

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

**Douglas Soares**

**INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EMPREGANDO  
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

ERECHIM, RS – BRASIL

JANEIRO DE 2012

**DOUGLAS SOARES**

**INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EMPREGANDO  
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: José Vladimir de Oliveira  
Rogério Luis Cansian

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**JANEIRO DE 2012**

Douglas Soares

# **INATIVAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EMPREGANDO 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. José Vladimir de Oliveira, D. Sc  
Orientador

---

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc.  
Orientador

---

Prof. Lindomar Alberto Lerin, D. Sc

---

Prof. Clarissa Dalla Rosa, D. Sc

Erechim, 31 de janeiro de 2012.

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

Dedico esse trabalho aos meus pais Waldir José Soares e Marice Teresinha Beé Soares, por todo o apoio e incentivo que sempre recebi em todas as fases da minha formação pessoal e profissional, seu amor, carinho e cuidado foram fundamentais para que mais esse objetivo fosse alcançado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que nos guia em todos os momentos mesmo que de maneira silenciosa sempre nos encorajando a seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, que sempre deram todo o apoio necessário, incentivando-me a seguir em frente nos momentos de indecisão, de dificuldade, sempre mostrando que para tudo existe uma solução.

Ao meu orientador José Vladimir de Oliveira pela amizade, pelo apoio, pelo conhecimento compartilhado, por acreditar nesse projeto e vislumbrar futuro para o mesmo, pela contribuição para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador Rogério Luis Cansian agradeço também a confiança, a amizade, o empenho, a seriedade nos momentos necessários, pelas conversas e experiências compartilhadas no café, pelo conhecimento compartilhado, por abraçar e acreditar no projeto.

A Sibeles Comim pelos ensinamentos na unidade de trabalho.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Termodinâmica pela ajuda, apoio e bons momentos compartilhados.

Aos meus amigos e também colegas, Guilherme, Ceni, Debora, Angelise, Tassio, Emanuel, Helmut, Josamaique, Chaline, Pablo e todos os outros que fizeram parte dessa história.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização de mais essa etapa.

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 *Listeria monocytogenes* EMPREGANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Douglas Soares

Janeiro / 2012

Orientadores: José Vladimir de Oliveira

Rogério Luis Cansian

Métodos inovadores de estabilização microbiológica em alimentos como alternativas aos métodos tradicionais, que podem trazer perdas nutricionais e sensoriais aos alimentos, vem tornando-se objeto comum de estudo entre pesquisadores de todo o mundo. O uso de dióxido de carbono supercrítico surge como uma alternativa aos tradicionais técnicas térmicas, porque demonstra ser eficaz na redução do número de micro-organismos causando poucas alterações nas propriedades originais do produto. Este estudo avaliou a eficiência do dióxido de carbono supercrítico na inativação de *Listeria monocytogenes*. O delineamento experimental foi usado como ferramenta para determinar os efeitos da temperatura, taxa de despressurização, número de ciclos e relação entre massa de inóculo e massa de CO<sub>2</sub>. A taxa de despressurização e a razão entre a massa de inóculo de *L. monocytogenes* e massa de CO<sub>2</sub> mostraram-se significativos no processo de inativação de *Listeria monocytogenes* através da utilização de dióxido de carbono supercrítico. A cinética de inativação do micro-organismo foi de primeira ordem. A eficiência da inativação aumentou conforme o aumento da taxa de despressurização entre 60 e 120 bar.min<sup>-1</sup>, mantendo-se praticamente constante acima desse valor. Os tempos de redução decimal (D) variaram entre 12,6 e 17,85 minutos. O incremento de pressão necessário para ocasionar a redução de um ciclo logarítmico nos valores de D é descrito pelo valor Z e corresponde a 500 bar. Os resultados descritos nesse trabalho são úteis para viabilizar estudos de inativação de micro-organismos através da utilização de dióxido de carbono supercrítico em diversos alimentos.

Palavras-chave: micro-organismo; inativação; dióxido de carbono; *Listeria monocytogenes*.

**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 *Listeria monocytogenes* USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE**

Douglas Soares

January / 2012

Advisors: José Vladimir de Oliveira  
Rogério Luis Cansian

Recently, there has been a growing interest in innovative techniques towards microbiological stabilization of food compared to traditional methods in attempt to reduce nutritional and sensory losses. In this scenery, the use of supercritical or compressed carbon dioxide is pointed as a promising alternative to heat-based techniques due to its efficiency, preservation of food original characteristics and saving energy. In this context, this work evaluated the efficiency of *Listeria monocytogenes* inactivation through the use of supercritical carbon dioxide. For this purpose the experimental design methodology was successfully employed as a tool to assess the effects of temperature, depressurization rate, number of pressurization/depressurization cycles and the ratio of solute to CO<sub>2</sub> mass. It was observed that the depressurization rate and solute to CO<sub>2</sub> ratio were statistically significant. The microorganism inactivation kinetics was verified to be of first order. It was also observed that the inactivation efficiency increased with increasing depressurization rates in the range of 60 to 120 bar.min<sup>-1</sup>, keeping nearly constant above the upper value. The decimal reduction times (D) varied between 12.6 - 17.85 min. It was noticed that a system pressure of 500 bar was needed to cause one logarithm reduction in D, as described by Z parameter. Results obtained in this work may be quite useful to the industry committed to microorganism inactivation present in food using a new technology of supercritical carbon dioxide.

*Keywords:* microorganism; inactivation; carbon dioxide; *Listeria monocytogenes*.

# ÍNDICE

Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Métodos tradicionais de conservação de alimentos .....	4
2.2 Novos métodos para conservação de alimentos .....	5
2.2.1 Processamento a Alta Pressão .....	6
2.2.2 Processamento a Alta Pressão utilizando dióxido de carbono .....	9
2.2.3 Mecanismo de ação bactericida do dióxido de carbono .....	11
2.2.4 Inativação de micro-organismos utilizando dióxido de carbono pressurizado .....	14
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> e Listeriose .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1 Preparação do inóculo .....	18
3.2 Descrição do Aparato Experimental .....	18
3.3 Determinação dos dados de inativação de micro-organismos a altas pressões .....	22
3.4 Determinação da cinética de inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	<del>27</del> 27
4.2 Efeito da taxa de despressurização na inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	<del>31</del> 31
4.3 Cinética de inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> em função do tempo total do processo .....	<del>32</del> 32
5 CONCLUSÕES .....	<del>38</del> 38
5.1 Sugestões de trabalhos futuros .....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	<del>39</del> 40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Variação da densidade do CO <sub>2</sub> puro a 35°C. ....	10
Figura 2 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado. ....	19
Figura 3 – Estrutura geral da unidade de trabalho (A) e célula de equilíbrio de fases (B)...	22
Figura 4 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do primeiro DCC na inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	28
Figura 5 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do segundo DCC na inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	30
Figura 6 – Cinética de inativação de <i>L. monocytogenes</i> em função da taxa de despressurização. ....	32
Figura 7 – Cinética de inativação de <i>L. monocytogenes</i> em função do tempo de processo com taxa de despressurização de 120 bar.min <sup>-1</sup> .....	33
Figura 8 – Cinética de inativação de <i>L. monocytogenes</i> em função do tempo de processo com taxa de despressurização de 100 bar.min <sup>-1</sup> .....	34
Figura 9 – Cinética de inativação de <i>L. monocytogenes</i> em função do tempo de processo com taxa de despressurização de 160 bar.min <sup>-1</sup> .....	34
Figura 10 – Gráfico de Log de D para a obtenção do parametro Z. ....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes avaliados no primeiro DCC.....	24
Tabela 2 - Níveis das variáveis independentes avaliados no segundo DCC. ....	25
Tabela 3 - Matriz contendo os resultados experimentais obtidos no primeiro DCC para a avaliação da inativação de <i>L. monocytogenes</i> . ....	27
Tabela 4 - Matriz contendo os resultados experimentais obtidos no segundo DCC para a avaliação da inativação de <i>L. monocytogenes</i> . ....	30
Tabela 5 – Resultados da cinética de inativação de <i>L. monocytogenes</i> com variação da taxa de despressurização. ....	31
Tabela 6 – Valores de D e log de D para as cinéticas de inativação de <i>L. monocytogenes</i> em função da taxa de despressurização. ....	35

## 1 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, não produtor de esporos, anaeróbio-facultativo, oxidase negativo, catalase positivo, com motilidade a 25°C através de flagelos peritríquios (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998). É facilmente encontrado no ambiente podendo multiplicar-se em temperaturas entre 4 a 45°C.

Segundo Gerner-Smidt (2007) e Tham et al. (2000) os alimentos geralmente envolvidos em surtos de Listeriose são aqueles prontos para o consumo, conservados sob refrigeração e consumidos sem aquecimento ou cozimento como leite e seus derivados, carne e derivados, frutos do mar e vegetais diversos.

Em humanos saudáveis a listeriose apresenta-se sob forma de gastroenterite, mas em indivíduos pertencentes a certos grupos de risco pode causar aborto, nascimento prematuro, meningite e encefalite (OKWUMABUA et al., 2005; GERNER-SMIDT, 2007).

A Listeriose possui uma taxa de letalidade elevada quando comparada a outras doenças de origem alimentar. De acordo com Rossmanith et al. (2006), na Austrália no ano de 2004 houve uma incidência de 0,24 casos para cada 100 mil habitantes, com taxa de mortalidade de 21%. Estimativas apontam que nos Estados Unidos anualmente cerca de 2500 pessoas adquirem listeriose, das quais 500 vão a óbito (CDC, 2008).

Torna-se cada vez maior a busca por novas tecnologias a serem utilizadas no processo de conservação dos alimentos já que o consumidor vem tornando-se cada vez mais exigente, buscando alimentos com melhor qualidade nutricional e sensorial, maior vida de prateleira e inócuos microbiologicamente (SOUZA, 2006).

Entre as novas tecnologias utilizadas na preservação de alimentos está o processamento por altas pressões, que ao submeter o alimento a alta pressão busca inibir micro-organismos patogênicos e inativar enzimas, causando degradação mínima dos nutrientes, além de preservar moléculas responsáveis pelas características sensoriais do alimento com maior eficiência, conveniência e lucratividade associada à extensão da sua vida útil (NORTON & SUN, 2008).

Nessa tecnologia, o alimento ou cultura de micro-organismo podem ser expostos em bateladas ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pressurizado por um determinado período de tempo, o suficiente para promover a difusão do fluido no interior das células. Posteriormente ocorre o processo de despressurização e conseqüente expansão do CO<sub>2</sub> causando rompimento celular e destruição do micro-organismo.

O efeito bactericida do processo de Alta Pressão de Dióxido de Carbono (HPCD – High Pressure Carbon Dioxide) vem sendo estudado em diversas espécies de bactérias ou diretamente em algumas classes de alimentos. Silva (2011) estudou os efeitos de HPCD na inativação de *Escherichia coli*, enquanto os efeitos do processamento a alta pressão no processamento de salmão foram quantificados por Yagiz et al. (2009), que aplicando 150 MPa por 15 minutos obteve uma redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem de microorganismos inicial e aplicando 300 MPa pelo mesmo período obteve a inativação completa.

Conforme Choi et al. (2008), a utilização de dióxido de carbono supercrítico é muito promissora na indústria de alimentos já que ele é um gás inerte, atóxico, de baixo custo, não inflamável, de alta densidade e baixa viscosidade, além de ter grande disponibilidade em alto grau de pureza.

Huang et al. (1999) verificaram os efeitos do uso de alta pressão hidrostática sobre a inativação de *L. monocytogenes* em linguiças frescas de carne suína. As linguiças foram inoculadas com contagens de  $10^7$  UFC/g de *Listeria monocytogenes* e 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 minutos. Os melhores resultados foram obtidos à pressão de 414 MPa/50 °C por 2 minutos, que acarretou a completa inativação dos microrganismos presentes na linguiça e mudanças mínimas nas características do produto.

Já em carne suína marinada, com a aplicação de dióxido de carbono supercrítico, com pressão de 14MPa, a 45°C por 40 minutos houve uma redução de 2,49 UFC/cm<sup>2</sup> nas contagens de *L. monocytogenes* (CHOI et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da temperatura (33 – 41°C), taxa de depressurização (10 – 100 bar.mim<sup>-1</sup>), número de ciclos (1 – 7 ciclos) e razão entre massa de *L. monocytogenes* e massa de CO<sub>2</sub> (1:0,1 – 1:1,5) na inativação de *Listeria monocytogenes* através da ação de dióxido de carbono supercrítico. Primeiramente foi aplicada a metodologia de planejamento experimental para avaliar o efeito das variáveis independentes no processo de inativação, e em seguida foi investigado a influencia do tempo e pressão sobre a cinética de inativação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tendo em vista que o constante aumento populacional mundial ocorre de maneira mais acelerada que a capacidade de expansão da produção e disponibilização de alimentos para a população, pode-se perceber que tanto a produção quanto a preservação dos alimentos são de extrema importância.

Atualmente, cerca de 1 bilhão de pessoas sofre de desnutrição crônica, ou seja, alimentam-se com menos alimentos do que a quantidade necessária para manter os níveis mínimos de energia (FAO, 2011).

Ainda segundo a FAO (2011), a mortalidade por falta de energia proteica, principalmente infantil, atinge anualmente 13 milhões de indivíduos com idade entre zero e cinco anos de idade.

Dados como os mostrados acima apontam a necessidade de não somente produzir os alimentos como de preservá-los e/ou conservá-los, para garantir que além de chegarem ao consumidor, cheguem de forma sadia, mantendo suas características nutricionais, isentos de contaminação por micro-organismos patogênicos e deteriorantes, além de apresentar características sensoriais desejáveis.

Segundo Silva (2000), o principal fundamento da conservação de alimentos é prevenir as alterações físicas, químicas ou biológicas nos mesmos. Dessa forma, é de extrema importância que a matéria prima alimentícia a ser submetida aos processos de conservação tenha um número inicial de micro-organismos o mais baixo possível. Cabe ressaltar que a maioria dos tecidos animais e vegetais são naturalmente livres de contaminação microbiana, ou quando essa existe é insuficiente para causar algum dano ao alimento.

Assim, a conservação de alimentos consiste em empregar técnicas capazes de protegê-los contra a ação de agentes deteriorantes, principalmente os micro-organismos, assegurando-lhes características similares às daquelas 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). Os métodos de conservação de alimentos podem ser classificados em tradicionais e novos, conforme descrito brevemente a seguir.

## 2.1 Métodos tradicionais de conservação de alimentos

Segundo Silva (2000), os métodos tradicionais de conservação de alimentos consistem na utilização de calor, refrigeração/congelamento, defumação, conservantes químicos e irradiação. A conservação de alimentos pelo calor significa aplicação de métodos e de técnicas resultantes de processos controlados industrialmente como pasteurização, tindalização, branqueamento e esterilização.

Conforme Freitas e Figueiredo (2000), o calor destrói os micro-organismos através da desnaturação das suas proteínas e inativação das enzimas que lhes possibilitam atividade metabólica. A intensidade do tratamento térmico depende dos micro-organismos a eliminar, do seu estado fisiológico e das condições do meio.

A aplicação de temperaturas baixas aos alimentos tem por objetivo a diminuição da velocidade das reações químicas e da atividade enzimática e ainda a inibição da multiplicação e da atividade dos micro-organismos. Quanto menor for a temperatura utilizada, menor serão as velocidades das reações químicas, a atividade enzimática e o desenvolvimento de micro-organismos (FREITAS e FIGUEIREDO, 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.

Outra técnica muito utilizada na conservação de alimentos é o processo de defumação, que baseia-se na exposição do alimento à fumaça proveniente da queima incompleta de madeira, serragem ou carvão. Este processo é utilizado, principalmente, para carnes bovinas, pescado e embutidos. Além do efeito dos compostos químicos formados durante o processo, a exposição do alimento a altas temperaturas tem papel coadjuvante, uma vez que age como tratamento pelo calor e como desidratante, diminuindo, portanto, o teor de água presente nos alimentos. Durante o processo ocorre também a formação de uma “casca” externa que atua como um “isolante” que dificulta a entrada de novos contaminantes (EVANGELISTA, 2001). Pode-se considerar também como um método tradicional de conservação de alimentos o uso de aditivos ou conservantes químicos.

Segundo Freitas e Figueiredo (2000), dá-se o nome de conservantes químicos as substâncias que são adicionadas ao alimento com o propósito de evitar contaminações e alterações nesses produtos. Tais conservantes têm por objetivo eliminar ou reduzir a atividade microbiana e enzimática, e ainda impedir que ocorram as reações químicas causadoras de alterações consideradas prejudiciais.

Outro método utilizado com o propósito de conservar alimentos é a irradiação. Segundo Evangelista (2000), a irradiação consiste em um processo em que o alimento já embalado ou a granel é submetido a uma quantidade controlada de radiação visando a inibição de brotamentos; retardo na maturação; redução da carga microbiana; eliminação de micro-organismos patogênicos; esterilização; desinfecção de grãos, cereais, frutas e especiarias. As radiações ionizantes usadas são os raios gama, obtidos por meio de fontes radioativas como o Cobalto 60 e o Césio 137.

## **2.2 Novos métodos para conservação de alimentos**

Conforme Marino et al. (2001), a conservação dos alimentos vem tornando-se cada vez mais complexa. Tal fato pode ser explicado tanto pelo surgimento de novos produtos no mercado, ou pela exigência cada vez maior de alimentos com maior vida de prateleira. Outro ponto que deve ser observado é o desejo cada vez maior do consumidor por alimentos naturais ou com características de naturais, que apresentem baixos níveis de aditivos químicos, com baixo impacto ao meio ambiente (DEVLIEGHERE et al., 2004).

Essa tendência é reforçada por Costa et al. (1999) que afirma 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.

Entre essas novas tecnologias, ou tecnologias emergentes envolvidas na conservação de alimentos Rosenthal e Silva (1997) destacam o tratamento ôhmico, o processamento por campos eletromagnéticos, a tecnologia de ultrassom, a esterilização por membranas e a tecnologia de alta pressão.

O aquecimento ôhmico é um processo que consiste na passagem de uma corrente elétrica alternada através de um alimento com a finalidade de aquecimento através da geração interna de energia. Em função da resistência inerente, o alimento transforma energia elétrica em energia térmica, promovendo assim, um aumento de temperatura em seu interior sem

haver a necessidade de transferência de calor através das interfaces sólido líquido ou no interior de partículas sólidas (SASTRY, 2008).

Alguns estudos já observam os efeitos dos campos eletromagnéticos sobre a matéria biológica, tais efeitos refletem na atividade enzimática, integridade do DNA, no metabolismo celular e principalmente no desenvolvimento de micro-organismos (NUNES et al., 2008). Segundo Pothakamury et al. (1993) os campos eletromagnéticos tem potencial para pasteurizar alimentos com melhor eficiência do que as formas tradicionais.

Segundo Knorr (2004), o ultrassom tem atraído considerável interesse na ciência e tecnologia de alimentos, devido aos efeitos promissores no processamento e preservação dos alimentos.

O ultrassom consiste em uma onda sonora que é produzida a partir de um elemento vibrador como um cristal ou uma haste. Seu efeito em células e macromoléculas em suspensão aquosa está ligado a alterações estruturais e funcionais, através de um fenômeno chamado cavitação, que consiste na formação de bolhas que colapsam violentamente desintegrando as células dos micro-organismos (McCLEMENTS, 1995).

A esterilização por membrana está ligada principalmente ao processo de microfiltração que surge como alternativa aos tratamentos térmicos convencionais fazendo a retenção de células com grande economia de energia (HABERT et al., 2006).

Conforme Norton e Sun (2008), o processamento a alta pressão é uma tecnologia que atende aos mais recentes desafios que a indústria de alimentos enfrenta, uma vez que oferece a possibilidade de conservar os alimentos mantendo as suas qualidades, aumentando também a lucratividade em decorrência do aumento da vida útil desse alimento.

A alta pressão produz diversos efeitos sobre os alimentos como inativação de micro-organismos, modificação de biopolímeros, ativação e inativação de enzimas, desnaturação proteica e formação de gel (INDRAWATI; HENDRICKX, 2002).

### 2.2.1 Processamento a Alta Pressão

Datam do ano de 1899 os primeiros registros do uso de alta pressão como método de preservação de alimentos. Estudos realizados na Universidade da Virgínia do Oeste, Estados Unidos da América, testaram o uso da pressão hidrostática para a preservação de sucos de fruta, carnes e leite (HENDRIKX; KNORR, 2002).

Ainda segundo Hendrikx e Knorr (2002), o pesquisador chamado Bert Hite demonstrou que os micro-organismos poderiam ser destruídos no leite caso o alimento fosse submetido a uma pressão de 650 MPa. Em 1914, Bridgman mostrou que ocorria a coagulação da albumina do ovo pela aplicação de pressão, e que o gel formado possuía características diferentes dos géis obtidos em processos que utilizavam o calor.

Embora o início das pesquisas envolvendo o uso de altas pressões na preservação de alimentos tenha ocorrido a mais de um século, as pesquisas em tecnologia de alta pressão aplicadas a alimentos se restringiram a iniciativas isoladas até o final dos anos 1980. No início dos anos 90, com a implementação de um Programa em 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; SILVA, 1997).

Processos na indústria de alimentos que utilizam a alta pressão hidrostática já são utilizados há algum tempo em alguns países. No Japão, o primeiro produto processado por alta pressão foi lançado no mercado pela Meidy-ya e tratava-se de uma geléia. Após esse primeiro lançamento vieram molhos, sucos de frutas, bolos de arroz e frutos do mar *in natura* (ELIZONDO, 1995).

Nos anos seguintes, países europeus lançaram produtos como sucos, presuntos, embutidos e guacamole, todos processados em alta pressão. Em 2007 já existiam 110 plantas fabris espalhadas pelo mundo utilizando essa tecnologia (MATHYS, 2008).

A tecnologia de alta pressão é vista como 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; ANGELOVA, 2010).

Uma das principais vantagens da utilização da alta pressão para o processamento de alimentos é que não ocorre o rompimento das ligações químicas covalentes, as quais apresentam pequena compressibilidade, devido à mínima distância entre os átomos envolvidos na ligação. Isso influencia diretamente na preservação das características dos

alimentos, pois preserva compostos responsáveis pelo aroma, sabor e valor nutritivo, conservando a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (CHEFTEL, 1995).

Submeter um alimento ao processo de alta pressão hidrostática consiste em submeter esse alimento a alta pressão dentro de um recipiente pressurizado através de um meio que transfira pressão ao produto (CAMPOS et al., 2003). Nesse tipo de processo, utiliza-se a água 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).

Conforme citado por Ardia et al. (2004) a aplicação de altas pressões resulta no aumento da temperatura do alimento, cerca de 3°C a cada 100 MPa. Porém, se o alimento contiver elevada quantidade de gordura o aumento de temperatura poderá chegar a 9°C para cada 100 MPa empregado.

Para realização do processamento hidrostático, o produto precisa ser embalado em uma garrafa ou bolsa plástica antes de ser colocado no vaso de pressão para ser processado. Produtos líquidos podem ser processados através de processo semicontínuo (MERMELSTEIN, 1999).

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 desativação dos micro-organismos, assim como de enzimas. 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).

Lavinas et al. (2007) citam que a capacidade de destruição ou inativação de micro-organismos 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 do micro-organismo utilizado, além da composição do meio ou do alimento.

O processamento de alimentos a alta pressão pode também ser através do método de Alta Pressão Dinâmica (HUAP). Torrezan (2003) relata que este processo é realizado para alimentos fluidos com equipamentos dotados de pistões onde ocorre o bombeamento, pressurização e homogeneização.

O mecanismo de inativação de micro-organismos no processo de HUAP não é plenamente elucidado, mas seu efeito sobre as células é de rompimento (DIELS et al., 2005). Nesse processo, atribui-se a morte celular ao atrito, cisalhamento, fricção e cavitação. Isso

ocorre no momento em que o fluido passa pela válvula de homogeneização (KLEINIG; MIDDELBERG, 1998), em função do espaço restrito para a passagem do fluido ou pelas altas velocidades atingidas ou ainda 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; 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).

Um sistema de processamento a alta pressão de uso industrial pode custar entre 500 mil e 2,5 milhões de dólares dependendo do tamanho e automação do modelo. Já os produtos produzidos com essa tecnologia podem custar entre 6 a 12 centavos de dólar a mais por quilograma produzido em relação a processos térmicos convencionais (BALASUBRAMANIAN; FARKAS, 2008).

### 2.2.2 Processamento a Alta Pressão Utilizando Dióxido de Carbono

Cada vez mais o uso do dióxido de carbono a alta pressão (HPCD) é tido como uma tecnologia muito promissora na indústria de alimentos, principalmente em processos que envolvem a inativação de micro-organismos (GARCIA-GONZALES et al., 2007).

O dióxido de carbono possui diversas condições favoráveis ao seu uso na indústria de alimentos. Conforme Zhang et al. (2006) o dióxido de carbono é um gás não inflamável, não tóxico, inerte, com temperatura crítica de 31,1°C. No estado supercrítico tem baixa viscosidade e tensão superficial zero, além de ter baixo custo quando comparado com outros gases.

O processamento com HPCD envolve o contato dos alimentos com um fluido supercrítico (ou pressurizado), durante um determinado tempo, podendo ser de forma contínua ou semi-contínua (ZHANG et al., 2006). Este processo inativa efetivamente os micro-organismos vegetativos e, devido ao uso de baixas temperaturas, mantém as características originais do produto.

Um fluido é chamado de fluido supercrítico quando as condições de temperatura e pressão se encontram acima da temperatura crítica e da pressão crítica do referido fluido,

ponto no qual o vapor e o líquido possuem a mesma densidade e acima das condições denominadas críticas o fluido não pode ser liquefeito através do simples aumento da pressão (McNALLY, 1996).

Segundo Darr e Poliakoff (1999), fluidos supercríticos podem ser relativamente densos e dissolver certos sólidos, exibindo alta difusividade e baixa viscosidade. Além disso, nas vizinhanças do ponto crítico, tais fluidos são altamente compressíveis e a densidade pode ser alterada sobre uma vasta faixa de pressão e temperatura, conforme pode ser observado na Figura 1. Esta capacidade pode ser útil na separação de produtos reacionais ou no fracionamento de polímeros.

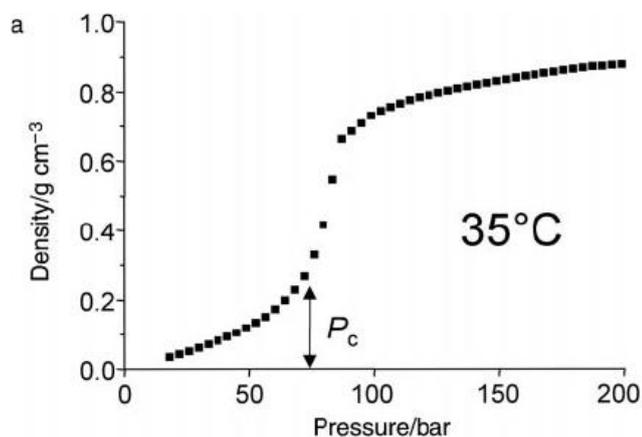


Figura 1 – Variação da densidade do CO<sub>2</sub> puro a 35°C.

As propriedades dos fluidos supercríticos mais importantes são a densidade, a viscosidade e o coeficiente de difusão. Propriedades relacionadas à capacidade de solubilização como a densidade aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto que propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade apresentam valores típicos de um gás. Estas propriedades, particularmente a densidade, podem ser alteradas com pequenas variações de pressão e/ou temperatura. Na zona próxima do ponto crítico é onde se produzem, com pequenas alterações de pressão, as maiores variações da densidade do fluido supercrítico (CARDOSO, 2002).

Dentre os fluidos que podem ser usados como fluidos supercríticos, o dióxido de carbono apresenta algumas vantagens, conforme citado por Choi et al. (2008):

- Não cria problemas ambientais;

- Não é tóxico nas quantidades utilizadas;
- Não é inflamável;
- É comercializado em larga escala;
- Mesmo em altos graus de pureza é barato quando comparado a outros gases;
- É considerado inerte do ponto de vista químico;
- Pode ser utilizado em temperaturas inferiores a 50°C.

O mecanismo de inativação de bactérias por HPCD não está, no entanto, totalmente elucidado, embora várias teorias tenham sido apresentadas nos últimos anos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007; ZHANG et al., 2006).

### 2.2.3 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 do dióxido de carbono.

Segundo Garcia-Gonzalez et al. (2007) e citado por Silva (2011), existem diferentes etapas no mecanismo de inativação e estas podem ser resumidas da seguinte forma:

- Solubilização do dióxido de carbono pressurizado na fase externa líquida. Em alimentos ou caldos com alto teor de água, o dióxido de carbono pode se dissolver na água para formar o ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), o qual se dissocia em bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) 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.

- 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  $\text{CO}_2$  e a membrana plasmática foi confirmada por Spilimbergo et al. (2002), que calculou que o dióxido de carbono pode ser dissolvido nos fosfolipídios da membrana celular em um grau muito elevado. Este montante de  $\text{CO}_2$  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.
- 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  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  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).
- Inativação de enzimas/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.
- Efeito inibitório direto do  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  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 ânion.
- 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  $\text{HCO}_3$  para  $\text{CO}_3$ , o que poderia precipitar eletrólitos inorgânicos intracelulares a partir de células e membranas celulares.

- 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  $\text{CO}_2$  acumulado pode ser devido ao seu poder de solvência relativamente alto e "extrair" constituintes vitais das células ou das membranas celulares. Neste mecanismo, sob pressão, o  $\text{CO}_2$  primeiro penetra nas células para construir a densidade de um nível crítico no interior das células, depois, remove componentes intracelulares (como fosfolipídios e compostos hidrofóbicos) para perturbar ou alterar a estrutura das membranas e/ou o equilíbrio do sistema biológico, promovendo assim a inativação.

Corroborando com estes mecanismos propostos, diferentes autores têm sugerido mecanismos de inativação microbiana semelhantes. Para 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 et al., 1997).

Segundo Spilimbergo e Bertucco (2003), os efeitos inibitórios do dióxido de carbono supercrítico em bactérias patogênicas de origem alimentar são causados pela indução dos seguintes fenômenos: (1) a ruptura celular explosivo 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.

De acordo com Patterson (2005) a membrana celular é a parte do micro-organismo que mais sofre ação da alta pressão. Ela provoca mudanças na organização molecular do complexo lipídeo-peptídeo rompendo a estrutura da membrana de dupla camada de ácidos fosfatídicos. Quando ocorre a reorganização da membrana, ocorrem alterações nas funções das proteínas que controlam a permeabilidade de íons, o que faz com que a membrana perca a sua funcionalidade (PATTERSON, 2005)

#### 2.2.4 Inativação de Micro-organismos Utilizando Dióxido de Carbono Pressurizado

A maioria das pesquisas com dióxido de carbono a alta pressão tem sido realizadas usando suspensões de culturas de diferentes micro-organismos e, quando aplicado em alimentos, o método é preferencialmente aplicado a produtos líquidos (DAMAR; BALABAN, 2006; GARCÍA-GONZALEZ et al, 2007). No entanto, são poucas as pesquisas realizadas com alimentos sólidos.

Estudos realizados por Damar e Balabam (2006) em suspensões de culturas puras, de diferentes micro-organismos, demonstraram que a inativação microbiana alcançada pela HPCD variou de 2 a 12 logs com pressões abaixo de 50 MPa e temperaturas entre 5 a 60°C.

Já Silva (2011), descreve a eficiência do uso de HPCD na inativação de *Escherichia coli* em pressões que variaram de 80 a 160 bar em meio de cultura e indica a inativação total deste micro-organismo sob diversas condições.

Em trabalho feito por Kincal et al. (2005) suco de laranja foi processado com dióxido de carbono pressurizado e mostrou uma redução de 5 log na carga microbiana, mantendo a qualidade química e sensorial do produto tratado. Os autores observaram poucas alterações em relação a °Brix, pH e cor, enquanto a acidez aumentou ligeiramente para as amostras tratadas com alta pressão em comparação com as amostras não tratadas.

Choi et al. (2009), avaliaram os efeitos do tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico em molho de soja e pasta de pimenta marinada, bem como em produtos de carne de porco marinados, visando a inibição de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7. Tratamentos com CO<sub>2</sub> supercrítico a 14 MPa e 45 °C por 40 min. resultaram em uma redução da carga microbiana no molho de soja de (2,52 – 3,47 log UFC/cm<sup>2</sup>), na pasta de pimenta marinada (2,12 – 2,72 log UFC/cm<sup>2</sup>). Na carne suína marinada, quando o dióxido de carbono supercrítico foi aplicado em pressão de 14 MPa e 45 °C por 40 min., a redução dos níveis de *Listeria monocytogenes* foi de 2,49 e 1,92 log UFC/cm<sup>2</sup>.

Já em seus estudos, Fabroni et al. (2010) demonstraram que o tratamento de suco de laranja com HPCD em pressões de operação (130 bar) e determinada quantidade de CO<sub>2</sub> (0,385 gCO<sub>2</sub>/g suco), levam a boa inativação microbiana, prolongando a vida de prateleira do suco do laranja.

Erkmen e Karaman (2001) avaliaram a cinética de inativação de *Salmonella typhimurium* através da utilização de dióxido de carbono pressurizado na faixa entre 1,51 a

7,56 MPa a 35°C. As taxas de inativação aumentaram conforme ocorreu o aumento da 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  $\text{min}^{-1}$  e de 23,63 para 1,48 min., respectivamente.

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

### **2.3 *Listeria monocytogenes* e Listeriose**

Há muitos anos que a *Listeria monocytogenes* é uma bactéria conhecida dos pesquisadores e suas características de patogênicas vêm atraindo diversos estudos desde que Murray e seus colegas relataram, em 1924, o primeiro isolamento de um micro-organismo responsável por uma leucocitose mononuclear típica em coelhos, denominando-o de *Bacterium monocytogenes* (MURRAY et al., 1926).

Conforme Breed et al. (1948), em 1930 Pirie isolou um micro-organismo semelhante em roedores e o nomeou de *Listerella hepatolytica* em homenagem ao cirurgião britânico Sir Joseph Lister. A denominação *Listeria monocytogenes* só foi definida em 1940 e, em 1948 foi incluída no Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey.

O gênero *Listeria* contém seis espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. grayi*. Porém, apenas as duas primeiras são patogênicas (GASANOV et al., 2005; REISSBRODF, 2004).

Caracteriza-se como um bacilo curto de 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de comprimento, gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado e não formador de cápsulas. Apresentam mobilidade a 25°C devido à presença de flagelos peritríquios (BREED, 1948). Pode multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (1°C a 45°C) e pH (4,3 a 9,6), além de tolerar concentrações salinas maiores que 10% (ROCOUT et al., 1997).

*L. monocytogenes* é um patógeno associado com altas taxas de hospitalização (CDC, 1999). Segundo estimativas, anualmente 2500 pessoas adquirem listeriose nos Estados Unidos da America, das quais 500 morrem (CDC, 2008). A partir do ano de 1980, diversos casos de listeriose passaram a ser relatados, em 1981, no Canadá, teve-se um registro da doença em que o alimento contaminado foi uma salada de repolho do tipo *coleslaw* (ROCOURT, 1996).

Segundo Farber e Peterkin (1991) e Gerner-Smidt (2007) os alimentos mais comumente envolvidos em casos de listeriose destacam-se os prontos para consumo, guardados em ambientes refrigerados e que não passam por cozimento antes do consumo, como leite e derivados, carne e derivados, vegetais e frutos do mar.

Os alimentos contaminados se constituem nas maiores fontes de transmissão do micro-organismo, tanto nos surtos como nos casos esporádicos de listeriose, o trato gastrointestinal (TGI) é o principal ponto de entrada do patógeno e foco de colonização. A fim de colonizar o TGI, o micro-organismo deve sobreviver às condições adversas, como a acidez estomacal, a alta osmolaridade e a presença de sais biliares no intestino delgado (COOB et al., 1996).

Vários fatores influenciam o sucesso da colonização por *L. monocytogenes* no hospedeiro, como a presença de células citotóxicas e linfócitos T do sistema imune intestinal, a integridade do epitélio intestinal, carga microbiana do alimento contaminado e grau de virulência das cepas (JACQUET et al., 2002). Rossmanith et al. (2006) citam que na Austrália em 2004, a taxa de mortalidade por listeriose foi de 21 %.

A listeriose ainda é responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, diagnosticadas principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco tais como imunodeprimidos, idosos, crianças e mulheres grávidas (FARBER; PETERKIN, 1991). Roberts (2003) afirma que *L. monocytogenes* pode causar duas formas clínicas de listeriose: infecção não invasiva limitada ao intestino e infecção invasiva localizada ou sistêmica.

No Brasil, a única legislação existente que trata do controle de *Listeria* em alimentos processados refere-se a queijos de média a elevada umidade, onde exige-se “ausência” em 25 g de amostra (BRASIL, 2001).

Entretanto, tal micro-organismo encontra-se amplamente distribuído no ambiente; em solos, água, águas residuais e vegetação em decomposição, sendo comum no intestino de humanos e animais domésticos, produtos agrícolas frescos e meio ambiente da área de processamento na indústria (TOMPKIN et al., 2001). Este tem sido isolado de diferentes alimentos, tais como leite cru e pasteurizado, queijo, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha, e refeições preparadas. Estes isolamentos têm sido realizados não só em outros países como também no Brasil (FRANCO; LANDGRAF, 2003). De acordo com Franchin (2008), no Brasil, trabalhos indicam a presença de *Listeria monocytogenes* em camarões (10% - região sul), filé de peixe (29,1% - região sul), leite pasteurizado e ensacado (16,7% - região nordeste), produtos cárneos refrigerados (10% - região sudeste), e mortadelas (8% - região sudeste).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Preparação do inóculo**

Foi utilizado o micro-organismo *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) obtido da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da URI - Campus de Erechim. O inóculo inicial foi preparado pela transferência da cultura estoque de *L. monocytogenes* em um Erlenmeyer com 50 mL de meio líquido Luria Bentani LB (triptona 10,0 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5,0 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup>) sob condições assépticas, sendo incubado a 37°C por um período de 24 horas.

A cada 48 horas foi realizado um repique em um novo Erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB líquido, onde foram acrescentados 2 mL do inóculo anterior. O número inicial de *L. monocytogenes* antes dos experimentos manteve-se em torno de 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

#### **3.2 Descrição do Aparato Experimental**

Os experimentos de inativação de micro-organismos a altas pressões realizados neste trabalho foram todos realizados em uma célula de volume variável com visualização, dotada de um pistão móvel, que permite a variação de volume e, conseqüentemente, da pressão no interior da célula. A Figura 2 apresenta o diagrama esquemático da unidade experimental.

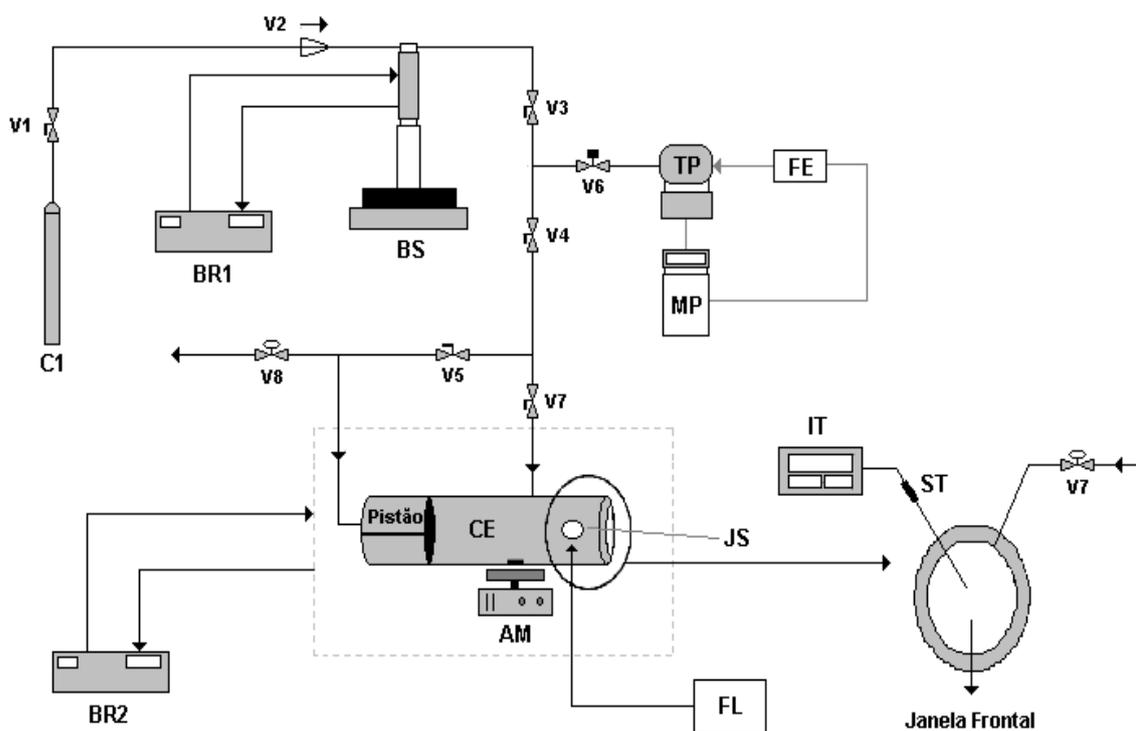


Figura 2 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

A unidade experimental é formada pelos seguintes componentes:

- **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;
- **BR**- 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 107mL/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 (Swiss Jewel Company), sendo uma janela frontal ( $d=25,4$  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 regulagem 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 célula de equilíbrio encamisada. 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 parte encamisada e retornando ao banho maria. 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, utilizado 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 Científica): 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.

Na Figura 3 é apresentada a estrutura geral da unidade experimental empregada no presente trabalho e seus componentes (A) e a célula de equilíbrio (B), onde podem ser observadas as conexões que servem para alimentação de CO<sub>2</sub> e inserção do termopar. Além disso, pode-se observar a parte encamisada onde é feita a conexão que permite a circulação de água para garantir que o experimento ocorra na temperatura desejada.

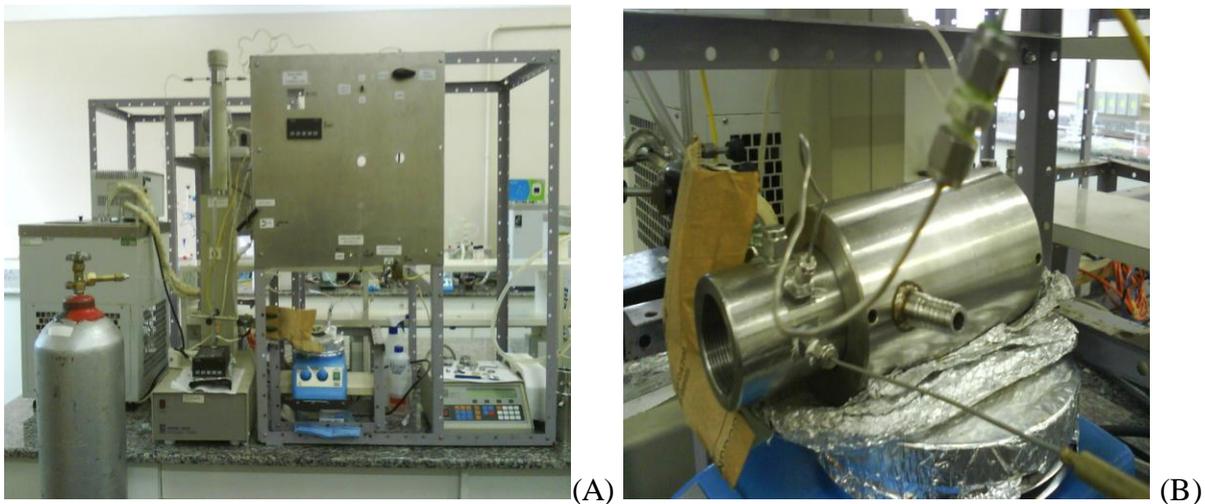


Figura 3 – Estrutura geral da unidade experimental utilizada neste trabalho (A) e célula de equilíbrio de fases (B).

### 3.3 Determinação dos dados de inativação de micro-organismos a altas pressões

O procedimento experimental utilizado para o estudo da inativação de *Listeria monocytogenes* a altas pressões, utilizando o aparato experimental descrito acima segue os seguintes passos:

- inicia-se com o carregamento do cilindro da bomba com o 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. Recomenda-se alimentar uma quantidade de solvente relativamente grande dentro da câmara da bomba já que o próprio solvente era utilizado como fluido pressurizador.

- Depois é 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 mantida em 100 bar.
- Nesse momento, realiza-se a montagem da célula de equilíbrio.
- Ainda na montagem da célula, deve dar-se atenção especial a montagem do pistão, sendo que o fechamento das extremidades do pistão deve ser efetuado de forma que o pistão possa deslizar pelo interior da célula e não permita a passagem e troca de fluidos entre a parte anterior e posterior do pistão.
- Nesse momento a célula é recolocada na unidade e a mesma é abastecida com o auxílio de uma seringa estéril com a quantidade de inóculo de *Listeria monocytogenes* correspondente à quantidade pré-estabelecida para o experimento no planejamento experimental.
- Posteriormente, ocorre o fechamento da célula, inserção do termopar e linha alimentação de dióxido de carbono. Deve-se ter cuidado nesse ponto, pois o fechamento inadequado pode resultar em vazamentos e conseqüente perda do experimento.
- 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, será 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 são mantidas constantes durante a carga e a massa de solvente adicionada é computada com base em sua densidade. Durante o processo de carga do solvente, nenhuma pressão é 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 é então reduzida a 50 bar.

- Após, faz-se a conexão das mangueiras de circulação de água do banho termostático de recirculação (BR2) na célula para que o experimento ocorra na temperatura pré-estabelecida pelo planejamento experimental. Essa temperatura pode ser observada pela leitura do termopar.
- Por fim, faz-se a programação da bomba conforme o planejamento experimental e executa-se o programa.

Todos os experimentos, com exceção das cinéticas, foram estipulados em 2 horas e pressões inicial de 80 e final de 200 bar. Nesse intervalo de tempo ocorrem os ciclos que consistem de pressurização (sempre a 100 bar.min<sup>-1</sup>), permanência em 200 bar e despressurização até 80 bar com taxa definida pelo planejamento experimental.

Os efeitos da temperatura, taxa de despressurização, número de ciclos e razão entre massa de CO<sub>2</sub> e massa da cultura de *L. monocytogenes* foram avaliados através da realização de delineamento composto central (DCC) 2<sup>4</sup> e 2<sup>3</sup>, com realização de triplicata no ponto central cujos níveis são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes avaliados no primeiro e segundo delineamento composto central.

1° DCC			
Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	33	37	41
Taxa de despressurização (bar.min <sup>-1</sup> )	10	55	100
Número de ciclos	1	4	7
Razão massa de cultura e a massa de CO <sub>2</sub>	1:01	1:0,8	1:1,5
2° DCC			
Taxa de despressurização (bar.min <sup>-1</sup> )	10	55	100
Número de ciclos	1	4	7
Razão massa de cultura e a massa de CO <sub>2</sub>	1:02	1:05	1:0,8

Ao termino de cada experimento, após a abertura da célula, realizou-se o plaqueamento em meio LB agar (triptona 10,0 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5,0 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5,0 g

L<sup>-1</sup>, agar 20g L<sup>-1</sup>) estéril, e posterior incubação por 24 horas a temperatura de 37°C para posterior contagem dos micro-organismos, expressos em UFC/mL.

As análises estatísticas referentes aos efeitos estimados de cada variável foram realizadas com auxílio do software Statistica 8.0 (STARSOFT, USA).

### 3.4 Determinação da cinética de inativação de *Listeria monocytogenes*

Foram realizadas cinéticas de inativação para verificar as reduções das contagens de micro-organismos viáveis. Para avaliar o efeito da taxa de despressurização sobre a inativação de *L. monocytogenes* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico, foram realizados experimentos com taxas de despressurização de 200, 160, 120, 80 e 60 bar.min<sup>-1</sup>. Todos esses experimentos tiveram duração total de 2 horas (pressurização, fase estacionária e despressurização), 1 ciclo, razão entre massa de inóculo e massa de CO<sub>2</sub> de 1:0,2, temperatura de 33°C e taxa de pressurização de 100 bar.min<sup>-1</sup>.

Para avaliar o efeito do tempo de pressurização sobre a inativação de *L. monocytogenes* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico, foi feita uma cinética de inativação em função do tempo do processo (pressurização, fase estacionária e despressurização) com 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos, com 1 ciclo, razão entre massa de inoculo e massa de CO<sub>2</sub> de 1:0,2, temperatura de 33°C, taxa de pressurização de 100 bar.min<sup>-1</sup> e taxas de despressurização de 100, 120 e 160 bar.min<sup>-1</sup>.

O modelo matemático para determinar o tempo de redução decimal (valor-D) de *L.monocytogenes* em uma determinada taxa de despressurização foi baseado em um balanço diferencial de primeira ordem (baseado em similaridades com processos de tratamento térmico);

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (1)$$

onde N é o número de UCF, t é tempo de processo, k é a constante de proporcionalidade.

Integrando-se a equação (1) com a seguinte condição inicial N (t=0) = N<sub>0</sub>, onde N<sub>0</sub> é o número de UCF inicial, tem-se;

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (2)$$

Rearranjando a equação (2) em termos de log tem-se;

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{1}{D}t \quad (3)$$

onde,  $k = 1/D$  e  $D$  definido como a constante de redução decimal, a qual representa o tempo necessário para haver a redução de 1 (um) ciclo log no processo.

Para a obtenção do valor  $D$ , foi realizada a regressão linear entre os diferentes tempos de exposição do micro-organismo a taxa de despressurização e o log de UFC sobreviventes, sendo  $D$  o inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

A constante de resistência de morte de *L. monocytogenes* a taxa de despressurização (valor- $Z$ ) foi determinada pela seguinte equação:

$$\log\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \frac{1}{Z} C_1 - C_2 \quad (4)$$

Onde  $D_1$  e  $D_2$  são valores de redução decimal obtidos para as taxas de despressurização  $C_1$  e  $C_2$ , respectivamente. A constante  $Z$  representa a alteração de concentração necessária para que ocorra uma alteração de um ciclo log (90% de redução) no tempo de morte ocasionado pelo sistema.

Para a obtenção do valor  $Z$ , foi realizada a regressão linear entre as diferentes taxas de despressurização ( $C$ ) e o log do respectivo valor  $D$ . Sendo  $Z$  obtido a partir do inverso do coeficiente angular da reta ajustada. É interessante salientar que a Equação (3) é de fundamental importância e utilidade em projetos, simulações e aplicações industriais do sistema em foco neste trabalho.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da inativação de *Listeria monocytogenes* usando CO<sub>2</sub> supercrítico

Na Tabela 2, pode-se observar os resultados obtidos no primeiro DCC, onde foram avaliados os efeitos da temperatura, taxa de despressurização, número de ciclos e a razão entre a massa de cultura bacteriana e a massa de CO<sub>2</sub> (R), no processo de inativação de *Listeria monocytogenes*.

Tabela 2 - Matriz do 1º DCC (valores reais e codificados) contendo os resultados de inativação de *L. monocytogenes*.

Exp.	Temperatura (°C)	Taxa de despressurização (bar.min <sup>-1</sup> )	Nº de Ciclos	R	Nº sobreviventes (UFC/mL)	Log <sub>10</sub> UFC/mL
1	-1 (33)	-1 (10)	-1 (1)	-1 (0,1)	565000	5,76
2	1 (41)	-1 (10)	-1 (1)	-1 (0,1)	500000	5,69
3	-1 (33)	1 (100)	-1 (1)	-1 (0,1)	190000	5,27
4	1 (41)	1 (100)	-1 (1)	-1 (0,1)	530000	5,72
5	-1 (33)	-1 (10)	1 (7)	-1 (0,1)	410000	5,61
6	1 (41)	-1 (10)	1 (7)	-1 (0,1)	500000	5,69
7	-1 (33)	1 (100)	1 (7)	-1 (0,1)	321000	5,5
8	1 (41)	1 (100)	1 (7)	-1 (0,1)	120000	5,07
9	-1 (33)	-1 (10)	-1 (1)	1 (1,5)	90000	4,95
10	1 (41)	-1 (10)	-1 (1)	1 (1,5)	80000	4,9
11	-1 (33)	1 (100)	-1 (1)	1 (1,5)	60000	4,77
12	1 (41)	1 (100)	-1 (1)	1 (1,5)	30000	4,47
13	-1 (33)	-1 (10)	1 (7)	1 (1,5)	15000	4,17
14	1 (41)	-1 (10)	1 (7)	1 (1,5)	43000	4,63
15	-1 (33)	1 (100)	1 (7)	1 (1,5)	34000	4,53
16	1 (41)	1 (100)	1 (7)	1 (1,5)	0	0
17	0 (37)	0 (55)	0 (4)	0 (0,8)	61000	4,78
18	0 (37)	0 (55)	0 (4)	0 (0,8)	63000	4,79
19	0 (37)	0 (55)	0 (4)	0 (0,8)	72000	4,85

Pode-se observar grandes diferenças quanto ao número de micro-organismos sobreviventes ao processo de inativação, indo desde a inativação completa (experimento 16)

até a sobrevivência de 565.000 UFC/mL (experimento 1) onde houve a redução de 5 logs em relação a contagem inicial de *L. monocytogenes*.

Os resultados da Tabela 2 foram tratados estatisticamente com o objetivo de explicitar o efeito das variáveis sobre as respostas obtidas. Utilizou-se no tratamento  $p < 0,05$ , e o tratamento é apresentado na Figura 4.

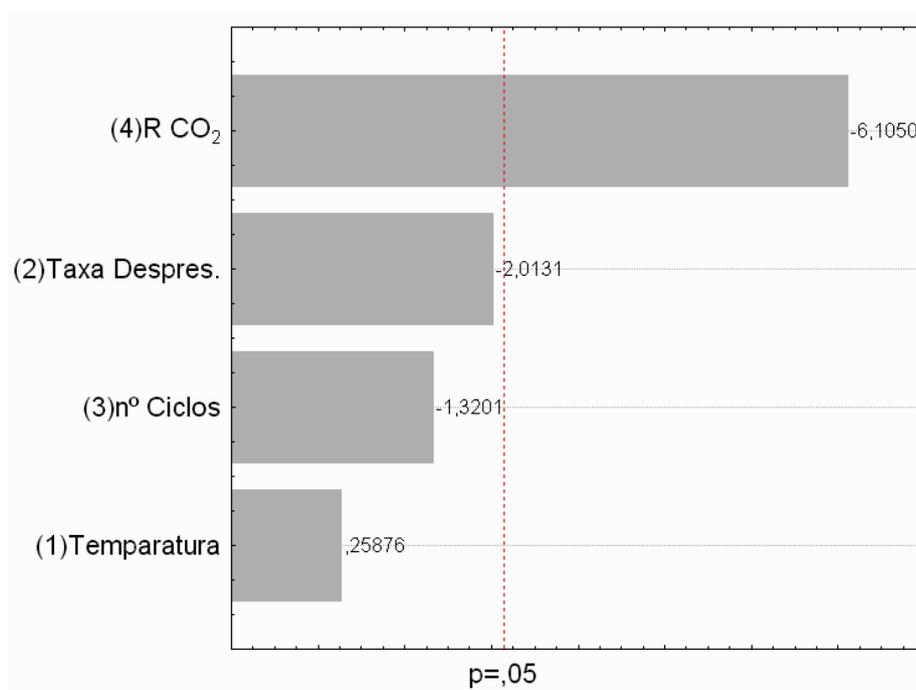


Figura 4 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do DCC 2<sup>4</sup> na inativação de *Listeria monocytogenes* com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Como pode ser observado, apenas a razão entre a massa de cultura de *L. monocytogenes* e a massa de CO<sub>2</sub> mostrou-se significativa ( $p < 0,05$ ) diferentemente das demais, ou seja, quanto maior a oferta de dióxido de carbono, mais eficiente foi a inativação de *L. monocytogenes*.

A maior concentração de CO<sub>2</sub> facilita uma maior solubilização do gás no interior das células bacterianas fazendo com que no momento da despressurização, quando ocorre a expansão do dióxido de carbono, o rompimento celular ocorra com maior facilidade levando a maior eficiência na inativação do micro-organismo (KARAMAN; ERKMEN 2001).

Porém pode-se observar na Tabela 2, que os resultados foram semelhantes nos experimentos realizados com a maior razão entre massa de *L. monocytogenes* e CO<sub>2</sub> e o ponto central com mostrando que razões de massa de *L. monocytogenes* e CO<sub>2</sub> menores de 1:1,5

podem apresentar resultados satisfatórios, que além de ser eficiente na inativação do micro-organismo traga economia ao processo. Além disso, o excesso de CO<sub>2</sub> pode estar distorcendo ou mascarando o efeito das demais variáveis, com isso decidimos manter as variáveis taxa de despressurização e número de ciclos no próximo planejamento experimental mesmo estas não terem mostrado efeito significativo.

A variável temperatura não apresentou efeito significativo sendo um excelente resultado, pois mostra que a temperatura não exerce influência sobre o processo de inativação, e por tanto a mesma pode ser fixada em seu nível mais baixo (33°C) para os demais experimentos, temperatura esta próxima a temperatura ambiente, gerando economia de energia durante o processo e mantendo-se distante das temperaturas que trazem prejuízos nutricionais e sensoriais aos alimentos.

Assim, observou-se a necessidade da realização de um novo DCC com ajustes das faixas de abrangência das variáveis estudadas cujos níveis podem ser observados na Tabela 1.

Em função dos resultados do primeiro DCC, o segundo DCC 2<sup>3</sup> foi realizado com a variável temperatura fixada em 33°C. A razão entre a massa de inóculo e massa de CO<sub>2</sub> foi avaliada entre 1:0,2 e 1:0,8, mantendo-se a taxa de despressurização entre 10 e 100 bar.min<sup>-1</sup> e o número de ciclos entre 1 e 7 ciclos, com tempo total de exposição de 2 horas.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos nos experimentos do segundo DCC, onde pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos nos experimentos 3 e 4, em que a contagem de micro-organismos foram respectivamente  $8,7 \times 10^3$  e  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

Tabela 3 - Matriz do 2º DCC (valores reais e codificados) contendo os resultados de inativação de *L. monocytogenes*.

Exp.	R CO <sub>2</sub>	Taxa de despressurização (bar.min <sup>-1</sup> )	Nº de Ciclos	Nº sobreviventes (UFC/mL)	Log UFC/mL
1	-1(0,2)	-1(10)	-1(1)	220000	5,342
2	1(0,8)	-1(10)	-1(1)	44250	4,645
3	-1(0,2)	1(100)	-1(1)	8700	3,939
4	1(0,8)	1(100)	-1(1)	2500	3,397
5	-1(0,2)	-1(10)	1(7)	440000	5,643
6	1(0,8)	-1(10)	1(7)	180000	5,255
7	-1(0,2)	1(100)	1(7)	61000	4,785
8	1(0,8)	1(100)	1(7)	10000	4
9	0(0,5)	0(55)	0(4)	190000	5,278
10	0(0,5)	0(55)	0(4)	141500	5,15
11	0(0,5)	0(55)	0(4)	170000	5,23

Os resultados obtidos no segundo planejamento foram tratados estatisticamente com o objetivo de observar o efeito das variáveis sobre as respostas obtidas. Utilizou-se no tratamento  $p < 0,05$ , e o tratamento é apresentado na Figura 5.

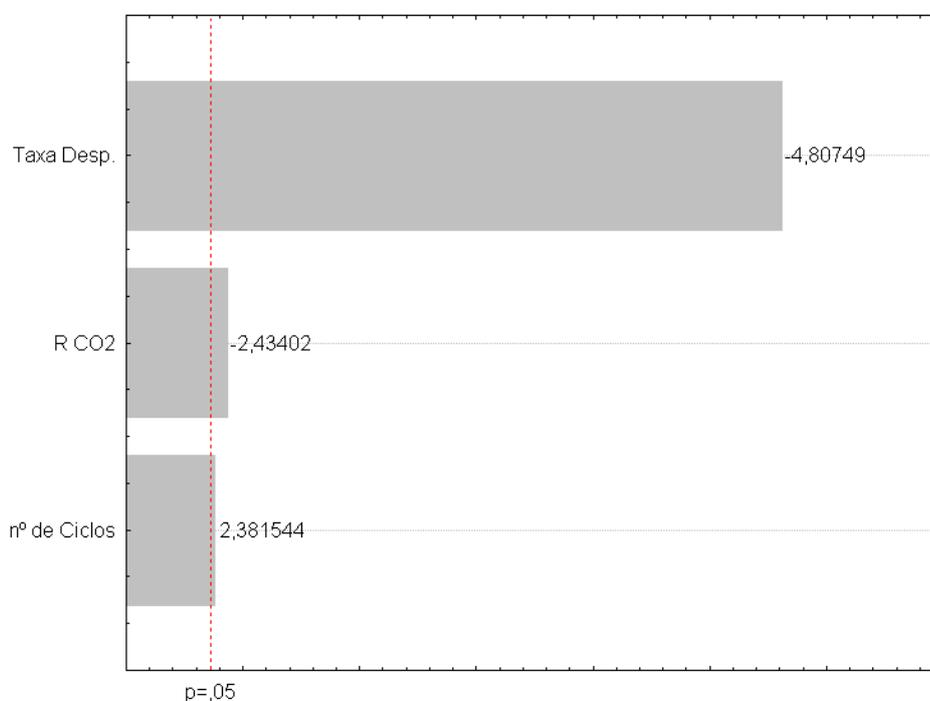


Figura 5 - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do segundo DCC na inativação de *Listeria monocytogenes* com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Na Figura 5 observa-se que as três variáveis mostraram-se significativas, com destaque para a taxa de depressurização mostrando que quanto maior a taxa de depressurização mais eficiente é o processo de inativação de *L. monocytogenes*. Estes resultados confirmam que a razão da massa de *L. monocytogenes* e CO<sub>2</sub> de 1:1,5 estavam mascarando o efeito das demais variáveis.

Apesar do experimento 3 (razão massa inóculo/massa CO<sub>2</sub> 1:0,2; taxa de depressurização 100 bar.min<sup>-1</sup>; 1 ciclo) ter apresentado eficiência ligeiramente inferior ao experimento 4 (razão massa inóculo/massa CO<sub>2</sub> 1:0,8; taxa de depressurização 100 bar.min<sup>-1</sup>; 1 ciclo), esse utiliza quantidade bem menor de CO<sub>2</sub>, 20%, contra 80% na razão massa/massa, o que o faz ser considerado o melhor resultado.

Baseado nos resultados do segundo DCC observou-se a necessidade da realização de experimentos para avaliar os efeitos da taxa de depressurização sobre a inativação de *L. monocytogenes*.

#### 4.2 Efeito da taxa de depressurização na inativação de *Listeria monocytogenes*.

Visando avaliar o efeito da taxa de depressurização sobre a inativação de *L. monocytogenes* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico realizou-se uma série de experimentos com a taxa de depressurização variando de 200 a 60 bar.min<sup>-1</sup>, mantendo as demais variáveis fixas conforme o experimento 3 do segundo DCC. Os resultados desta cinética encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da avaliação da inativação de *L. monocytogenes* com variação da taxa de depressurização.

Taxa de depressurização (bar.min <sup>-1</sup> )	N° sobreviventes (UFC/mL)	Log UFC/mL
60	4800000	6,681
80	350000	5,544
100	8700	3,939
120	300	2,477
160	180	2,255
200	20	1,301

Pode-se observar na Figura 6 que ocorre uma redução linear no número de micro-organismos sobreviventes conforme ocorre o aumento da taxa de despressurização no intervalo entre 60 e 120 bar.min<sup>-1</sup>. Após esse ponto, o aumento das taxas de despressurização não causou redução significativa na inativação de *L. monocytogenes* mantendo-se praticamente constantes.

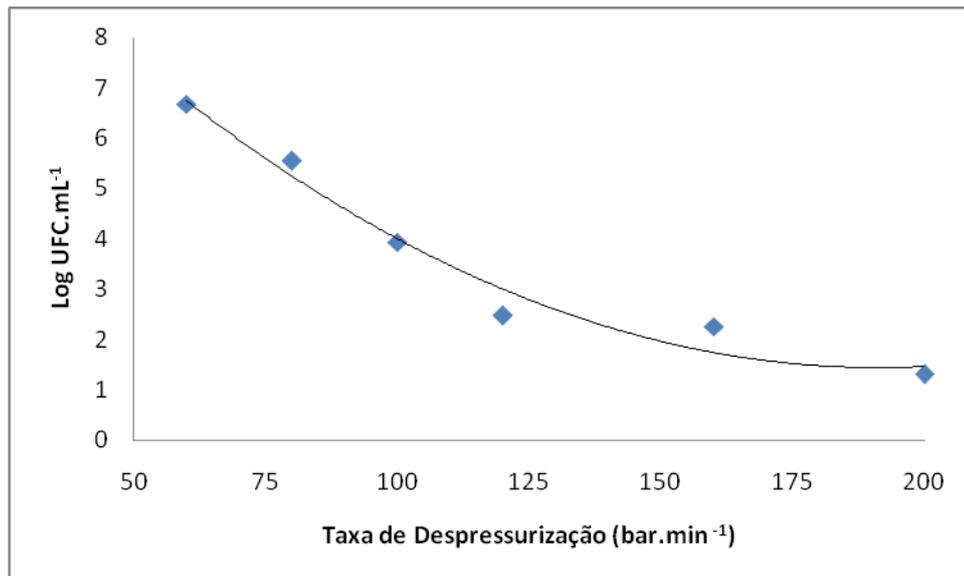


Figura 6 – Cinética de inativação de *L. monocytogenes* em função da taxa de despressurização, apresentando equação geral de reta  $y = 0,000x^2 - 0,117x + 12,69$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,969$ .

#### 4.3 Cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em função do tempo total do processo

Considerando-se os resultados obtidos no experimento anterior, fixou-se a taxa de despressurização em 120 bar.min<sup>-1</sup> e realizou-se uma cinética de inativação em função do tempo do processo. As demais variáveis também foram mantidas constantes (experimento 3 do segundo DCC). Foram realizados experimentos com 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos de tempo total de processo (Figura 7).

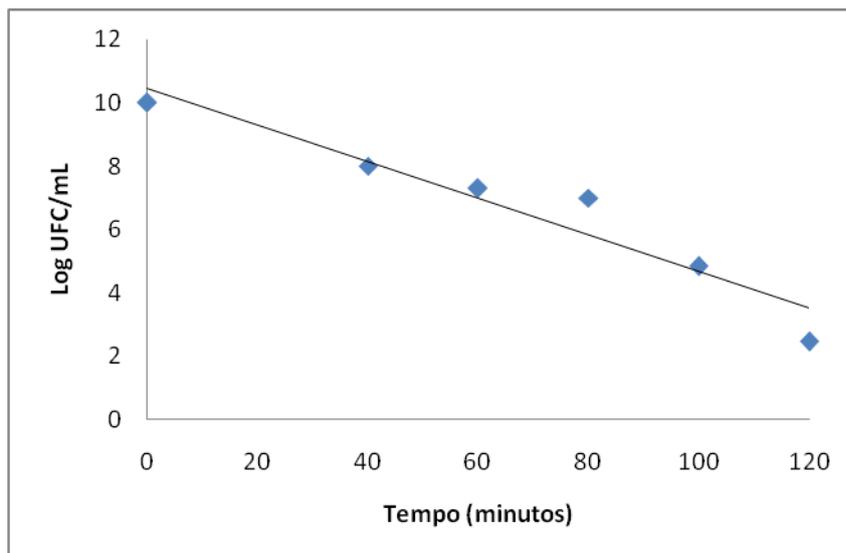


Figura 7 – Cinética de inativação de *L. monocytogenes* em função do tempo de processo com taxa de despressurização de  $120 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ , apresentando equação geral de reta  $y = 0,058x + 10,47$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,917$ .

A partir dessa cinética pode-se observar que somente houve uma inativação significativa nos experimentos com maior duração, mostrando a necessidade de exposição da *L. monocytogenes* ao fluido supercrítico para que o mesmo consiga se difundir pela membrana celular e se dissolver no meio intracelular.

Visando obter as constantes D e Z foram realizadas também duas cinéticas de inativação em função do tempo do processo, dessa vez, fixando a taxa de despressurização em 100 e  $160 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os resultados dessas cinéticas podem ser observados nas Figuras 8 e 9.

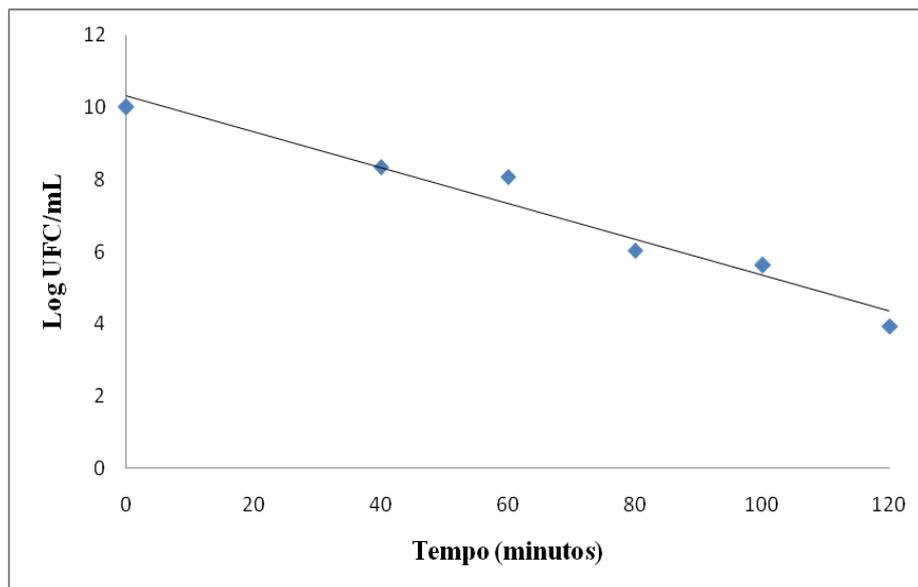


Figura 8 – Cinética de inativação de *L. monocytogenes* em função do tempo de processo com taxa de despressurização de  $100 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ , apresentando equação geral de reta  $y = 0,049x + 10,32$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,958$ .

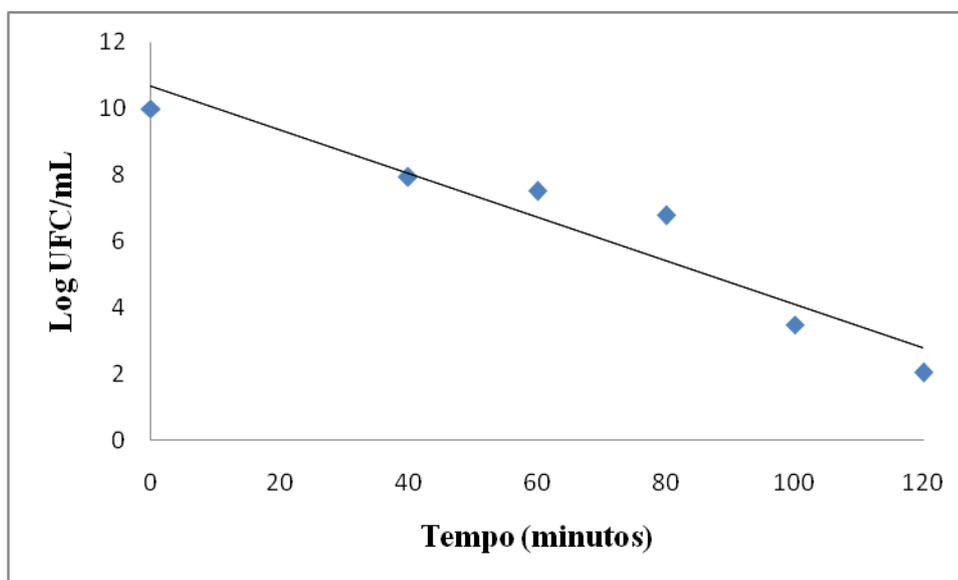


Figura 9 – Cinética de inativação de *L. monocytogenes* em função do tempo de processo com taxa de despressurização de  $160 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$ , apresentando equação geral de reta  $y = 0,065x + 10,66$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,912$ .

As figuras 8 e 9 reforçam a importância do tempo de exposição da cultura de *L. monocytogenes* ao dióxido de carbono supercrítico para que possa ocorrer penetração do fluido nas células para sua posterior destruição.

Nos cálculos envolvendo o tratamento térmico e/ou tratamento com fluídos pressurizados de alimentos ou meios de cultura é empregado o conceito de tempo de redução decimal (valor D) que pode ser definido como o tempo requerido para reduzir 90% do número de micro-organismos inicial, ou seja, redução de um ciclo logarítmico no número de sobreviventes. O valor de D é considerado dependente do processo ou agente de morte, tipo de micro-organismo e meio de cultura ou alimento que o mesmo está crescendo (PENNA, 2002).

A partir dos coeficientes angulares das equações das retas obtidas na linearização dos pontos em cada uma das cinéticas de inativação de *L. monocytogenes* em função do tempo, com taxas de despressurização fixadas em 100, 120 e 160 bar.min<sup>-1</sup>, foram obtidos os valores de  $D = (-1/b)$  os quais podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de D e log de D para as cinéticas de inativação de *L. monocytogenes* em função da taxa de despressurização.

Taxa de despressurização das cinéticas de inativação (bar.min <sup>-1</sup> )	D (min.)	Log D
160	12,66	1,1024
120	14,99	1,1758
100	17,85	1,2516

Os valores de D obtidos nesse estudo são superiores aos encontrados para *E. coli* (SILVA, 2011) e *Salmonella typhimurium* (ERKMEN; KARAMAN, 2001), ambas bactérias Gram-negativas.

Conforme Erkmen (2001), bactérias Gram-positivas como a *Listeria monocytogenes*, são mais resistentes ao tratamento sob pressão quando comparadas as Gram-negativas. Isso pode ser atribuído a sua parede celular mais espessa, apresentando entre 20 e 80 nm contra máximos 20 nm das Gram-negativas.

O parâmetro Z, corresponde ao intervalo da temperatura ou pressão que ocasiona uma variação de 10 vezes no valor D, sendo numericamente igual a variação de temperatura ou pressão necessários para a curva de resistência térmica atravessar um ciclo logaritmo. Tal parâmetro é obtido a partir do Log dos valores de D e posterior linearização desses pontos. Obtendo-se a equação geral da reta aplica-se a equação  $Z=1/b$ . O gráfico de Log D pode ser observado na Figura 10 e sendo a equação da reta correspondente a  $y = -0,002x + 1,479$  obtivemos  $Z=500$ .

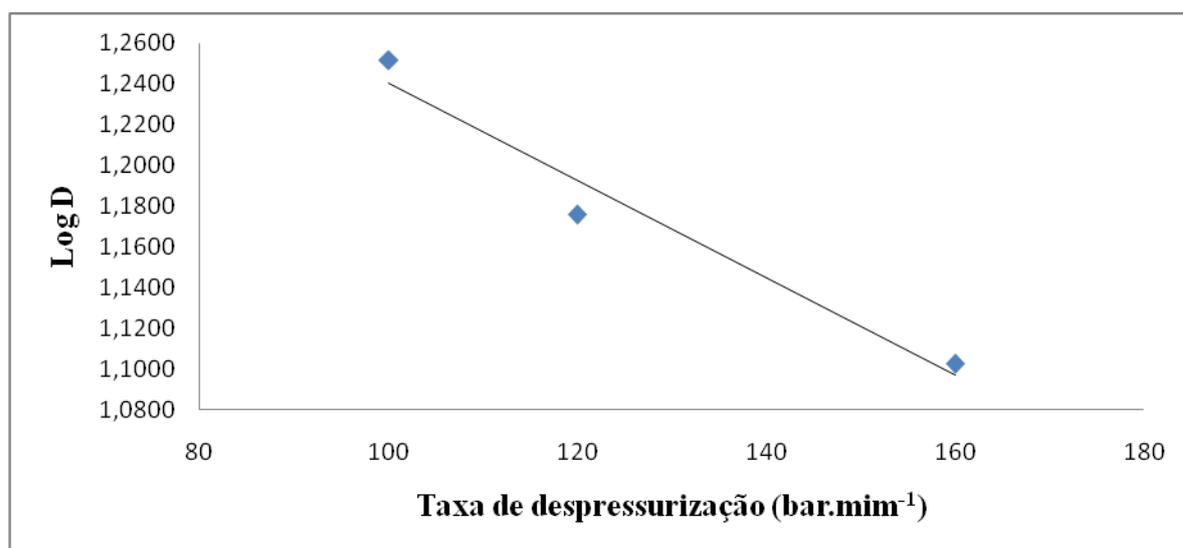


Figura 10 – Gráfico de Log de D para a obtenção do parametro Z, apresentando equação geral de reta  $y = 0,002x + 1,479$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,960$ .

O valor de  $Z=500$  bar obtido neste trabalho indica que para ocorrer a redução de 90% no tempo de redução decimal é preciso promover um acréscimo de 500 bar na pressão do sistema.

Conhecendo o valor de Z pode-se simular o valor de D para qualquer outra taxa de despressurização utilizando a equação 4.

$$\log D = \frac{1}{Z} \cdot (P - P_{ref}) + \log D_{ref} \quad (4)$$

onde P e  $P_{ref}$  representam a pressão do tratamento e pressão de referência e D e  $D_{ref}$  são o tempo de redução decimal na pressão do sistema e na pressão de referência.

Silva (2011) encontrou valores de  $Z= 113,64$  para inativação de *Escherichia coli* a pressão de 120 bar.

Já 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 variou de 0,0848 para  $0,4717 \text{ min}^{-1}$  e 4,90 para 27,46 min,.

Para *Listeria monocytogenes*, em experimentos realizados com suspensões em meio de cultura BHI, a  $25^{\circ}\text{C}$ , encontrou valores de D (min) 34,49 utilizando 1,51MPa de pressão, 18,59 utilizando 3,02 MPa e 13,0 para pressão de 6,05 MPa. Nessas condições o valor de Z obtido foi de  $Z= 115,8 \text{ MPa}$  (ERKMEM, 2001).

Ainda conforme Erkmen (2001), estudos realizados para avaliar a inativação de *L. monocytogenes* por alta pressão de dióxido de carbono em suspensões em soro fisiológico, a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , obtiveram D (min) de 18,26 em pressões de 1,51 MPa, 13,21 a 3,02 MPa, e 4,31 para pressão de 6,05 MPa. Através desses valores foi encontrado  $Z= 70,03 \text{ MPa}$ .

## 5 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a inativação de *Listeria monocytogenes* utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. Foi utilizada a metodologia de planejamento experimental como ferramenta para determinar os efeitos de temperatura, taxa de despressurização, número de ciclos e razão entre a massa de inoculo de *L. monocytogenes* e massa de CO<sub>2</sub>.

A unidade experimental mostrou-se confiável, apresentando boa reprodutibilidade dos resultados experimentais. A unidade experimental mostrou-se de fácil operação, segura respeitando-se os procedimentos de segurança, necessitou de pouca manutenção ligada sempre à troca de algumas conexões na célula de volume variável. O procedimento experimental adotado mostrou-se adequado, praticamente inibindo problemas ligados a contaminação de outros micro-organismos. Quanto à estratégia experimental adotada pode-se citar que a mesma foi bem elaborada, de forma que os experimentos transcorressem sem problemas e conduzissem a obtenção segura e confiável do levantamento dos dados, além de permitir o adequado acesso do efeito das variáveis de operação.

A taxa de despressurização e a razão entre a massa de inoculo e massa de CO<sub>2</sub> mostraram-se significativos no processo de inativação de *Listeria monocytogenes* através da utilização de dióxido de carbono supercrítico. A melhor condição para a inativação de *L. monocytogenes* é razão de massa de *L. monocytogenes* e CO<sub>2</sub> de 1:0,2, taxa de despressurização de 100 bar.min<sup>-1</sup>, 1 ciclo de pressurização/despressurização, 30°C e 2 horas de exposição tendo reduzido 6,1 log<sub>10</sub>. A eficiência da inativação aumentou conforme o aumento da taxa de despressurização entre 60 e 120 bar.min<sup>-1</sup>, mantendo-se praticamente constante acima desse valor. Os tempos de redução decimal (D) variaram entre 12,6 e 17,85 minutos. O incremento de pressão necessário para ocasionar a redução de um ciclo logarítmico nos valores D é descrito pelo valor de Z e corresponde a 500 bar. Os resultados descritos nesse trabalho são úteis para viabilizar estudos de inativação de micro-organismos através da utilização de dióxido de carbono supercrítico em diversos alimentos.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, a seguir são apresentadas algumas sugestões de trabalhos que podem ser realizados:

- Estudo cinético da inativação de populações de micro-organismos com contagens mais baixas, compatíveis com as encontradas em alimentos;
- Estudo da inativação de microrganismos inoculados em produtos alimentícios, sólidos e líquidos;
- Estudo da inativação de micro-organismos através da ação de fluidos supercríticos em alimentos consumidos crus ou rapidamente cozidos, tais como frutos do mar.
- Avaliação das características sensoriais dos alimentos submetidos a altas pressões com dióxido de carbono supercrítico;
- Avaliação da quantidade de CO<sub>2</sub> absorvido nos alimentos submetidos à alta pressão com CO<sub>2</sub> supercrítico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDIA, A. Process Consolidation on the Application of High Pressure Treatment at Elevated Temperature Levels for Food Preservation. Department of Food Process Engineering and food Biotechnology, Berlin University of Technology, Berlin, 2004. 102p.

BALASUBRAMANIAN, V. M.; FARKAS, D. High-pressure Food Processing. **Food Science and Technology International**. v.14, n.5, p.413-418, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>. Acesso em: 10/10/2011.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; HITCHENS, A.P. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: The William and Wilkins Co. 1948, 60p.

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.

CARDOSO, P. J. Supercritical fluid extraction and characterization of oil from hazelnut. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.104, p.402-409, 2002.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC), Foodnet surveillance report for 1999 (final report). Disponível em: <[http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listening/listeriosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listening/listeriosis_gi.html)>. Acesso em: 05/11/2011.

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

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](http://www.elsevier.com/locate/lwt). v 41, p 317-322, 2008.

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.

COBB, C. A., CURTIS, G. D., BANSI, D. S., SLADE, E., MEHAL, W., MITCHELL, R. G., CHAMPMAN, R. W. Increased prevalence of *Listeria monocytogenes* in the faeces of patients receiving longterm H2-antagonists. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.8, n.11, p.1071-1074, 1996.

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.

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 CO<sub>2</sub> technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. **Journal of Food Science**, v 71, p 1–11, 2006.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Products**, v.14, n.4, p.273-285, 2004.

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.

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.

ELIZONDO, R. A. Recent developments in the commercial application of high-pressure technology in food processing. **Food process design and evaluation**. Lancaster. Technomic, 1995, p. 175-190.

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.

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 *Escherichia coli* in broth. **Food Microbiology**, v 18, p 11-16, 2001.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. São Paulo. Editora Atheneu, 2001. 652 p.

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.

Food and Agriculture Organization. Declaração de Roma Sobre a Segurança Alimentar Mundial e Plano de Ação da Camara Mundial de Alimentação. Italia, 1996. Disponível em < <http://www.fao.org/docrep/003/w3613p/w3613p00.htm>>. Acesso em: 10/10/2011.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, Sep. 1991.

FRANCHIN, P. R. Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2008, 114f.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003.

FREITAS, A. C.; FIGUEIREDO, P.; Conservação de Alimentos, Lisboa, 2000.

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.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Review**, v. 26, p. 851-875, 2005.

GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and infection**, v. 9, p. 1236-1243, 2007.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de Separação com Membranas. Editora E-papers, 1ª Ed. Rio de Janeiro, 2006.

HENDRICKX, M.; KNORR, D. **Ultra high pressure treatment of foods**: Springe. 2002 (Food engineering series).

INDRAWATI, A. V. L.; HENDRICKX, M. Pressure pressure processing. **The nutrition handbook for food processors**. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 433-461.

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.

JACQUET, C.; GOUIN, E.; JEANNEL, D.; COSSART, P.; ROCOURT, J. Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.616-622, Feb. 2002.

JAWETZ, N. E.; MELRRICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Microbiologia Médica. 21ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.155-156.

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

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.

KNORR, D.; HEINZ, M. Z. V.; LEE, D. Applications and potencial of ultrasonics in food processing. **Trends in Applied Science & Technology**, London, v. 15, n.5, p.261-266, May 2004.

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.

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.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.3, p.187-195, 2001.

MATHYS, A. Inactivation mechanisms of *Geobacillus* and *Bacillus* spores during high pressure thermal sterilization. Technischen Universitat Berlin, Berlin, 2008. 177 p.

McCLEMENTS, J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science e Technology**, Oxford, UK, v.6, n.9, p.293-299, Sept, 1995.

McNALLY, M. E. P. Method development in supercritical fluid extraction. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Gaithesburg, v.79, p.380-387, 1996.

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.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **Journal of Pathology & Bacteriology**, v.29, p.407-439, 1926.

NORTON, T.; SUN, D.W. Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. **Food Bioprocess Technol**, v. 1, p.2-34, 2008.

NUNES, P. E. Q.; SILVEIRA, T. J. D.; ARCE, A. I. C. Efeito do campo magnético pulsante sobre o escurecimento enzimático da banana. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 16., 2008, Piracicaba. São Paulo: USP.

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

OKWUMABUA, O.; O'CONNOR, M.; SHULL, E.; STRELOW, K.; HAMACHER, M.; KURZYNSKU, T.; WARSHAUER, D. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 275-281, 2005.

PATTERSON, M. F. Microbiology of pressure-treated foods A REVIEW. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1400-1409, 2005.

PENNA, T. C. V.; MARTINS, A. M. Z.; MACHOSHVILI, I. A. Conceitos Básicos de Esterilização e Desinfecção. Capítulo 01, 2002.

POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Magnetic-field inactivation of microorganisms and generation of biological changes. **Food Technology**. Chicago, v. 47, p.85-93, 1993.

REISSBRODF, R. New chromogenic plating media detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp – an overview. **Internationao Journal of Food Microbiology**, v. 95, p.83-89, 2004.

ROBERTS, A. J.; WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, n.5, p.904-918, May 2003.

ROCOUT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, P.M.; DEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Ed.) **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. 1st ed. USA: ASM, 1997. p. 337-352.

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

ROSSMANITH, P.; KRASSNIG, M.; WAGNER, M; HEIN, I. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 763-771, 2006.

SASTRY, S. Ohmic Heating and Moderate Electric Field Processing. **Food Science and Technology International**, v. 14, p. 419-422, 2008.

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

SILVA, J. M.. **INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2011.

SOUZA, E.L. **Potencial microbiano de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. 2006. 141p. Tese (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

SFILIMBERGO, S.; BERTUCCO, A. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. **Biotechnology and Bioengineering**, v 84, p 627–638, 2003.

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

THAM, W.; ERICSSON. H.; LONCAVERIC, S.; UNNERSTAD, H.; DANIELSSON-THAN, M.-L. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravid and cold-smoked fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p. 173-175, 2000.

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.

TOMPKIN, R. B.; SCOUT, V. N.; BERNARD, D.T.; SVEUM, W. H. & GOMBAS, K.S., Pautas para prevenir la contaminación com *Listeria monocytogenes* después del procesamiento. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 21, p. 381-395, 2001.

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.

YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H. G.; BALABAM, M. O.; WELT, B. A.; RALAT, M.; MARSHALL, M. R. Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. **Food Chemistry**. v.116, p. 828–835, 2009.

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.