

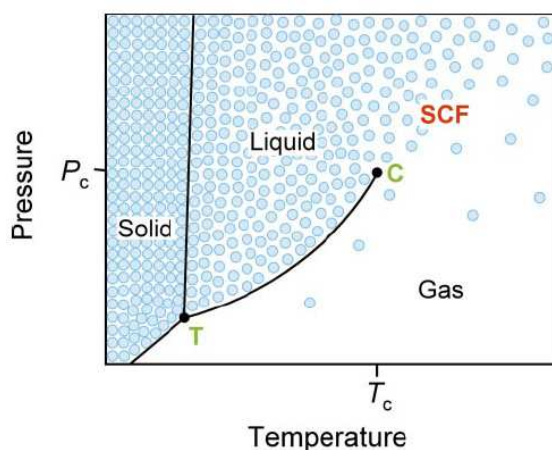


Figura 1 - Diagrama de fases P-T para um fluido puro

Fonte: Cooper (2000).

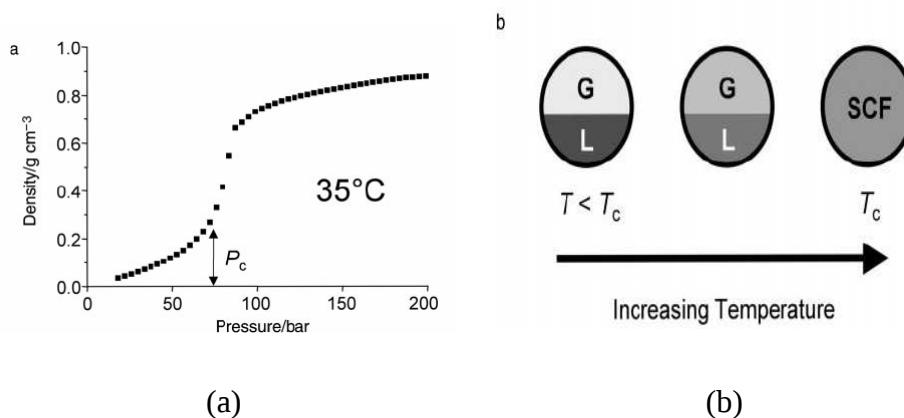


Figura 2 – (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO₂ puro a 35 °C. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ($T < T_c$) para fluido supercrítico ($T \geq T_c$), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da P_c

Fonte: Cooper (2000).

Entretanto, sob condições apropriadas (logo abaixo da temperatura e pressão crítica), o dióxido de carbono líquido apresenta propriedades semelhantes às dos fluidos supercríticos (baixa viscosidade e densidade). Como consequência, o CO₂ líquido próximo de sua condição crítica demonstra um grau de compressibilidade limitado e suas propriedades podem ser “ajustadas” em função da pressão. Uma vantagem prática de se trabalhar com CO₂ líquido é que densidades relativamente altas podem ser encontradas em pressões moderadas, por exemplo, a densidade do CO₂ líquido a 20 °C é de 0,84 g.cm⁻³ em pressões acima de 75 bar.

Segundo Palmer e Ting, (1995) apud Choi et al. (2008), a tecnologia utilizando fluido supercrítico explora o poder solvente e as propriedades físicas de um composto puro ou misturadas a temperaturas e pressões perto do ponto crítico na fase de equilíbrio. De acordo com Clifford e Williams, (2000) apud Choi et al. (2008), o dióxido de carbono supercrítico não é apenas um veículo poderoso para uma ampla gama de compostos de interesse em processamento de alimentos, mas também, é considerado inerte, de baixo custo, não-tóxico, não inflamável, de alta densidade, baixa viscosidade, disponíveis em alta pureza e não deixam resíduos.

Erkmen (2000), avaliando a inativação microbiana com dióxido de carbono a 6,1 MPa e tempo de 150 min, conseguiu reduzir 5 log a contagem de *Brochothrix thermosphacta* em carne.

A técnica de esterilização usando CO₂ supercrítico mostrou ser eficiente, uma vez que após o tratamento durante 15 min, operando a uma pressão de 150 bar, levou a mesma redução microbiana obtida no tratamento com pressão hidrostática de 3000 bar na mesma temperatura. O processo de esterilização usando dióxido de carbono supercrítico não têm sido muito explorado em escala industrial, mas apresenta vantagens relacionadas com as condições empregadas, dentre as quais, destacam-se condições mais suaves do que com tratamento a alta pressão hidrostática, condições mais facilmente controladas, ambientalmente mais seguro, uma vez que, o CO₂ é um gás atóxico, podendo ser economicamente mais viável. Até o momento, foi provado que o método garante uma inativação microbiana total de muitas espécies de bactérias, principalmente suspensa em soluções simples (SPILIMBERGO et al., 2002).

Fraser (1951), Haas et al. (1989), Wei et al. (1991), Lin et al. (1992a, 1993), Nakamura et al. (1994), Enomoto et al. (1997b), Debs-Louka et al. (1999), Hong Kong e Pyun

(1999) apud Garcia-Gonzalez et al. (2007), citaram que o dióxido de carbono é o fluido de escolha viável para reduzir a carga microbiana no processamento a alta pressão. Poucos pesquisadores aplicaram outros gases pressurizados para este processo. O gás nitrogênio (N_2) foi um dos gases mais estudados. Estudos realizados demonstram que alta pressão com CO_2 causa grande ou completa inativação microbiana, um tratamento com N_2 nas mesmas condições, mostra pouco ou nenhum efeito sobre a redução das células viáveis.

Dillow et al. (1999) apud Garcia-Gonzalez et al. (2007) salientaram a importância da proximidade do ponto crítico do fluido sobre a eficiência microbiana. Experimentos com N_2 e CO_2 foram conduzidos em condições idênticas, onde nenhum efeito esterilizante foi observado nos experimentos com N_2 , enquanto experiências com CO_2 foram muito bem sucedidas. Dado que as condições experimentais foram também retiradas do ponto crítico de N_2 ($T_c = -147\text{ °C}$ e $P_c = 3,39\text{ MPa}$), concluindo que esse gás não se comportou como os gases ideais para as propriedades de um fluido supercrítico.

Foi realizado um experimento de esterilização com tetrafluoreto (TFE), que tem propriedades críticas semelhantes ao CO_2 ($T_c = 55\text{ °C}$ e $P_c = 4,06\text{ MPa}$), mas propriedades químicas diferentes. Em uma temperatura e pressão reduzida, o experimento com TFE não resultou em redução de células viáveis quando comparados com o tratamento com CO_2 (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

Fraser (1951), Enomoto et al. (1997b), Debs-Louka et al. (1999) apud Garcia-Gonzalez et al. (2007) estudaram a pressurização com argônio (Ar) e uma mistura de N_2 e O_2 comparado ao uso de dióxido de carbono, demonstrando que a mistura foi menos eficaz que a utilização do CO_2 .

Segundo Garcia-Gonzalez et al. (2007) a ação bactericida do óxido nitroso pode ser explicada pela sua natureza química, pois este gás tem baixo peso molecular, possui alta solubilidade em lipídeos, e é relativamente não-polar, podendo rapidamente se difundir na membrana celular de fosfolipídios, influenciando diretamente na etapa de modificação da membrana celular e na remoção dos constituintes vitais das células e membranas celulares do mecanismo de ação bactericida. Além disso, o N_2O tem propriedades críticas semelhantes ao CO_2 ($T_c = 36,5\text{ °C}$ e $P_c = 7,24\text{ MPa}$). Entretanto, embora a solubilidade em água seja semelhante ao do CO_2 , o N_2O não vai acidificar a água (como faz o H_2CO_3), e, portanto, não diminuirá o pH extracelular, que influencia nas etapas de solubilização de dióxido de carbono pressurizado na fase externa líquida e redução do pH intracelular no mecanismo de ação

bactericida.

2.4.1. Mecanismo de ação bactericida do dióxido de carbono

É conhecido que o dióxido de carbono pode exercer um efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano. Estudos ainda são realizados para avaliar as principais teorias para explicação da ação bacteriostática e bactericida do dióxido de carbono.

Segundo Garcia-Gonzalez et al. (2007) existem diferentes etapas no mecanismo de inativação e este pode ser resumido da seguinte forma:

- a) solubilização de dióxido de carbono pressurizado na fase externa líquida. Em alimentos ou caldos com alto teor de água, o dióxido de carbono pode se dissolver em água para formar o ácido carbônico (H_2CO_3), o qual se dissocia em bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}) e hidrogênio (H^+) para formar o equilíbrio. Como consequência do equilíbrio, a água entra em contato com o dióxido de carbono pressurizado, tornando os íons ácidos devido à formação e dissociação do ácido carbônico, que libera íons de hidrogênio. Este fato reduz o pH extra celular que pode inibir o crescimento microbiano e também pode diminuir a resistência microbiana à inativação por causa do aumento do consumo de energia para manter a homeostase do pH pela força motriz do próton.
- b) modificação da membrana celular. Ao se aproximar da superfície da célula bacteriana, o dióxido de carbono aquoso pode se espalhar no plasma da membrana e pode se acumular dentro da sua camada lipofílica interna. A grande afinidade entre o CO_2 e a membrana plasmática foi confirmada por Spilimbergo et al. (2002), que calcularam que o dióxido de carbono pode ser dissolvido nos fosfolípidos da membrana celular em um grau muito elevado. Este montante de CO_2 acumulado na fase lipídica pode então, sofrer um transtorno tanto estrutural como funcional da membrana celular devido a uma perda na cadeia lipídica, o que pode aumentar a fluidez e, portanto, a permeabilidade da membrana.
- c) redução pH intracelular. Devido ao aumento da permeabilidade da membrana, o dióxido de carbono pressurizado pode penetrar facilmente através da membrana celular bacteriana e se acumular no interior do citoplasma das células. No citoplasma,

as concentrações relativas de ambos CO_2 e HCO_3^- aquosos, estão sendo controladas pelo pH interno como resultado do pH da homeostase, a fim de manter o pH do citoplasma constante (o que é essencial para viabilidade celular ideal e da atividade celular).

- d) inativação da enzima / inibição do metabolismo celular devido à redução do pH. Mesmo que muitos aspectos da estrutura e função celular sejam influenciados pelo pH, a atividade catalítica das enzimas é especialmente sensível. Enzimas que compõem a maioria das proteínas no citosol têm atividade máxima no pH ótimo e sua atividade diminui drasticamente em ambos lados do ideal. Assim, a redução do pH citosólico pode causar a inibição e/ou inativação de enzimas essenciais para a regulação dos processos metabólicos.
- e) efeito inibitório direto do CO_2 e HCO_3^- molecular no metabolismo. O regulamento de uma via metabólica pode ocorrer em vários níveis. A taxa de reação enzimática não é apenas uma função do pH, mas também, das concentrações intracelulares do substrato, produto, cofator, os quais são os elementos fundamentais na regulação da atividade enzimática. A concentração de ácido carbônico parece ser fundamental para a regulação da atividade enzimática com algumas enzimas sendo estimuladas e outras inibidas por este anion.
- f) transtorno do equilíbrio intracelular de eletrólitos. Danos letais ao sistema biológico das células podem ser produzidos quando aplica-se pressão e acumula-se dióxido de carbono no interior do citoplasma das células bacterianas. Este fato, pode converter o HCO_3^- para CO_3^{2-} , o que poderia precipitar eletrólitos inorgânicos intracelulares a partir de células e membranas celulares.
- g) remoção dos componentes vitais das células e membranas celulares. Diferentes autores Kamihira et al. (1987) Lin et al. (1992a, 1993) apud Garcia-Gonzalez et al. (2007) também sugeriram que o CO_2 acumulado pode ser devido ao seu poder de solvência relativamente alto - "extrair" constituintes vitais das células ou das membranas celulares. Neste mecanismo, sob pressão, o CO_2 primeiro penetra nas células para construir a densidade de um nível crítico no interior das células, depois, remove componentes intracelulares (como fosfolípidos e compostos hidrofóbicos) para perturbar ou alterar a estrutura das membranas e / ou o equilíbrio do sistema biológico, promovendo assim a inativação.

De acordo com Jacobsen e Bertelsen, (2002) apud Choi et al. (2008), o dióxido de carbono supercrítico é facilmente absorvido pela carne e pode diminuir o pH. Quando a carne é exposta ao dióxido de carbono, o ácido carbônico é formado, se dissociando em bicarbonato e íons de hidrogênio. Além disso, a pressão e a temperatura do tratamento podem afetar as interações moleculares e conformação da proteína, levando à desnaturação e agregação da proteína da carne (Messens, Van Camp, Huyghebaert, 1997).

Os efeitos inibitórios do dióxido de carbono supercrítico em bactérias patogênicas de origem alimentar são causados pela indução do seguinte fenômeno: (1) a ruptura celular explosiva devido a um aumento da pressão interna, (2) a modificação das membranas celulares e a extração de lipídios da parede celular (3), a inativação de enzimas essenciais para o metabolismo celular, e (4) a extração de substâncias intracelulares (SPILIMBERGO e BERTUCCO, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922 foi obtido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Regional Integrada. O inóculo inicial foi preparado pela transferência da cultura estoque de *E. coli* em um tubo de ensaio com 10 mL com meio líquido Luria Bentami (LB) sob condições assépticas, sendo incubado a 37 °C por um período de 24 h. Na sequência, foi realizado um repique em um erlenmeyer com 100 mL de meio LB líquido esterilizado, acrescentando-se 2 mL do inóculo inicial de *E. coli*, e posteriormente, incubando o mesmo a 37 °C durante 24 h. As culturas utilizadas em todos os experimentos foram armazenadas a 4 °C, por um período máximo de 7 d, garantindo assim que as células bacterianas estivessem vivas. O número final de *E. coli*, em geral, variou em torno de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

3.2. DESCRIÇÃO DO APARATO EXPERIMENTAL

As medidas experimentais de inativação de microrganismos a altas pressões realizadas neste trabalho foram conduzidas em uma célula de volume variável com visualização, baseado no método estático sintético. A unidade experimental encontra-se a disponível no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI – Campus de Erechim. A Figura 3 apresenta o diagrama esquemático da unidade experimental que foi usado neste estudo, a qual consiste basicamente dos seguintes itens com suas respectivas funções:

C1) reservatório de solvente: armazenamento do solvente utilizado nos experimentos;

V1) válvula de esfera (Marca HOKE, Modelo 7155F2Y). Esta válvula quando aberta permite o fluxo do solvente do cilindro para bomba;

BR1) banho de recirculação (Marca QUIMIS, Modelo 214M2): é usado para manter a temperatura no cilindro da bomba constante;

BS) bomba de alta pressão (ISCO 500): para a verificação da inativação através desta técnica é necessário um equipamento que permita a quantificação da massa do fluido deslocada e que sirva para manipular a pressão do sistema. Bombas do tipo seringa encaixam-se perfeitamente neste contexto, pois possuem um cilindro interno onde pode ser computado o volume ou massa de fluido e, ao mesmo tempo, permite a pressurização e despressurização do sistema conforme este fluido é deslocado (a partir ou para dentro) deste reservatório, respectivamente. Neste trabalho foi utilizada uma bomba seringa (Marca ISCO, Modelo 500D) que possui um cilindro interno de 500 mL, pressão de trabalho de até 500 bar e fluxo de até 107 mL/min. O cilindro da bomba é encamisado, o que possibilita a manutenção da temperatura do reservatório em um valor pré-determinado com auxílio de um banho de recirculação;

CE) célula de equilíbrio de volume variável: consiste em um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL, possuindo um diâmetro interno de 17,2 mm e comprimento de 176 mm. No interior da célula existe um pistão que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com termopar (ST) e outra com a válvula de alimentação (V7); uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral (JS) e entrada frontal (janela frontal) e traseira (fechamento e conexão com a válvula V5);

JS) janela de safira e janela frontal: a célula possui duas janelas de safira (Swiis Jewel Company), sendo uma janela frontal (diâmetro = 25,4 mm e espessura = 9,52 mm) para visualização do interior da célula e outra lateral (JS) (d = 15,87 mm e espessura = 4,56 mm) para entrada de luz;

V2) válvula de via única (Marca HOKE, Modelo 6133F2Y): a função desta válvula é permitir o fluxo em apenas um sentido. É inserida entre o cilindro do solvente e a bomba após a válvula V1 com o intuito de evitar que pressões elevadas fossem aplicadas a cabeça do cilindro;

V3, V4 e V5) válvulas de esferas (Marca SWAGELOK, Modelo SS-H83PF2): a função das válvulas de esfera é interromper e permitir o fluxo em uma determinada linha. As válvulas empregadas na unidade são do tipo esfera, com pressão de trabalho de 690 bar à temperatura ambiente; Válvula V3: utilizada para isolar a unidade da bomba de alta pressão

durante a montagem e desmontagem da célula de equilíbrio. Válvula V4: utilizada para isolar a câmara do transdutor durante o processo de descarga do sistema. Sua função é impedir que qualquer quantidade de soluto entrasse na câmara do transdutor. Válvula V5: sua função é impedir a passagem de fluxo para o fundo da célula durante o processo de carga do solvente ao sistema e também para permitir a pressurização do fundo da célula através da passagem do líquido comprimido até o fundo do pistão;

V6) válvula de alívio (Marca SWAGELOK, Modelo SS-4R3A): é a válvula de segurança do sistema. Quando a pressão do sistema aumenta demasiadamente, esta válvula se abre automaticamente evitando riscos de operação. Estas válvulas de alívio possuem uma faixa de abertura que pode ser regulada (275-340 bar para este modelo). Após a redução da pressão do sistema, a válvula fecha mecanicamente;

V7) válvula de alimentação (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1): permite a alimentação do líquido comprimido à célula. A válvula em questão permite uma abertura gradual e, conseqüentemente, uma regulação do fluxo de solvente alimentado à célula;

V8) válvula de descarga (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1): usada para descarga do sistema e despressurização do fundo da célula;

BR2 e Linha Pontilhada) sistema de aquecimento da célula: o sistema de aquecimento da célula é composto por uma cuba de metal adaptada ao tamanho da célula de equilíbrio a qual possui roscas de fechamento alongadas para uma fixação dentro da cuba. O controle de temperatura é realizado por um banho termostático de recirculação (BR2) (Marca MARCONI, Modelo MA 184/6) onde há circulação de água de banho passando para a cuba e retornando ao banho. As roscas de fechamento da célula são alongadas para permitir que possa realizar a entrada de luz e a visualização da amostra através das janelas de safira;

IT) indicador de temperatura (Marca DIGMEC, Modelo FHMD): é um conjunto composto por um sensor de temperatura (termopar) tipo Y e um indicador de temperatura. Usado para medir o valor real da temperatura da solução no interior da célula. Este sensor é inserido na célula de modo que a junta fria fique no centro da célula;

TP) transdutor de pressão (Marca SMAR, Modelo LD 031): é conectado a linha proveniente da bomba para verificar a real pressão do sistema. Foi utilizado um transdutor de pressão absoluto com faixa de operação de 0–250 bar para medida da pressão do sistema. De acordo com especificação da fábrica, a precisão do equipamento é de 0,125% da faixa operacional (0,31 bar);

MP) monitor de pressão (Marca SMAR, Modelo HT2, Versão 5.08): os valores de pressão eram coletados em um indicador que recebe um sinal digital do TP indicando a pressão da linha. Ambos os equipamentos, transdutor e monitorador eram alimentados em corrente contínua entre 12 e 30 V. Para tal foi utilizada uma fonte de energia (FE);

FE) fonte de alimentação de energia: utilizada para manter a tensão e alimentar em corrente contínua o transdutor e o monitor de pressão;

AM) agitador (Marca Velp Scientifica): utilizado somente como suporte para melhor visualização do processo na janela da célula;

FL) fonte de luz: foi utilizado um feixe de luz branca na janela lateral da célula para iluminar o interior da célula e facilitar a visualização do processo;

ST) termopar.

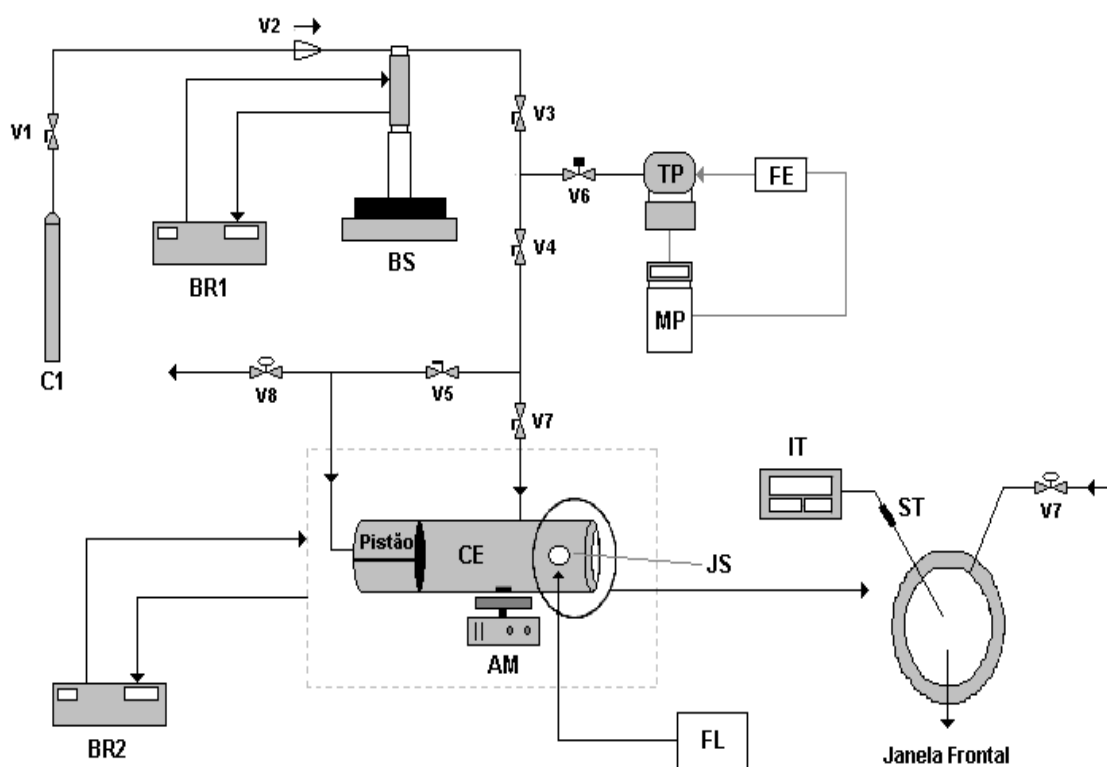
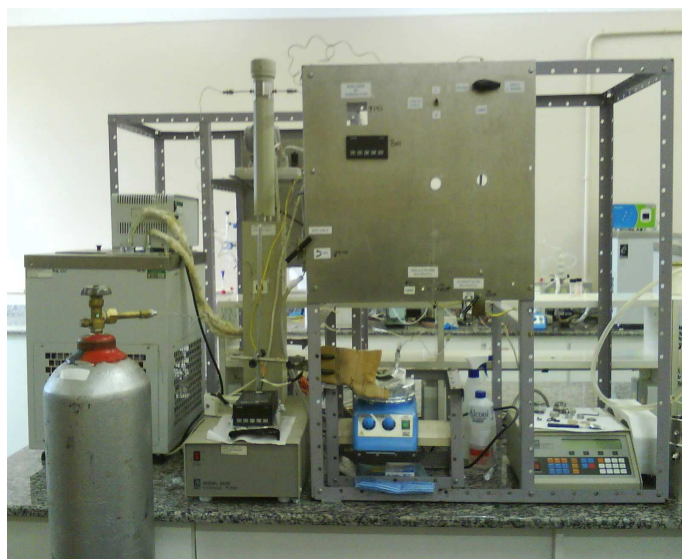


Figura 3 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

Uma vista geral da unidade pode ser observada na Figura 4.a e na Figura 4.b pode ser vista a célula de equilíbrio. Na Figura 5 apresenta-se a janela de safira onde é observada a

mudança de fases, com o detalhe da posição do termopar no interior da célula, onde é tomada a medida da temperatura.



(a)



(b)

Figura 4 - (a) Vista geral da unidade (b) Célula de equilíbrio de volume variável.



Figura 5 - Detalhe da janela de safira mostrando o posicionamento do termopar.

3.3. DETERMINAÇÃO DOS DADOS DE INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS A ALTAS PRESSÕES

O procedimento experimental adotado para inativação de microrganismos a altas pressões, utilizando o aparato experimental descrito no item 3.2, iniciou-se com o carregamento do cilindro da bomba com o solvente (dióxido de carbono) proveniente do cilindro de estocagem. A carga de solvente envolve algumas etapas, sendo a primeira a transferência do solvente do cilindro para a câmara interna da bomba. Deve-se ter uma quantidade de solvente relativamente grande dentro da câmara da bomba já que o próprio solvente era utilizado como fluido pressurizador. É importante notar que, quanto maior a quantidade de solvente transferida para dentro da câmara da bomba, menos vezes será necessário repetir o procedimento de carga na bomba.

Posteriormente, foi ajustada a temperatura do banho de recirculação (BR1), em torno de 5 °C, para manter a temperatura no cilindro da bomba constante e a pressão foi mantida em torno de 100 bar. As válvulas V3 e V4 foram então abertas e a pressão foi elevada através da bomba, pressurizando toda a linha. Enquanto o fluxo do solvente estabiliza, foi realizada a montagem da célula de equilíbrio. Para isto, foram obedecidos passos cuidadosos para a montagem e fechamento da mesma.

Primeiramente, a montagem do pistão foi realizada, sendo que o fechamento das extremidades do pistão foi efetuado de forma que o pistão possa deslizar pelo interior da célula e não permita a passagem de fluido do fundo para frente e vice-versa. Posteriormente, foram manipuladas as roscas de fechamento da célula. Na metodologia sintética estática empregada, utilizou-se amostra (5 g) retirada da solução estoque conforme item 3.1., com o auxílio de uma seringa estéril de 5 mL dentro de uma câmara de fluxo, e posteriormente injetada na válvula do termopar com a célula fechada.

Após essa etapa, as linhas que contêm as válvulas V5 e V7 foram conectadas na célula e preenchidas com o solvente a baixa pressão e depois evacuadas, para remover o ar remanescente.

A bomba de seringa possui um reservatório interno encamisado (cilindro da bomba) de forma que se pode conhecer o volume de solvente dentro do reservatório a uma determinada pressão e temperatura. A medida do volume deslocado, a fim de formar uma mistura de composição desejada, foi computada baseada no decréscimo do volume interno do cilindro da

bomba pela abertura da válvula V7. Para tal, é necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba.

A temperatura e pressão do solvente na bomba foram mantidas constantes durante a carga e a massa de solvente adicionada foi computada com base em sua densidade. Desta forma, a célula foi carregada com composição global conhecida. Uma vez que o sistema encontra-se estabilizado (fluxo da bomba estável em $\pm 0,01$ mL/min – em torno de 30 minutos), a válvula V7 será aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, até que o volume da câmara da bomba atinja o valor pré-estabelecido para fornecer a composição desejada dentro da célula de equilíbrio. Durante o processo de carga do solvente, nenhuma pressão será aplicada no fundo do pistão, para permitir que o experimento comece com a célula em seu volume máximo. Após a alimentação, a pressão do sistema foi então reduzida (definindo-se um valor baixo na bomba de 40 a 50 bar) e, com a válvula V7 fechada, a válvula de esfera V5 foi aberta para permitir que o solvente entre em contato com o fundo do pistão. O sistema de aquecimento foi então acionado.

O sistema de aquecimento empregado neste trabalho foi constituído de banho de recirculação (BR2) que através de uma bomba faz-se à circulação da água e se aquece a mesma até o valor pré-determinado no banho. A temperatura da solução no interior da célula será então captada pelo termopar (ST) dentro da célula e monitorada pelo indicador de temperatura (IT). Mantendo-se a temperatura constante, inicia-se a despressurização lenta do sistema através da diminuição gradativa da pressão pela bomba.

Durante todos os experimentos foi mantida uma relação constante entre massa de CO₂ e massa de meio líquido contendo as células de *E. coli*, onde foi empregado 7 g de CO₂ e 5 g de meio líquido. A temperatura foi mantida constante em 36 °C.

A pressão do sistema foi aumentada da pressão crítica do CO₂ até a pressão estabelecida no planejamento de experimentos a uma taxa de pressurização de 100 bar/min. Neste ponto o sistema foi mantido por um determinado período de tempo, sendo despressurizada até a pressão crítica do CO₂ de acordo com a taxa de despressurização definida no planejamento experimental. Este procedimento foi repetido *n* vezes, em função do número de ciclos estabelecidos. Após os experimentos, foi realizada a contagem microbiana e os resultados foram expressos em termos da redução logarítmica da contagem microbiana, conforme equação:

$$Redução = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad (1)$$

Onde N e N₀ são a contagem microbiana no tempo t e no início do tratamento, respectivamente. Os efeitos de pressão, taxa de despressurização e número de ciclos foram avaliados através da realização de dois delineamentos compostos centrais (DCC), cujos níveis são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes avaliados nos dois DCC

Níveis	-1	0	1
Primeiro DCC			
Pressão (bar)	80	180	280
Taxa de despressurização (bar/min)	10	60	110
Número de Ciclos	1	3	5
Segundo DCC			
Pressão (bar)	80	130	180
Taxa de despressurização (bar/min)	10	35	60
Número de Ciclos	2	3	4

3.4. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DO MICRORGANISMO *Escherichia coli*

Foram determinadas as reduções de contagens de células viáveis devido à morte por pressurização para o microrganismo alvo, *Escherichia coli*, às pressões de trabalho de 80, 100, 120, 140 e 160 bar, na temperatura fixada em 36 °C para todos experimentos, em diferentes intervalos de tempos, variando de 2,5 a 120 min. As contagens microbianas foram realizadas por plaqueamento em meio estéril LB sólido e o resultado expresso em UFC/mL, sendo realizadas depois do tratamento. Foram preparadas contagens de inóculos da ordem de 10⁸ UFC/mL e foram adicionados na diluição de 1% (v/v). As contagens foram realizadas em triplicata para confirmação das tendências do processo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da inativação de *Escherichia coli* usando CO₂ supercrítico

A primeira etapa do trabalho consistiu no levantamento das variáveis importantes que influenciaram o processo de inativação, sendo que as escolhidas foram: o número de ciclos de pressurização/despressurização, a taxa de depressurização e a pressão do sistema. Para avaliar o efeito destas variáveis sobre a contagem final de *Escherichia coli* foi realizado um primeiro delineamento composto central para três variáveis independentes com 3 pontos centrais (DCC), cujos resultados são apresentados na Tabela 2. Foi verificado que a contagem microbiana teve variações significativas entre os experimentos após o tratamento, sendo observados valores de redução logarítmica da contagem na ordem de 5 (Experimento 1) até 8 (Experimentos 2, 6, 8-11). É importante salientar que a redução de 8 ciclos logarítmicos corresponde a inativação completa, uma vez que a contagem inicial foi 1×10^8 UFC/mL. Além disso, a Tabela 2 apresenta o tempo total de tratamento de cada corrida que variou de 28 a 240 minutos.

Tabela 2 - Matriz contendo os resultados experimentais obtidos no primeiro DCC para a avaliação da inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico.

Exp.	Ciclos	R (bar/min)	Pressão (bar)	Log (N ₀ /N)	Tempo (min)
1	-1 (1)	-1 (10)	-1 (80)	5,0	28
2	1 (5)	-1 (10)	-1 (80)	8,0	140
3	-1 (1)	1 (110)	-1(80)	5,4	20
4	1 (5)	1 (110)	-1 (80)	6,1	120
5	-1 (1)	-1 (10)	1 (280)	5,0	50
6	1 (5)	-1 (10)	1 (280)	8,0	240
7	-1 (1)	1 (110)	1 (280)	7,0	30
8	1 (5)	1 (110)	1 (280)	8,0	120
9	0 (3)	0 (60)	0 (180)	8,0	75
10	0 (3)	0 (60)	0 (180)	8,0	75
11	0 (3)	0 (60)	0 (180)	8,0	75

R=Taxa de depressurização

Os resultados apresentados na Tabela 2 foram tratados estatisticamente ($p < 0,15$) com a finalidade de determinar o efeito das variáveis independentes sobre a resposta, sendo que os mesmos são apresentados na Figura 6, sob a forma de gráfico de Pareto. Entre as três variáveis independentes, o número de ciclos e a taxa de despressurização (R) foram as que apresentaram efeito significativo sobre a inativação microbiana. A pressão não exerceu influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada. O efeito significativo para curvatura indica a necessidade de avaliar a inativação em uma faixa mais ampla que a estudada neste primeiro DCC, sendo que esta avaliação pode ser realizada através da inserção de pontos axiais neste planejamento ou a realização de um novo.

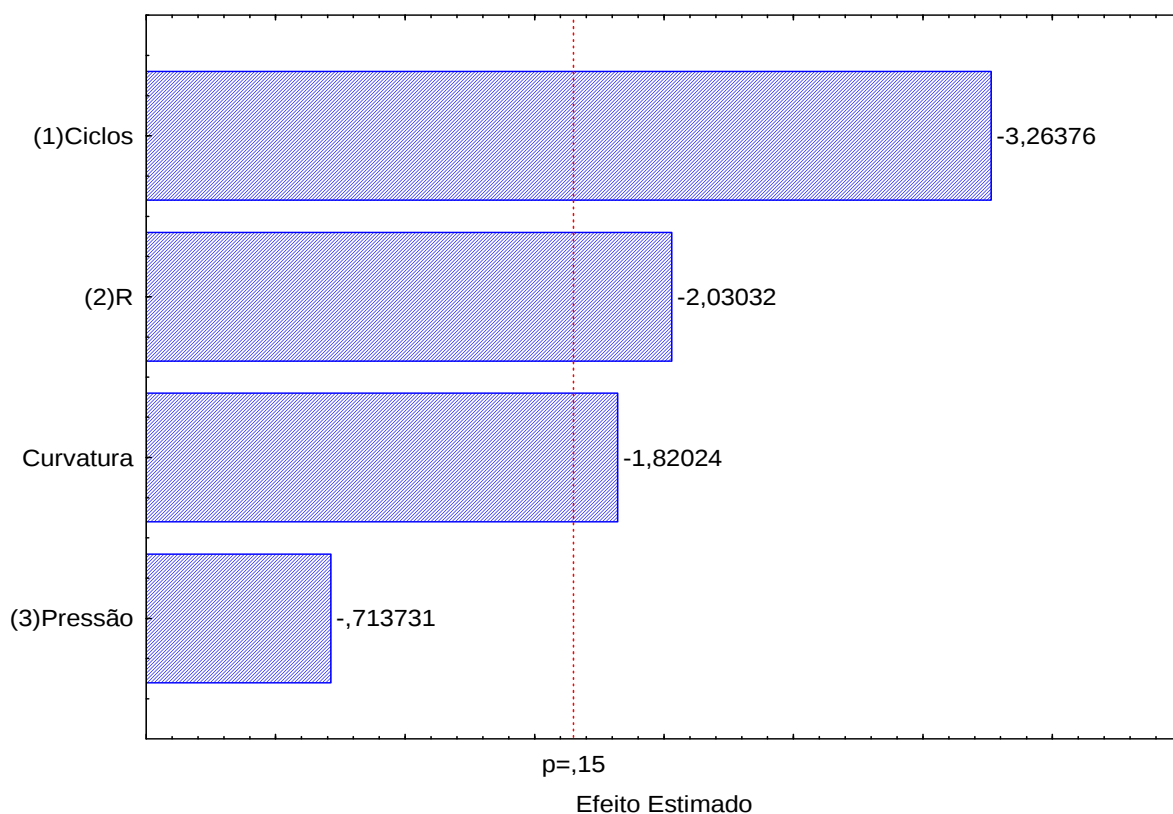


Figura 6 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do primeiro DCC na inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico.

A partir da análise dos efeitos, pode-se perceber que quanto maior a taxa de despressurização (R) mais eficiente é a inativação da *Escherichia coli*. Este resultado pode ser consequência de uma série de etapas: inicialmente ocorre a solubilização do CO₂ no interior da célula microbiana; com a despressurização ocorre a expansão do CO₂, que acaba rompendo as células e levando à inativação. Quanto maior a taxa de despressurização, maior a expansão do CO₂, levando a uma maior eficiência na inativação. Com relação ao número de ciclos, percebe-se que quanto maior o número, mais eficiente é a inativação. No entanto, esta variável traz consigo o efeito de outra que está subentendida, a qual é o tempo de processo. Como pode ser visto na Tabela 2, para tempos maiores que 120 min, verificou-se a inativação completa da *Escherichia coli*.

Baseado nos resultados obtidos no primeiro DCC foi realizado um segundo delineamento, onde as faixas das variáveis independentes foram alteradas. Como a pressão não apresentou influência estatística significativa, seus níveis foram reduzidos, uma vez que a nível industrial, menores pressões melhoram a viabilidade do processo. Quanto à taxa de despressurização, os níveis foram reduzidos, embora a análise dos efeitos indicaram que quanto maior, melhor a eficiência do processo de inativação. No entanto, para taxas de despressurização maiores que 120 bar/min, aumenta o risco operacional, uma vez que o pistão da célula de equilíbrio pode se chocar com a janela de safira da célula. Quanto ao número de ciclos, foi reduzido os níveis do delineamento, pois foi verificado que com 5 ciclos ocorre aquecimento do meio reacional, devido à compressão do CO₂. No primeiro DCC, o tempo final de processamento foi dependente da pressão, taxa de despressurização e número de ciclos. Neste segundo DCC, o tempo total de processamento foi fixado em 160 minutos, para poder avaliar com clareza o efeito de cada variável independente. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no segundo DCC.

Tabela 3 - Matriz contendo os resultados experimentais obtidos no segundo DCC para a avaliação da inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico fixando-se o tempo total de processo em 160 minutos.

Exp.	Ciclos	R (bar/min)	Pressão (bar)	Log (N ₀ /N)
1	-1 (2)	-1 (10)	-1 (80)	7,0
2	1 (4)	-1 (10)	-1 (80)	8,0
3	-1 (2)	1 (60)	-1 (80)	6,8
4	1 (4)	1 (60)	-1 (80)	8,0
5	-1 (2)	-1 (10)	1 (180)	7,2
6	1 (4)	-1 (10)	1 (180)	8,0
7	-1 (2)	1 (60)	1 (180)	7,3
8	1 (4)	1 (60)	1 (180)	8,0
9	0 (3)	0 (35)	0 (130)	7,2
10	0 (3)	0 (35)	0 (130)	7,0
11	0 (3)	0 (35)	0 (130)	7,3

Observou-se que mesmo nas condições mais amenas do planejamento foi obtida a eliminação quase total de microrganismos (Redução de 8 ciclos logarítmicos). Os resultados apresentados na Tabela 3 foram tratados estatisticamente ($p < 0,15$) com a finalidade de determinar o efeito das variáveis independentes sobre a resposta, sendo que os mesmos são apresentados na Figura 7, sob a forma de gráfico de Pareto. No segundo DCC, a pressão e o número de ciclos apresentaram efeito significativo sobre a inativação microbiana. A taxa de despressurização (R) e a curvatura não exerceram influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada.

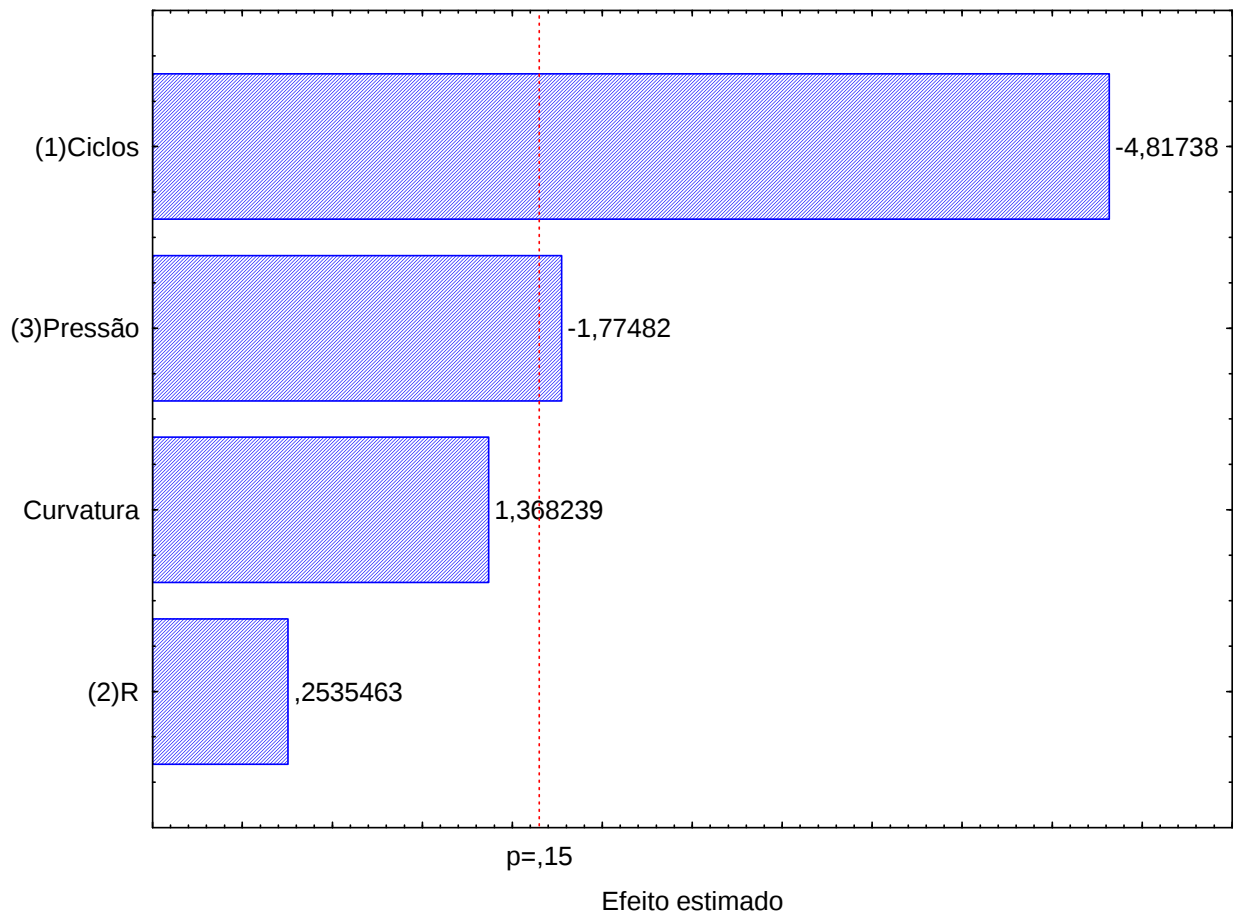


Figura 7 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do segundo DCC na inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico.

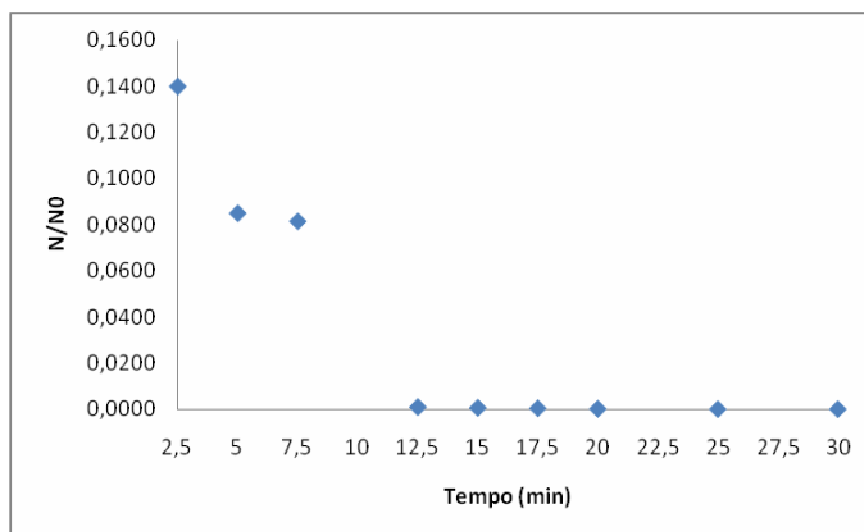
Neste segundo DCC o número de ciclos também apresentou influencia significativa na inativação da *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico, indicando que quanto maior o número de ciclos, melhor é a eficiência, corroborando com os resultados anteriores. Acredita-se que o efeito de compressão/descompressão estressa o microrganismo, levando à sua inativação. Quanto à pressão, verificou-se que, dentro da faixa avaliada, o seu incremento leva ao aumento da eficiência de inativação. A taxa de descompressão (R) não apresentou influência na faixa avaliada, contrariando os resultados obtidos anteriormente. Este resultado indica que a taxa de descompressão somente tem efeito letal sobre o microrganismo acima de 60 bar/min.

A partir dos resultados obtidos nos dois DCC realizados, verificou-se que a pressão do sistema e o número de ciclos apresentam efeito estatisticamente significativos na inativação

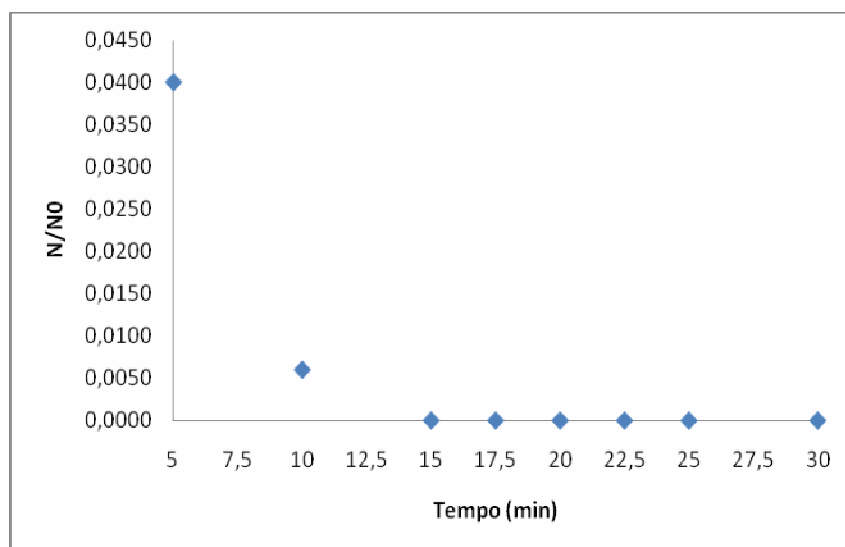
Escherichia coli com CO₂ supercrítico. Nesse sentido, faz-se necessário à avaliação cinética do efeito destas variáveis na inativação microbiana. No entanto, não há possibilidade da realização experimental da cinética para avaliar o efeito do numero de ciclos na inativação, pois os experimentos são destrutivos. Nesse sentido, a próxima etapa do trabalho estudará p efeito da pressão do sistema na cinética de inativação da *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico.

4.2. Avaliação cinética da inativação da *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico

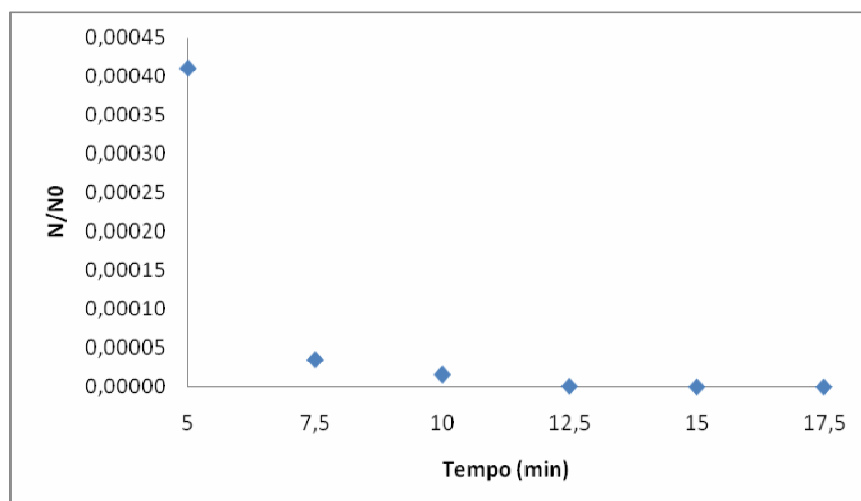
Para avaliar o efeito da pressão na inativação da *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico foram realizados experimentos nas pressões de 80, 100, 120, 140 e 160 bar, sendo observada a cinética de inativação. A Figura 8 (a – e) apresenta os perfis cinéticos obtidos em cada uma das pressões avaliadas. De uma maneira geral, ocorreu uma redução acentuada da contagem microbiana nos primeiros 2,5 min de processo, indicando que a bactéria é susceptível a inativação com CO₂ supercrítico. A partir das Figuras 8 (a-e), pode-se verificar que o aumento da pressão vai diminuindo o valor da contagem normalizada (N/N_0) em um mesmo tempo, indicando que a mesma apresenta influência na inativação.



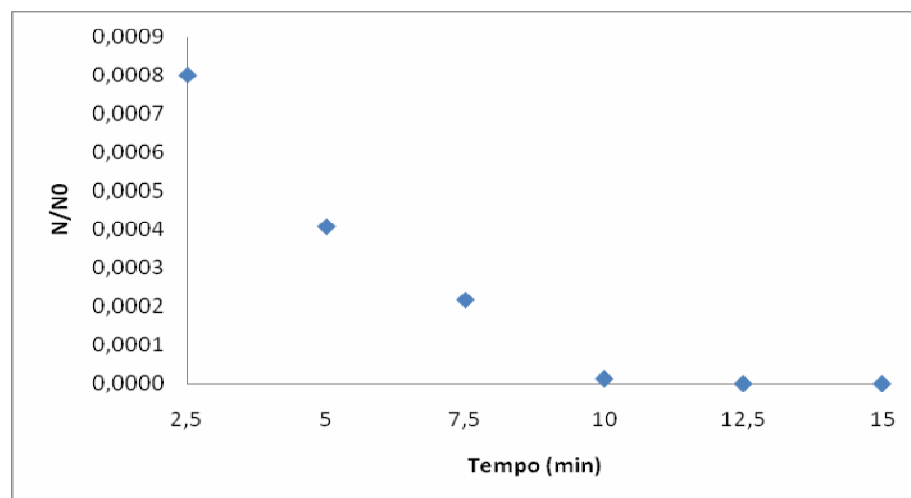
a)



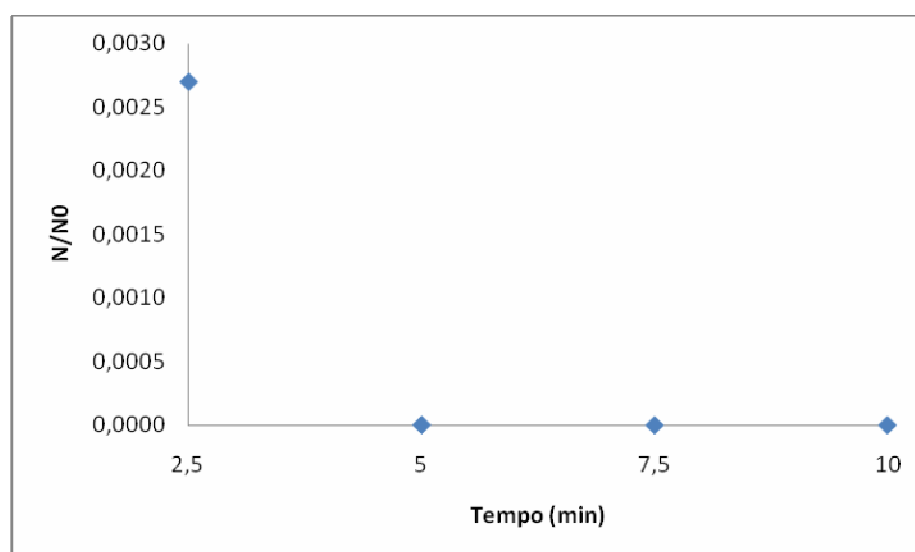
b)



c)



d)



e)

Figura 8 (a – e) - Avaliação cinética da inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico: a) 80 bar, b) 100 bar, c) 120 bar, d) 140 bar, e) 160 bar. A contagem normalizada no tempo zero (N/N₀) foi omitida das figuras para facilitar a visualização dos resultados.

Para avaliar o efeito da pressão sobre a inativação da *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico, foi considerada que a inativação segue uma cinética de primeira ordem. Assim, se N é o número de microrganismos, sua variação com o tempo é expressa por:

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad (2)$$

Integrando esta equação tem-se:

$$\frac{N}{N_0} = \exp(-k \cdot t) \quad (3)$$

onde N e N₀ são o número de microrganismos presentes nos tempos t e t=0, respectivamente, e k é a constante de inativação.

O valor da constante de inativação depende do tipo do microrganismo, meio, pressão e temperatura. Para um microrganismo específico, o valor depende do estado do microrganismo, se na forma vegetativa ou na forma de esporos. A constante de inativação k é determinada a partir da linearização da Eq. 3, conforme:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k \cdot t \quad (4)$$

Assim, traçando-se um gráfico de $\ln(N/N_0)$ versus o tempo, obtém-se uma reta, cujo coeficiente angular corresponde a constante de inativação.

A Figura 9 apresenta a determinação da constante de inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico considerando uma cinética de primeira ordem para as pressões de 80-160 bar. Como pode ser visto a partir dos resultados, a inativação da *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico segue uma cinética de primeira ordem, uma vez que há uma boa concordância entre os dados do modelo e os experimentais. O coeficiente de correlação, R^2 , foi superior a 0,9600 em todos os casos.

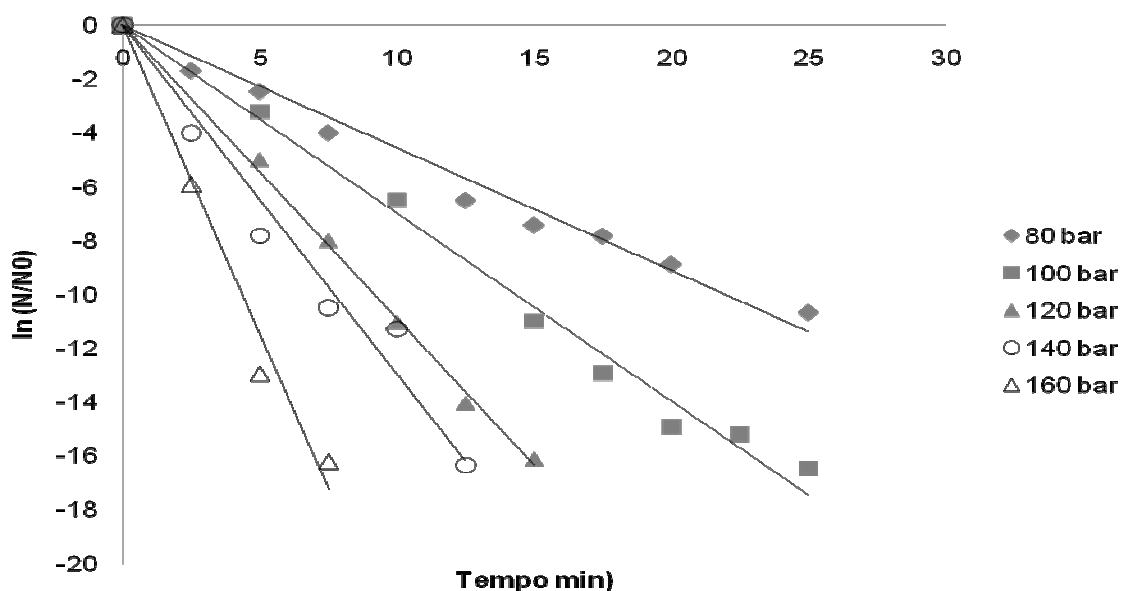


Figura 9 - Determinação da constante de inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico considerando uma cinética de primeira ordem para as pressões de 80, 100, 120, 140 e 160 bar.

Nos cálculos envolvendo o tratamento térmico e/ou tratamento com fluídos pressurizados de alimentos é empregado o conceito de tempo de redução decimal (D) que pode ser definido como o tempo requerido para reduzir 90% o número de microrganismos inicial. Assume-se que este valor é independente da contagem inicial de microrganismos, mas que é dependente da temperatura, tipo de microrganismo e meio de cultura ou alimento que o mesmo está crescendo. Arranjando a expressão 4, tem-se:

$$D = \frac{\ln\left(\frac{0,1 \cdot N_0}{N_0}\right)}{-k} = \frac{\ln(0,1)}{-k} \quad (5)$$

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos com relação à constante de inativação e ao tempo de redução decimal. Como pode ser visto, a constante de inativação aumenta com o aumento da pressão, indicando que pressões mais elevadas aceleram a taxa de inativação. Por outro lado, o tempo de redução decimal decresce com o aumento da pressão, conforme esperado. Os resultados mostram que é necessário um tempo de processamento relativamente curto para a redução de um ciclo na contagem microbiana. Por exemplo, a 160 bar é necessário um tratamento 1,03 min para reduzir um ciclo na contagem, enquanto que à 80 bar são necessários 5,35 min. A partir dos dados de redução decimal é possível fazer uma predição do tempo de processamento, tendo em vista a contagem inicial e o grau de esterilidade requerido. Karaman e Erkmen (2001) observaram que a inativação de *E. coli* segue uma cinética de primeira ordem. A constante de inativação e o tempo de redução decimal variaram de 0,0848 min⁻¹ para 0,4717 min⁻¹ e 4,90 min para 27,46 min, respectivamente. Os valores de D obtidos neste estudo foram inferiores aos verificados para *Salmonella typhimurium*, que também é uma bactéria gram negativa (Erkmen e Karaman, 2001). Erkmen (2001) verificaram que as bactérias gram positivas, como *Listeria monocytogenes* são mais resistentes ao tratamento sob pressão comparado com as gram negativas.

Tabela 4 - Efeito da pressão do sistema na constante de inativação e no tempo de redução decimal obtidos na inativação de *Escherichia coli* com CO₂ supercrítico.

Pressão (bar)	k (min ⁻¹)	D (min)
80	0,4301	5,3536
100	0,7077	3,2536
120	1,1041	2,0855
140	1,1909	1,9335
160	2,2287	1,0331

Analisando os valores da constante de inativação em função da pressão, observa-se um comportamento linear dentro da faixa estudada, conforme a Equação (6). O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9671.

$$k = 0,0219 \cdot P - 1,4396 \quad (6)$$

Na Equação 5, k é dado em min^{-1} e P é a pressão em bar. Esta equação é válida dentro da faixa de pressão estudada neste trabalho e sua aplicabilidade pode ser constatada na predição da constante de inativação e, conseqüentemente, na predição do tempo de redução decimal em pressões diferentes daquelas avaliadas neste trabalho.

Um outro parâmetro empregado com freqüência em inativação de microrganismos é o parâmetro z , o qual expressa a variação da taxa de morte celular com a pressão/temperatura, representando o aumento de pressão/temperatura requerido para o reduzir 90% do tempo de redução decimal. Uma relação entre o tempo de morte celular e a temperatura ou pressão é apresentada na Equação 7 onde o tempo de morte celular ou tempo de redução decimal são traçados em um gráfico em função da temperatura ou pressão. Pode-se observar o comportamento linear, onde z é dado por:

$$\log(D) = \frac{1}{z} \cdot (P - P_{\text{ref}}) + \log(D_{\text{ref}}) \quad (7)$$

onde P e P_{ref} são a pressão do sistema e a pressão de referência (bar), respectivamente, D e D_{ref} são o tempo de redução decimal nas pressões P e P_{ref} , respectivamente. Neste trabalho, adotou-se como P_{ref} a pressão de 120 bar, a qual corresponde ao valor médio entre a pressão mínima e máxima respectivamente. O valor D_{ref} foi retirado da Tabela 4 na pressão de 120 bar. Dessa forma, o parâmetro z foi determinado por linearização, conforme ilustrado na Figura 10. O valor de z obtido neste trabalho foi de 113,64, o que indica que para ocorrer a redução de 90% no tempo de redução decimal é preciso promover um acréscimo de 113,64 bar na pressão do sistema. Karaman e Erkmen (2001) verificaram que o valor z variou de 39,2 para 89,9 bar e temperatura variou de 25 a 40 °C. A 40 °C, o valor z obtido por Karaman e Ermen (2001) ($89,9 \pm 14,7$ bar) é próximo ao valor obtido neste estudo (113,64 bar).

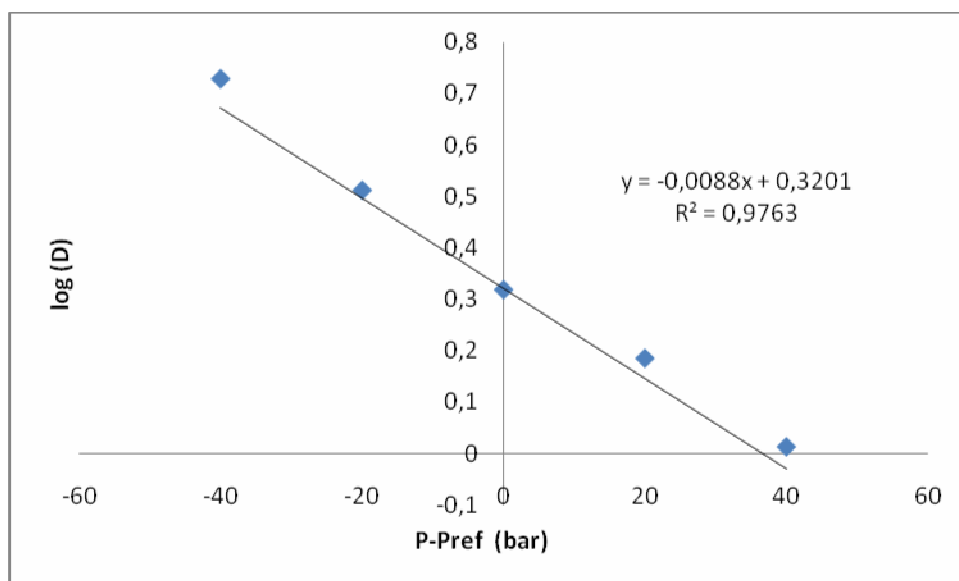


Figura 10 - Determinação da constante z para a inativação de *Escherichia coli* com CO_2 supercrítico.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a inativação de *E. coli* utilizando CO₂ supercrítico. A metodologia de planejamento experimental foi usada como ferramenta para determinar os efeitos de ciclos de pressão, taxa de despressurização e pressão sobre a inativação do microrganismo. O número de ciclos de pressão e a pressão mostraram uma influência significativa na inativação de *E. coli* com CO₂ supercrítico, indicando que o aumento do número de ciclos de pressão e a pressão do sistema melhoram a eficiência da inativação. A inativação microbiana seguiu cinética de primeira ordem de reação, onde as taxas aumentaram com o aumento da pressão de 80-160 bar. Os tempos de redução decimal (D) variaram de 1,03 a 5,35 min. A dependência da pressão da taxa de inativação específica de *E.coli* pode ser descrita pelo valor z, o qual foi encontrado como sendo 113,64. Os resultados apresentados são úteis visando a esterilização eficaz e não-térmica de alimentos em escala piloto/industrial.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, a seguir são apresentadas algumas sugestões de trabalhos que podem ser realizados:

- Estudo cinético da inativação de bactérias gram positivas e gram negativas utilizando o processo de alta pressão com CO₂ supercrítico;
- Estudo da inativação de microrganismos inoculados em produtos alimentícios, sólidos e líquidos;
- Avaliação das características sensoriais, físicas e químicas dos alimentos submetidos a altas pressões com dióxido de carbono supercrítico;
- Avaliação da qualidade de produtos alimentícios previamente submetidos à alta pressão com CO₂ supercrítico durante a estocagem;
- Avaliação da quantidade de CO₂ absorvido nos alimentos submetidos à alta pressão com CO₂ supercrítico;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.4248- 4251, 1999.

BAE, Y. Y.; LEE, H. J.; KIM, S. A.; RHEE, M. S. Inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**. v 136, p 95-100, 2009.

BALLESTRA, P.; DASILVA, A. A.; CUQ, J. L. Inactivation of Escherichia coli by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Science**, v 61 p 829, 1996.

CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.1, p.3-11, 1998.

CALVO, L. B.; MUGUERZA B.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v 42, p 80-87, 2007.

CALVO, L.; TORRES, E. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**. v 52, p 134–141, 2010.

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Microbiology**, v.6, n.2, p.351-357, 2003.

CHEFTEL, J.C. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology**, v.1, p.75-90, 1995.

CHEN, H. Temperature-assisted inactivation of Listeria monocytogenes in Turkey breast meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p 55-60, 2007.

CHOI, Y.M.; BAE, Y.Y.; KIM, K.H.; KIM, B.C.; RHEE, M. S. Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic Escherichia coli, Listeria monocytogenes,

Salmonella typhimurium, and E. coli O157:H7 in marinades and marinated pork. **Meat Science**, v. 82, p 419-424, 2009.

CHOI, Y. M.; RYU, Y. C.; LEE, S. H.; GO, G. W.; SHIN, H. G.; KIM, K. H.; RHEE, M. S.; KIM, B. C. Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine longissimus dorsi muscle. www.elsevier.com/locate/lwt. v. 41, p 317-322, 2008.

COELHO, G. L. V. Efeitos da Alta Pressão Hidrostática em Alimentos: Aspectos físico-químicos. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra, v. 21, p 105-110, 2002.

COOPER A. I. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. **Journal Materials Chemistry**, v. 10, p. 207 – 234, 2000.

COSTA, M. C. de; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Revisão: Tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n 2, p 187-210, 1999.

DAMAR, S.; BALABAN, M. O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. **Journal of Food Science**, v. 71, p 1–11, 2006.

DARR, J. A.; POLIAKOFF, M. New Directions in Inorganic and Metal-Organic Coordination Chemistry in Supercritical Fluids, **Chemical Review**, v. 99, p. 495 – 541, 1999.

DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. High pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. **Critical Review Microbiology**. v. 32, p.201-216, 2005a.

DIELS A.M.J.; DE TAEYE J.; MICHIELS C.W. Sensitisation of Escherichia coli to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation. **International Journal of Food Microbiology**. v.105, p. 165-175, 2005b.

DILLOW, A. K.; DEGHANI, F.; HRKACH, J. S.; FOSTER, N. R.; LANGER, R. Bacterial inactivation by using near and supercritical carbon dioxide. **Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.** 96 (1999) 10344.

DOULAH, M.S.; HAMMOND, T.H.; BROOKMAN, J.S.G. A hydrodynamic mechanism for the disintegration of *Saccharomyces cerevisiae* in an industrial homogeniser. **Biotechnology and Bioengineering**, v.17, p.845-858, 1975.

ERKMEN, O. Antimicrobial effects of pressurized carbon dioxide on *Brochothrix thermosphacta* in broth and foods. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 80, p 1365–1370, 2000.

ERKMEN, O. Kinetic analysis of *Listeria monocytogenes* inactivation by high pressure carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 47, p 7-10, 2001.

ERKMEN O.; KARAMAN, H. Kinetic studies on the high pressure carbon dioxide inactivation of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Engineering**, v. 50, p 25-28, 2001.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. Ed. São Paulo: E. Atheneu, 2001.

FABRONI, S.; AMENTA, M.; TIMPANARO, N.; RAPISARDA, P. Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p 477-484, 2010.

FERRENTINO, G.; BRUNO, M.; FERRARI, G.; POLETTO, M.; BALABAN M. O. Microbial inactivation and shelf life of apple juice treated with high pressure carbon dioxide. **Journal of Biological Engineering**, v 3:3, doi: 10.1186/1754-1611-3-3, 2009.

FERRENTINO, G.; BALABAN, M. O.; FERRARI, G.; POLETTO, M. Food treatment with high pressure carbon dioxide: *Saccharomyces cerevisiae* inactivation kinetics expressed as a function of CO₂ solubility. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 52, p 151-160. 2010.

FOSTER, J. W.; COWAN, R. M.; MAAG, T. A. Rupture of bacteria by explosive decompression. **J. Bacteriol**, v. 83, p 330, 1962.

FRANCO, B. D. G. de M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: E. Atheneu, 2005.

FRASER, D.; Bursting bacteria by release of gas pressure. **Nature**, v 167, p 33, 1951.

GARCIA-GONZALEZ, L.; GEERAERD, A. H.; SPILIMBERGO S.; ELST, K.; VAN GINNEKEN, L.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. F.; DEVLIEGHERE, F. High pressure

carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p 1-28, 2007.

GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T.; COSTA, S.; MONFORT, J. M.; HUGAS, M. Effect of high pressure processing on the microbiology of skinvacuum packaged sliced meat products: cooked pork ham, dry cured pork ham and marinated beef loin. Profit Final Project Report. FIT 060000200066. Disponível em: <<http://www.irta.es/cat/que/publicacions/informes/carnies.asp>>. Acesso em 2002.

GOULD, G.W. New processing Technologies: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 463-474, 2001.

GUNES. G.; L. BLUM, K.; HOTCHKISS, J. H. Inactivation of Escherichia coli (ATCC 4157) in diluted apple cider dense-phase carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v. 69, p 12-16. 2006.

HAYES, M.G.; KELLY, A.L. High pressure homogenization of milk effects on indigenous enzymatic activity **Journal of Dairy Research**, v.70, n.3, p. 307-313, 2003.

INNINGS,F.; TRÄGARDH, C. Analysis of the flow field in a high-pressure homogenizer. **Experimental thermal and Fluid Science**, v.32, p. 345-354, 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**, 6 Ed. Porto Alegre: E. Artmed, 2005.

KARAMAN, H.; ERKMEN O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of Escherichia coli in broth. **Food Microbiology**, v. 18, p 11-16, 2001.

KIM, S. R.; RHEE, M. S.; KIM, B. C.; KIM, K. H. Modeling the inactivation of Escherichia coli O157:H7 and generic Escherichia coli by supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p 52-61, 2007.

KINCAL, D; HILL, W. S.; BALABAN, M. O.; PORTIER, K. M.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. A continuous high – pressure carbon dioxide system for microbial reduction in Orange juice. **Journal Food Science**, v. 70, p M249-M254, 2005.

KLEINIG ,A. R.; MIDDELBERG, A. P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenization, **Chemical Engineering Science**, v.53, n.5, p.891-898, 1998.

LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; MESQUITA, V. L. V. Efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação de microrganismos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v 25, n 1, p 25-36, 2007.

LIAO, H.; ZHANG, L.; HU, X.; LIAO, X. Effect of high pressure CO₂ and mild heat processing on natural microorganisms in apple juice. **International Journal of Food Microbiology**. v 137, p 81–87, 2010.

MALICKI, A.; SYSAK, Z.; BRUZEWICZ, S. Pressurization effect on Salmonella sp within the fish meal. **Bulletin Veterinary Institute Pulawy**, v.49, p.215-217, 2005.

MATSER, A. M., KREBBERS, B., BERG, R. W. van der, BARTELS, P. V. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. **Trends in Food & Technology**, v 15, p 79-85, 2004.

MERMELSTEIN, N.H. (ed.) High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**, v. 53, n. 4, p. 86-90, 1999.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J., & HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p 107–112, 1997.

MILLS, G., EARNSHAW, R.; PATTERSON, M. F. Effects of high hydrostatic pressure on Clostridium sporogenes spores. **Letters Applied Microbiology**, v.26, p.227-230, 1998.

RITZ, M.; THOLOZA, J.L., FEDERIGHI, M., PILET, M.F. Morphological and physiological characterization of Listeria monocytogenes subjected to high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental microbiology**. v.67, n.5, p.2240-2247, 2001.

ROSENTHAL, A.; SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. Engenharia de Alimentos, v.14, p.37-39, 1997.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A.M.; IBARZ, A.; BARBOSA CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento térmico de alimentos. **Alimentaria**, n.283, p.33-43, 1997.

SAN MARTÍN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 6, p. 627-645, 2002.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2000.

SMELT, J.P.P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n.4, p.152-158, 1998.

SFILIMBERGO, S.; BERTUCCO, A. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO₂. **Biotechnology and Bioengineering**, v 84, p 627–638, 2003.

SFILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A. Microbial inactivation by high-pressure. **Journal of Supercritical Fluids**, v 22, p 55-63, 2002.

THIEBAUD, M.; REGNAULT, S.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. **International Dairy Journal**, v.14, p.55-68, 2004.

TORRES, J. A.; VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p 95-112, 2005.

TORREZAN, R. Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.21, n.2, p.249- 266, 2003.

YORDANOV, D. G.; ANGELOVA G.V. High Pressure Processing For Foods Preserving. **Biotechnol. & Biotechnol**, v 24, n 3 p 1940 - 1945, 2010.

ZHANG, J.; DAVIS, T.A.; MATTHEWS, M.A.; DREWS, M.J.; LABERGE, M.; AN, Y.H. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. v.38, p.354-372, 2006.