



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

**INATIVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SALMÃO CRU  
EMPREGANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

**JULIANA BARBOSA**

ERECHIM, RS – BRASIL  
DEZEMBRO DE 2016

**JULIANA BARBOSA**

**INATIVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SALMÃO CRU  
EMPREGANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Dra. Geciane Toniazco Backes  
Dr. Rogério Luis Cansian  
Dr. Elton Franceschi

ERECHIM, RS – BRASIL

DEZEMBRO DE 2016

# **INATIVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SALMÃO CRU EMPREGANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

**JULIANA BARBOSA**

Tese de Doutorado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Geciane Toniazzo Backes, D. Sc  
Orientadora

---

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc  
Orientador

---

Prof. Elton Franceschi, D. Sc  
Co-Orientador

---

Alexander Junges, D. Sc  
URI- Erechim

---

Clarice Steffens, D. Sc  
URI- Erechim

---

Iloir Gaio, D. Sc  
UFFS – Campus Erechim

---

Wagner L. Priamo, D. Sc  
IFRS – Campus Erechim

URI- Erechim  
Erechim, dezembro de 2016.

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

*Dedicatória*

Aos meus pais, João Antonio e Catarina,  
Aos meus sogros Altair e Ivone,  
Ao meu marido pelo  
exemplo de vida e amor!  
A minha filha, presente divino.  
Obrigada por me incentivarem  
a nunca desistir

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permite jamais perder a fé e a esperança.

Aos meus pais Catarina e João, fonte de inesgotável amor, aos quais devo todas as minhas conquistas, pois me ensinaram a jamais desistir e manter sempre a dedicação em tudo que me propor a fazer.

Ao grande amor da minha vida, meu marido Evandro, pelo grande companheiro que é, pela compreensão em todos os momentos e por ser o grande incentivador do meu sucesso e por vibrar junto comigo a cada conquista e agora me permitir uma família linda com a chegada da nossa Cecília, filha amada e muito desejada.

Aos meus sogros, Ivone e Altair, grandes apoiadores da minha carreira e sempre acolhedores para que eu não sinta tanto a distância dos meus pais.

Aos meus grandes MESTRES e orientadores professores Cansian e Geciane, que tão brilhantemente me guiaram na pesquisa e na didática acadêmica, que incansavelmente corrigiram e orientaram meus primeiros rabiscos até o “produto final”.

Ao professor Elton Franceschi, que nos deu grandes ideias e por todo ensinamento e atenção que teve com este trabalho.

A Mônica e ao Bruno, que foram meus braços no laboratório, me auxiliaram nas pesquisas e com os quais dividi as pequenas vitórias do dia a dia e as aflições dos resultados das pesquisas.

A Todos os colaboradores dos laboratórios da URI que nunca mediram esforços para me ajudar durante todas as fases de pesquisa, demonstrando companheirismo, amizade e trabalho em equipe. Aos demais funcionários sem os quais seria impossível o trabalho de todos nós nas instalações, afinal em dias frios nada como um café “quentinho” e um bate-papo com o orientador para surgirem novas ideias e propostas para a pesquisa.

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

## **INATIVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SALMÃO EMPREGANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Juliana Barbosa

Dezembro/2016

Orientadores: Rogério Luis Cansian

Geciane Toniazco Backes

Elton Franceschi

O uso de novas tecnologias no processo de conservação dos alimentos como alternativa a métodos tradicionais vem tornando-se objeto comum de estudo entre pesquisadores de todo o mundo. A utilização de processos não térmicos surge como uma alternativa aos tratamentos térmicos convencionais para melhorar a qualidade microbiológica, preservando as características sensoriais do produto “*in natura*”, além de promover o aumento da vida útil, facilitando a sua comercialização, manuseio e transporte. O presente estudo avaliou a inativação de *Staphylococcus aureus* em matriz líquida e em salmão cru por tratamento com dióxido de carbono supercrítico. Para tanto utilizou-se de metodologia de planejamento experimental para avaliar os efeitos da pressão, a taxa de despressurização e razão entre massa de inóculo e massa de CO<sub>2</sub> na inativação de *S. aureus*, bem como a determinação de valores D, determinação de cinética de inativação em cultura líquida e em salmão cru e alterações físicas (Aw, pH e cor) provocadas pelo tratamento em salmão cru. O tratamento com dióxido de carbono supercrítico apresentou efeito positivo na inativação de *Staphylococcus aureus* em cultura pura e em salmão cru, sendo que a pressão teve influência significativa na inativação de *S. aureus* em cultura pura, enquanto a taxa de despressurização e a razão entre a massa de inóculo e a massa de CO<sub>2</sub> não foram significativas ( $p < 0,05$ ). Os estudos de cinética mostraram que o número de sobreviventes diminuiu com o aumento da pressão, sendo que a 130 bar por 120 minutos houve inativação total de *S. aureus* em inóculo puro ( $\sim 10^6$  UFC/mL). Os tempos de redução decimal (valor D) variaram entre 17,4 a 46,7 min, com valor Z calculado de 138 bar. Em salmão cru, verificou-se que, quanto maior a carga microbiana inicial no produto, menor a eficácia do tratamento com dióxido de carbono supercrítico na inativação de *S. aureus*. O tempo de exposição do salmão ao *S. aureus* e o tempo de tratamento apresentaram influência no processo, sendo que o tratamento se mostrou mais eficaz nos tempos de contaminação superficial de 1 e 30 minutos, com inativação total do *S. aureus*, a partir de 60 e 90 minutos de exposição a alta pressão, respectivamente. A forma de inoculação também exerce influência na eficácia do processo, ficou evidente que a redução microbiana é maior quando a contaminação é superficial. A pressão (92,8 a 220 bar) e taxa de despressurização (<10 a 100 bar/min), foram fatores que também influenciaram significativamente a inativação microbiana, enquanto a razão entre a massa de CO<sub>2</sub> e a massa de salmão, não influenciaram o sistema de forma isolada, porém

a interação entre a taxa de despressurização e a razão mostrou influência significativa. O tratamento não exerceu influência sobre a  $A_w$  e pH e com relação a cor houve influência significativa (efeito negativo no parâmetro L, e efeito positivo nos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ ). A cinética de inativação de *S. aureus* em salmão cru mostrou inativação total do micro-organismo ( $\sim 10^5$  UFC/g com inoculação por injeção no interior do produto) com 252,6 bar por 120 minutos, razão massa de CO<sub>2</sub>: massa de salmão cru de 0,6:1, taxa de despressurização de 130 bar/minuto, a 33°C. A cinética de tempo indicou a obtenção de redução total de *S. aureus* com 123,1 minutos a 225 bar e demais variáveis fixas. Os valores D variaram de 21,4 a 36,9 minutos com 225 e 150 bar em salmão cru ( $\sim 10^5$  UFC/g com inoculação por injeção no interior do produto). Sendo assim, os resultados apontam a viabilidade técnica do procedimento, confirmando que o dióxido de carbono supercrítico é efetivo na inativação de *Staphylococcus aureus* em cultura líquida e em salmão cru.

Palavras chave: Cultura líquida, salmão cru, dióxido de carbono supercrítico, *Staphylococcus aureus*.

Abstract of Doctoral Thesis submitted to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

## **INACTIVATION OF *Staphylococcus aureus* IN RAW SALMON EMPLOYING SUPERCritical CARBON DIOXIDE**

Juliana Barbosa

Dezember/2016

Advisors: Rogério Luis Cansian  
Geciane Toniazco Backes  
Elton Franceschi

The use of new technologies in the process of food conservation as an alternative to traditional methods has become a common object of study among researchers around the world. The use of non-thermal processes appears as an alternative to conventional thermal treatments to improve the microbiological quality, preserving the sensorial characteristics of the in natura product, besides promoting the increase of the useful life, facilitating its commercialization, handling and transport. The present study evaluated the inactivation of *Staphylococcus aureus* in liquid matrix and in raw salmon by treatment with supercritical carbon dioxide. For this purpose, experimental design methodology was used to evaluate the effects of pressure, the rate of depressurizing and the ratio of inoculum mass and CO<sub>2</sub> mass in the inactivation of *S. aureus*, as well as the determination of values D, determination of inactivation kinetics in liquid culture and in raw salmon and physical alterations (Aw, pH and color) caused by treatment in raw salmon. The treatment with supercritical carbon dioxide showed a positive effect on the inactivation of *S. aureus* in pure culture and in raw salmon, and the pressure had a significant influence on the inactivation of *S. aureus* in pure culture, while the rate of depressurization and the ratio between inoculum mass and CO<sub>2</sub> mass were not significant (p<0.05). Kinetic studies showed that the number of survivors decreased with increasing pressure, and at 130 bar for 120 minutes there was total inactivation of *S. aureus* in pure inoculum (~10<sup>6</sup> CFU/mL). The decimal reduction times (D value) ranged from 17.4 to 46.7 min, with a calculated Z value of 138 bar. In raw salmon, it was found that the higher the initial microbial load in the product, the less effective the treatment with supercritical carbon dioxide in the inactivation of *S. aureus*. The time of exposure of salmon to *S. aureus* and the time of treatment showed an influence in the process, being that the treatment was more effective in times of superficial contamination of 1 and 30 minutes, with total inactivation of *S. aureus*, from 60 and 90 minutes of exposure to high pressure, respectively. The inoculation form also exerts influence on the efficacy of the process, it was evident that the microbial reduction is greater when the contamination is superficial. Pressure (92.8 to 220 bar) and depressurizing rate (<10 to 100 bar/min) were the factors that significantly influenced microbial inactivation, whereas the ratio between CO<sub>2</sub> mass and salmon mass did not influence the system in isolation, but the interaction between the rate of depressurization and the ratio showed significant influence. The treatment had no influence on Aw and pH and with respect to color there was a significant influence (negative effect on L parameter and positive effect on a \* and b \* parameters). The inactivation kinetics of *S. aureus* in raw salmon showed total inactivation of the microorganism (~10<sup>5</sup> CFU/g with injection inoculation inside the product) with 252.6 bar for 120 minutes, mass ratio of CO<sub>2</sub>: salmon mass Crude ratio of 0.6:1, rate of depressurizing 130 bar/minute, at 33 °C. The kinetics of time

indicated a total reduction of *S. aureus* with 123.1 minutes at 225 bar and other fixed variables. D values ranged from 21.4 to 36.9 minutes at 225 and 150 bar in raw salmon ( $\sim 10^5$  CFU/g with injection inoculation into the product). Thus, the results indicate the technical viability of the procedure, confirming that supercritical carbon dioxide is effective in the inactivation of *S. aureus* in liquid culture and in raw salmon.

Keywords: Liquid culture, raw salmon, supercritical carbon dioxide, *Staphylococcus aureus*.

## ÍNDICE

Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>xi</b>
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>4</b>
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
<b>3.1. Consumo de Salmão e sua importância para saúde pública</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2 O pescado como via de transmissão de agentes patogênicos</b> .....	<b>6</b>
<b>3.3 <i>Staphylococcus spp.</i></b> .....	<b>8</b>
<b>3.4 Processamento não térmico de alimentos</b> .....	<b>9</b>
<b>3.5. Processamentos a alta pressão</b> .....	<b>13</b>
<b>3.6 Processamento a alta pressão utilizando dióxido de carbono</b> .....	<b>15</b>
<b>3.7 Aplicação do tratamento a alta pressão em alimentos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.8 Aplicação do tratamento a alta pressão em pescados</b> .....	<b>22</b>
<b>3.9 Mecanismos de Inativação de micro-organismos usando dióxido de carbono pressurizado</b> .....	<b>23</b>
<b>3.10 Considerações sobre o estado da arte</b> .....	<b>30</b>
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
<b>4.1 PREPARO DO INÓCULO</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3 INATIVAÇÃO DE CULTURA PURA DE <i>Staphylococcus aureus</i> - MATRIZ LÍQUIDA</b> .....	<b>37</b>
<b>4.4 INATIVAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> PREVIAMENTE INOCULADO EM SALMÃO CRU - MATRIZ SÓLIDA</b> .....	<b>40</b>
<b>4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>44</b>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45

<b>5.1 INATIVAÇÃO DE CULTURA PURA DE <i>Staphylococcus aureus</i> COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 INATIVAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> INOCULADO EM SALMÃO CRU APLICANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 INFLUÊNCIA DA PRESSÃO E DO TEMPO NA INATIVAÇÃO DE <i>S. aureus</i> EM SALMÃO CRU USANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO .....</b>	<b>71</b>
6. CONCLUSÕES .....	76
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
8. PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS .....	79
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de fases P-T para um fluido puro. ....	16
Figura 2: (a) Demonstração gráfica da variação da densidade do CO <sub>2</sub> puro a 35°C. (b) Representação esquemática da variação a partir do equilíbrio gás-líquido ( $T < T_c$ ) para fluido supercrítico ( $T \geq T_c$ ), onde a substância é aquecida até sua temperatura crítica na pressão acima da $P_c$ .....	17
Figura 3 - Diagrama esquemático de como o CO <sub>2</sub> pressurizado pode exercer a sua ação letal sobre bactérias. ....	24
Figura 4: Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado. ....	33
Figura 5: Imagem do Aparato Experimental e célula de equilíbrio.....	35
Figura 6: Filé de salmão adquirido em mercado local. ....	40
Figura 7: Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> para a inativação de <i>S. aureus</i> com dióxido de carbono. ....	46
Figura 8: Inativação de <i>S. aureus</i> em função da pressão.....	49
Figura 9: Cinética de inativação de <i>S. aureus</i> com pressão de 100 bar, 130 bar e 160 bar.....	50
Figura 10: Valores de Log D para a obtenção do parametro Z, para os resultados experimentais. ....	51
Figura 11 A, B e C: Contagem de colônias sobreviventes (Log UFC.g <sup>-1</sup> ) em função do tempo de tratamento à pressão constante de 200 bar (AP) para o tempo de 1 minuto (A), 30 minutos (B) e 60 minutos (C) de contato da amostra com o inóculo (33°C, 100 bar.min <sup>-1</sup> de despressurização). ....	56
Figura 12: Percentual de redução de <i>S. aureus</i> em função do tempo de tratamento e da forma de inoculação da bactéria no salmão. ....	59
Figura 13: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução de <i>Staphylococcus aureus</i> em salmão. ....	62
Figura 14: Diagrama de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> para a variação de atividade de água (Aw) em SC-CO <sub>2</sub> . ....	66

Figura 15: Diagrama de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo $2^3$ para a inativação de <i>S. aureus</i> em SC-CO <sub>2</sub> para os parâmetros de cor em salmão (L, a* e b*).....	68
Figura 16: Diagrama de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo $2^3$ para a inativação de <i>S. aureus</i> em SC-CO <sub>2</sub> para os valores de pH em salmão.....	71
Figura 17: Inativação de <i>Staphylococcus aureus</i> em função da pressão.....	72
Figura 18: Cinética de inativação de <i>Staphylococcus aureus</i> em função do tempo.....	72
Figura 19: Cinética de inativação de <i>S. aureus</i> com pressão de 150 e 225 bar.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e limitações dos métodos de processamento mínimo dos alimentos.....	12
Tabela 2: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial $2^3$ para inativação de <i>S.aureus</i> em matriz líquida.....	38
Tabela 3: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo $2^3$ para inativação de <i>S. aureus</i> em Salmão cru. ....	42
Tabela 4: Matriz do delineamento composto central rotacional $2^3$ (valores reais e codificados) da inativação de <i>S. aureus</i> e as respostas em redução percentual e logarítmica. ....	45
Tabela 5: Evolução da inativação (Nº de sobreviventes e Log) de <i>S. aureus</i> empregando diferentes pressões.....	48
Tabela 6: Valores de D e log de D para as cinéticas de inativação de <i>S. aureus</i> em função da Pressão.....	50
Tabela 7: Cinética de inativação de <i>S. aureus</i> (Log UFC.g <sup>-1</sup> ) em função do inóculo inicial ( $10^3$ , $10^5$ e $10^8$ UFC.g <sup>-1</sup> ), à pressão constante de 200 bar e despressurização de 100 bar.min <sup>-1</sup> . ....	54
Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ (valores codificados e reais) e as respostas do número de sobreviventes e a redução (Log UFC.g <sup>-1</sup> ) de <i>S. aureus</i> utilizando SC-CO <sub>2</sub> . ....	61
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a variável redução de <i>S. aureus</i> do DCCR $2^3$ . ....	62
Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ (valores codificados e reais) e as respostas de Aw, cor e pH das amostras de salmão tratadas com SC-CO <sub>2</sub> . ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APH	Alta pressão hidrostática
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	campos elétricos pulsados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DTA	Doença transmitida por alimento
DCCR	Delineamento central composto rotacional
EFSA	European Food Safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
HUAP	Alta pressão dinâmica
HPP	Processo de alta pressão
LB	Luria Bertani
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MSE	Erro médio quadrático
NSSP	National Shellfish Sanitation Program
NMP	Número mais provável
N	População final de micro-organismos
N <sub>0</sub>	População inicial de micro-organismos
OMS	Organização Mundial da Saúde
P <sub>c</sub>	Pressão crítica
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
SC-CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono a alta pressão
SCF	Fluido supercrítico
Taxa Despr.	Taxa de despressurização
T <sub>c</sub>	Temperatura crítica
TPC	Nível de bactérias totais
UFC	Unidade formadora de colônia
URI	Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

## 1. INTRODUÇÃO

Os fabricantes de produtos alimentares estão enfrentando cada vez mais as rigorosas exigências em matéria de processos de produção. Esta fase é essencialmente provocada pelo interesse crescente dos consumidores por produtos de alta qualidade e "processamento mínimo", bem como por economia de energia e produção em processos mais seguros. Alimentos minimamente processados são obtidos com métodos de segurança alimentar e preservação que são projetados para manter as propriedades naturais e frescor de alimentos. A maioria dos produtos alimentares contém altos níveis de nutrientes ou uma atividade de água alta; portanto, eles são particularmente suscetíveis a deterioração microbiana, que resulta numa deterioração de suas características organolépticas, e pode até apresentar risco a saúde dos indivíduos imunocomprometidos (FERRENTINO e SPILIMBERGO, 2011).

A grande maioria dos chamados “tratamentos tradicionais” de conservação de alimentos cumprem seu papel na conservação com efeitos degenerativos de enzimas e micro-organismos, mas, por outro lado, eles também podem reduzir a qualidade do alimento causando alterações organolépticas e nas características dos produtos alimentares (BERK, 2013).

Neste sentido, torna-se necessário a busca por novas tecnologias a serem utilizadas no processo de conservação dos alimentos já que o consumidor está mais exigente, buscando alimentos com melhor qualidade nutricional e sensorial, maior vida de prateleira e inócuos microbiologicamente (TIRONI et al., 2010).

A tecnologia de dióxido de carbono a alta pressão (SC-CO<sub>2</sub>) aplicada a alimentos ganhou um interesse científico particular, considerando o número de publicações e patentes publicados nas últimas décadas. No trabalho de García-Gonzales et al. (2007) é possível se ter uma ideia do número de patentes depositadas cujo objetivo é a inativação microbiana, estas patentes encontram-se espalhadas pelo mundo e tratam de diversas aplicações do processo como: métodos para aumentar a vida útil de produtos líquidos (ovo líquido e produtos lácteos) de Franz Juchem GmbH da Alemanha; métodos para inativação de enzimas em alimentos da University of Florida dos Estados Unidos e diferentes métodos e aparatos para inativação de enzimas e micro-organismos em líquidos, ou para desodorização de materiais líquidos usando microbolhas de CO<sub>2</sub> em batelada ou em processo contínuo da Shimadzu Corporation and Nippon Tansan Company, Ltd do Japão (GARCIA-GONZALES et al., 2007).

Embora o efeito antimicrobiano do SC-CO<sub>2</sub> tenha sido demonstrado principalmente para produtos alimentares líquidos, alguns trabalhos de pesquisa investigaram a possibilidade de explorar o tratamento em alimentos sólidos. O método de preservação de SC – CO<sub>2</sub> oferece

várias vantagens, pois o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) usado neste processo não é apenas um solvente potente para uma ampla gama de compostos de interesse no processamento de alimentos, mas é relativamente inerte, barato, não tóxico, não inflamável, reciclável e prontamente disponível em alta pureza não deixando nenhum resíduo quando removido após o processo (WILLIAMS E CLIFFORD, 2000). Além disso, é considerado um solvente GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro para Alimentos), que significa que ele pode ser utilizado em produtos alimentares (FERRENTINO et al., 2014).

O dióxido de carbono pressurizado tem sido utilizado como tratamento para a redução ou eliminação de micro-organismos. As pesquisas publicadas estão concentradas na aplicação do dióxido de carbono supercrítico para inativação de cultura pura de micro-organismos. Diferentes bactérias já foram estudadas, incluindo Gram-positivas e Gram-negativas. Perrut, (2012) reuniu as principais publicações sobre este assunto, destacando os gêneros estudados: *Alicyclobacillus*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Legionella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Salmonella* e *Streptococcus*.

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica que não faz parte da flora microbiana normal dos peixes. No entanto, este micro-organismo é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções do mundo sendo um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de origem alimentar, sendo normalmente transmitido aos alimentos por manipuladores (GERMANO E GERMANO, 2015; SANTIAGO et al., 2013).

Com relação aos alimentos sólidos, o processamento a alta pressão tem sido utilizado para a preservação da carne de frango, carne de porco, surimi e salmão, com efeitos positivos consideráveis sobre a atividade de proteases, propriedades de textura, sabor e aroma (YAGIZ et al., 2009, CHOUHAN et al., 2015).

O salmão fresco é um produto de alta qualidade, com considerável importância econômica. Geralmente comercializado embalado a vácuo e armazenado congelado sem tratamento adicional. A vida de prateleira é difícil de estimar devido à falta de critérios padronizados para a determinação do frescor, mas uma vida útil comercial é geralmente limitada para apenas uma semana, quando armazenado entre 2 e 8 °C. A baixa de qualidade se manifesta através de alterações na aparência, odor, cor ou textura. Novas estratégias de preservação que prolongam a vida útil enquanto garantem a segurança microbiana permitiriam a distribuição de salmão fora dos mercados atuais. A segurança do pescado quanto ao padrão microbiológico é de suma importância, visto que as doenças transmitidas por alimentos têm

sempre ocorrido em decorrência da falta de cuidados e controle desde a aquisição da matéria prima até a manipulação e processamento (SOARES e GONÇALVES, 2012).

Neste contexto, a utilização de processos não térmicos em salmão surge como uma alternativa aos tratamentos térmicos convencionais, para melhorar a qualidade microbiológica do produto, preservando as características sensoriais do produto *in natura*, além de promover o aumento da vida útil, facilitando a sua comercialização, manuseio e transporte. A tecnologia supercrítica demonstra ser uma técnica atrativa e de grande utilidade para a sociedade, pois é capaz de atender a expectativa de “segurança alimentar” sem perder características de sabor, sem adição de conservantes e aditivos, sem agredir a natureza nem gerar lixo extra, tem sido apontado como uma opção à utilização de processos de pasteurização de alimentos, principalmente, pelo seu potencial para a inativação de micro-organismos. Como se trata de um processo não térmico, a utilização do dióxido de carbono à alta pressão tem recebido destaque pela preservação do alimento dos efeitos adversos do calor, como alterações físicas, nutricionais e sensoriais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a inativação de *Staphylococcus aureus* em cultura líquida e em salmão cru, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar os parâmetros de pressão, taxa de despressurização e razão entre massa de inóculo e massa de CO<sub>2</sub> na inativação de *Staphylococcus aureus* em cultura líquida;

Determinar os parâmetros de pressão, taxa de despressurização e razão entre massa de inóculo e massa de CO<sub>2</sub> na inativação de *S. aureus* previamente inoculado em salmão cru;

Determinar a cinética de inativação de *S. aureus*, com o emprego de dióxido de carbono supercrítico, na melhor condição de processo em cultura líquida e em salmão cru previamente contaminado;

Avaliar as alterações físicas (Aw, pH e cor) do salmão cru após os tratamentos com CO<sub>2</sub> supercrítico;

Determinar os valores D para a inativação de *S. aureus* em cultura líquida com CO<sub>2</sub> supercrítico e em salmão cru;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Consumo de Salmão e sua importância para saúde pública

A descoberta de que o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, vitamina D e com baixos níveis de colesterol reduz o risco de doenças cardíacas está levando a uma alteração nos hábitos alimentares, fazendo com que os consumidores prefiram as carnes brancas, e contribuindo para aumentar o consumo de peixes como o salmão além de seus derivados. As vitaminas B12 presente em frutos do mar como mexilhões ou ostras estão implicados no alívio do estresse em seres humanos (CAIA, 2013).

O Brasil vem seguindo essa tendência mundial de consumir alimentos mais saudáveis, incluindo, neste caso a carne de pescado. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), os brasileiros ultrapassaram o consumo mínimo de pescado recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) que é de 12 quilos por habitante ao ano. No Brasil, o consumo chega a 14,50 quilos por habitante/ano de acordo com o levantamento feito em 2015. Além dos peixes nacionais, o País tem uma das maiores biodiversidades em pescado do planeta, os brasileiros tradicionalmente apreciam peixes de águas frias, como o bacalhau, da Noruega, e o salmão, proveniente especialmente do Chile, mas também da Argentina e da China.

Aliado ao crescimento do mercado pesqueiro, a partir do ano 2000, o mundo tem presenciado um acelerado processo de globalização dos costumes e hábitos alimentares. Houve uma rápida difusão de alimentos como o sushi e o sashimi, anteriormente consumidos somente em países asiáticos. Esses pratos à base de pescado cru, em pouco tempo tornaram-se sinônimo de “comida saudável”. Locais especializados nesse tipo de culinária são cada vez mais frequentados nas cidades ocidentais. No entanto, já existe uma preocupação dos órgãos ligados à Saúde Pública com o crescente consumo desse tipo de alimento, principalmente, pelo fato de ser um produto altamente perecível, ser consumido “in natura”, resfriado e, principalmente, por necessitar de condições higiênico-sanitárias adequadas para sua preparação e conservação (WILMA E OLIVEIRA, 2012).

Restaurantes especializados em pratos tipo sashimi (que são pedaços finos de músculo de peixe servidos crus) e sushi (sashimi moldado sobre arroz fermentado) são cada vez mais frequentes nas grandes metrópoles ocidentais. O sashimi é uma iguaria da culinária do Japão primariamente consistindo de frutos do mar bem frescos, cortados em fatias finas e servidos crus. O salmão (*Oncorhynchus* spp.) é um peixe da família Salmonidae, muito apreciado pela carne rosada, peculiar aos mares e rios europeus, utilizado também em aquicultura e um dos

pescados mais utilizados como matéria-prima pelos estabelecimentos especializados em culinária japonesa (GARCIA, 2011).

O consumo de peixe cru, sob forma de sushi e sashimi, ocorre em restaurantes de culinária exclusiva japonesa, mas é cada vez mais encontrado em restaurantes comerciais de auto-serviço por quilo ou rodízio. Como estes estabelecimentos não são especializados na culinária oriental, em alguns casos os sushis e sashimis são preparados com os mesmos utensílios e pelos mesmos colaboradores que manipulam os demais alimentos, aumentando o risco de contaminação do pescado cru. Além disso, os estabelecimentos nem sempre oferecem adequadamente o alimento, no que se refere à temperatura, local e tempo de exposição; oferecendo risco à saúde de quem o consome (LEISNER et al., 2014).

Por ser um alimento de fácil decomposição, o pescado exige cuidados especiais, notadamente os relacionados com a conservação pelo frio. Do mesmo modo, está sujeito à contaminação pelos mais variados micro-organismos, adquiridos no ambiente aquático, ou durante as diferentes etapas de captura, transporte (MONTANARI et al., 2015).

### **3.2 O pescado como via de transmissão de agentes patogênicos**

As Doenças Transmitidas por Alimentos - DTA's constituem um grupo de enfermidades, na qual o alimento contaminado é o mais importante veículo do agente patogênico (WELKER et al., 2010).

O peixe pode ser veiculador de uma série de bactérias patogênicas, sendo que a maior parte é fruto da contaminação ambiental. Desta forma, as indústrias de pescado precisam ter cuidados especiais durante todas as etapas do processamento (LIMA, 2012).

Segundo Jay, (2005), a microbiota do pescado reflete a água onde esses animais vivem, visto que os tecidos internos de um peixe sadio são estéreis. A microbiota dos peixes normalmente é encontrada em três lugares: na superfície externa, nas guelras e nos intestinos. Os peixes de água morna tendem a ter a microbiota mais rica em bactérias mesófilas Gram-positivas do que peixes de água fria, os quais têm mais bactérias Gram-negativas.

Este alimento reúne, em seu estado fresco ou refrigerado, características intrínsecas necessárias ao desenvolvimento e sobrevivência de inúmeros patógenos. O pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água (igual ou superior a 0,98), aliados ao seu teor de nutrientes, constituem exemplos destas características (ICMSF, 1980; APHA, 2001).

Devido a sua natureza extremamente perecível, são exigidos cuidados extras com relação a sua manipulação, tanto durante o processo e captura, quanto à estocagem nos barcos

pesqueiros. Logo após a retirada do pescado da água, ocorrem diversos fenômenos naturais que levam a sua deterioração, essas alterações ocorrem independentemente da forma como o pescado é manuseado, mas a velocidade com que elas se instalam, podem ser reduzidas se forem adotadas práticas adequadas de manipulação do produto. Algumas práticas de manuseio recomendadas para aumentar a qualidade do pescado são: evisceração, lavagem, sanitização, resfriamento e acondicionamento sob frio.

Os métodos de captura no qual o pescado é submetido, é outro fator que influencia no quesito qualidade do produto. Se o pescado se debate tentando se libertar das redes de pesca, ou morrem em agonia nos barcos pesqueiros, vão se esgotando suas reservas de energia – glicogênio, ocasionando uma deterioração mais rápida e intensa, portanto quanto mais glicogênio armazenado, maior o tempo de vida útil do produto (GALVÃO e OETTERER, 2014).

As bactérias de maior preocupação em peixes são as formas patogênicas de: *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*. Estes gêneros e espécies mesmo que presentes em baixos níveis, merecem consideração, porque em alguns casos uma dose infectante baixa é suficiente para provocar sérios problemas para a saúde pública. Se o patógeno for psicrotrófico a atenção deve ser redobrada, devido principalmente a sua capacidade de multiplicar-se a baixas temperaturas (MINAMI et al., 2010; FOOD and DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2011)

A maior parte das bactérias patogênicas é destruída por processamentos térmicos e muitas podem ser controladas por práticas adequadas de manipulação e gerenciamento de tempo e temperatura de exposição do produto (JHA et al., 2010).

No caso de iguarias como “sushi” e “sashimi”, preparadas manualmente, além da contaminação do pescado, o contato direto do alimento com as mãos pode levar ao aumento da incidência de patógenos como *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes (JAY, 2005). Segundo Vallandro (2010), preparações muito manipuladas são consideradas de alto risco, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuem treinamento adequado. Além disso, preparações à base de pescado cru oferecem risco ainda maior à saúde pelo fato de não serem submetidos a tratamentos bactericidas como cocção.

A maioria dos surtos de toxinfecção alimentar associados a peixes derivam do consumo de peixe cru ou submetido a tratamento térmico ineficiente (JHA et al., 2010; RALL et al., 2011). Assim, a proporção de surtos nos alimentos envolvendo peixes é significativamente mais

alta no Japão devido ao alto consumo de peixes *in natura* quando comparado a outros países como Canadá e Estados Unidos (SILVA et al., 2008). Em 2008, nos EUA, os peixes foram implicados em 14% dos surtos de toxinfecção alimentares (CDC, 2011). Dados de Portugal mostram que peixes e derivados foram envolvidos em 17,8% dos surtos de doenças causadas por alimentos de origem conhecida no ano de 2007 (VEIGA et al., 2009).

No Brasil, as enfermidades de origem alimentar não são de notificação compulsória, o que compromete a real avaliação do problema. A análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, juntamente com avaliações sanitárias e epidemiológicas, são ferramentas indispensáveis para elucidar a origem e as condições que possibilitaram a veiculação dos micro-organismos (RALL et al., 2011). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde brasileira, entre 2000 e 2015 foram notificados cerca de 10.666 surtos de doenças de origem alimentar. No entanto o agente etiológico e o alimento não foram identificados em 58,1% e 50,5% dos surtos, respectivamente. As informações apontam que o pescado foi a causa de 0,9% dos surtos identificados, sendo ainda que os surtos ocorrem em sua maioria nas residências, sendo registrado 38,7% do total de Doenças Transmitidas por Alimento (DTA) por local de ocorrência (BRASIL, 2011).

### **3.3 *Staphylococcus spp.***

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis, agrupados de forma irregular ou semelhante a cachos de uva, pertencentes à família Micrococcaceae. Anaeróbios facultativos fermentam glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Tradicionalmente, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa divisão está baseada na capacidade de coagular o plasma, considerada uma importante propriedade associada com a patogenicidade. Algumas cepas produzem enterotoxina termoestável, responsável no homem, pelos quadros de intoxicação alimentar (ICMSF, 1980; FDA, 2011; FORSYTHE, 2013; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As bactérias desse gênero são mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, com o ótimo na faixa de 30°C e 37°C, enquanto suas enterotoxinas são produzidas preferentemente entre 40-45°C. Enterotoxinas termorresistentes são produzidas em alimentos que permanecem neste intervalo de temperatura por período superior a quatro horas. O *Staphylococcus aureus* apresenta grande importância em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos (JAY, 2005).

Além de ser um dos mais frequentes causadores de surtos de toxinfecção alimentar, pode muitas vezes dar origem a infecções assintomáticas devido ao seu alto poder colonizador em diferentes regiões do organismo (FDA, 2011; NEWELL et al.; 2010; GERMANO e GERMANO, 2015).

A presença de *S. aureus* no pescado ocorre, predominantemente, através de manipulação. Pessoas que manuseiam o pescado podem carrear a bactéria em suas mãos, cavidade oral e mucosa nasal e, durante o processamento podem contaminar o pescado, sem que este sofra modificações em sua aparência ou sabor. Ainda podem estar presentes no ar, poeira, esgoto, água, e em variadas superfícies e equipamentos que tenham entrado em contato com portadores (GERMANO e GERMANO, 2015).

A intoxicação é provocada pela ingestão do alimento com a toxina pré-formada. No caso de *S. aureus*, são necessárias cerca de  $10^6$  células por grama de alimento para que a toxina seja acumulada em níveis capazes de provocar uma intoxicação. O período de incubação da doença pode variar de 30 minutos até 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (JABLONSKY et al., 1997). Os sintomas variam com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento e quantidade ingerida. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e sudorese, e a recuperação dá-se, na maior parte dos casos, em 24 a 48 horas (BRASIL, 1998; APHA, 2001; SILVA JR, 2008).

A pesquisa de *S. aureus* em alimentos permite avaliar a qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, servindo como indicador de contaminação pós-processo (VIEIRA et al., 2007). A produção de coagulase é uma importante característica utilizada na identificação do *S. aureus*, portanto a legislação brasileira indica a pesquisa de estafilococos coagulase positiva como indicativo de *S. aureus* (BRASIL, 2001; MARTINS, 2006).

### **3.4 Processamento não térmico de alimentos**

A preferência dos consumidores por produtos frescos e com sabor de fresco tem levado ao desenvolvimento de tecnologias de conservação mais brandas. Os produtores de alimentos têm procurado soluções que previnem o crescimento de micro-organismos sem comprometer a qualidade e sabor natural dos produtos.

Novos processos estão sendo avaliados e assim, novas técnicas e produtos vêm aparecendo no mercado. Os processos de conservação que mais chamam a atenção e o interesse,

são aqueles nos quais os produtos são sujeitos a um tratamento físico, ou seja, onde não há adição de nenhum ingrediente conservante, e a temperaturas inferiores aquelas normalmente empregadas na pasteurização. Com isto, a qualidade e o sabor natural dos produtos não são negativamente afetados pelo calor. Ademais, a ausência de aditivos conservantes é de grande importância, segundo as legislações européias e norteamericanas. Essa importância reside no fato de que tanto a EFSA (European Food Safety Authority) quanto a FDA (United States Food and Drug Administration) consideram de formas distintas os processos usando um tratamento físico e os processos nos quais são empregados aditivos. Dentre os processos físicos que estão começando a chamar a atenção dos processadores de alimentos, a tecnologia dos campos elétricos pulsados (CEP), o processamento sob alta pressão, e o ultrassom vem se destacando (PEREIRA e VICENTE, 2010; DEVLIEGHERE et al., 2004).

Em cada método de processamento mínimo, o tratamento destrói micro-organismos e, em alguns casos, enzimas, e não há aumento substancial da temperatura do produto. Há, portanto, poucos danos aos pigmentos, compostos de sabor e vitaminas e, em contraste com os processos usando altas temperaturas, as características sensoriais e nutricionais dos alimentos não são degradadas, pelo menos de forma significativa. Os produtos resultantes possuem maior qualidade e apelo junto aos consumidores, particularmente em mercados onde a conservação das características sensoriais naturais pode significar a aplicação de preços premium (GOULD, 2009; COSTA et al., 2000).

Os campos elétricos pulsados e o processamento sob alta pressão hidrostática tem sido estudados por muitos anos e agora estão na fase inicial de exploração comercial. O ultrassom tem sido utilizado para homogeneizar alimentos e na limpeza das unidades industriais, e agora estão sendo combinados com tratamentos térmicos sob pressão para reduzir a quantidade de calor necessária para a destruição microbiana ou inativação de enzimas. O tratamento sob luz pulsada é um desenvolvimento mais recente, que pode ter um bom potencial no tratamento de superfície de alimentos e materiais de embalagem ou para tratamento de água. As vantagens e limitações dessas tecnologias estão resumidas na Tabela 1, juntamente com exemplos de potenciais produtos que podem se tornar comercialmente importantes (DOONA e FEEHERRY, 2007).

Em todos os alimentos, com processamento mínimo, não é apenas a melhora da qualidade alimentar dos produtos que é importante, mas o processo deve ser capaz de operar em um ambiente de fábrica e em um laboratório com pessoal altamente qualificado; deve assegurar um benefício financeiro para o fabricante e deverá ser suficientemente flexível para

acomodar uma ampla gama de produtos, muitas vezes com séries de produção curta e breve ciclo de vida dos produtos.

Considerando a aplicação industrial, sabe-se que os processos de alta pressão hidrostática e irradiação já estão sendo utilizados para a produção de alimentos comerciais, como por exemplo, sucos, guacamole e presunto. No entanto, um dos desafios da comercialização de novas tecnologias é a necessidade de aprovação junto aos órgãos regulatórios. Nos Estados Unidos, por exemplo, Food and Drug Administration (FDA) já aprovou a alta pressão hidrostática como tecnologia para a conservação de alimentos. Por outro lado, a Nova Zelândia proíbe o uso da irradiação para o processamento de alimentos (DOONA e FEEHERRY, 2007).

Os custos envolvidos na aquisição dos equipamentos e de processamento limitam o uso da tecnologia de alta pressão. Avanços têm sido realizados no desenho e construção desses equipamentos para tornar os custos de processamento mais competitivos em relação à esterilização e ao congelamento. Estima-se que os custos para modificar a linha de processamento já existente e obter o produto sob alta pressão esteja em torno de US\$ 0,0455/libra, considerando-se a depreciação dos equipamentos como sendo de 10 anos (MEYER et al., 2000). Esse custo é similar ao do tratamento de presunto cozido citado por HUGAS et al. (2002) como sendo de 0,1 euros/Kg.

Tabela 1: Vantagens e limitações dos métodos de processamento mínimo dos alimentos.

Processo	Vantagens	Limitações	Aplicações
Campo elétrico pulsado	Elimina células vegetativas; Preservar “flavor”; Sem evidência de toxicidade; Tempo de tratamento curto.	Não afeta enzimas e esporos; Dificuldade de uso com materiais condutivos; Adequado apenas para líquidos; Efetivo apenas em combinação com calor.	Alimentos líquidos; Descongelamento acelerado; Descontaminação de alimentos sensíveis ao calor.
Alta pressão	Elimina células vegetativas; Preservar “flavor”; Sem evidência de toxicidade; Tempo de tratamento curto; Uniformidade de tratamento; Possibilita tratar alimento na embalagem.	Pouco efeito sobre enzimas; Custo alto do equipamento; Tratamento de produto em batelada; Opções limitadas de embalagens.	Pasteurização e esterilização de derivados de frutas, molhos, picles e iogurtes; Carnes e vegetais; Descontaminação de produtos de alto valor e sensíveis ao calor como vitaminas e aromatizantes.
Luz pulsada	Custo médio; Processo rápido; Não provoca mudanças significativas nos alimentos; Adequação para alimentos secos.	Efeito melhor em superfícies; Permite sobrevivência de esporos.	Materiais de embalagem; Produtos cozidos; Frutas e vegetais frescos; Carnes e frutos do mar.
Ultrassom	Eficáz contra células vegetativas, esporos e enzimas; Redução do tempo de processamento e temperaturas; Operação contínua ou em batelada.	Modo de ação completo; Eventuais danos causados por radicais livres; Modificação indesejável da textura dos alimentos Precisa ser associado com outro processo (aquecimento).	Qualquer alimento que possa ser aquecido).
Campo magnético	Eficaz contra células vegetativas; Preserva “flavor”; Baixo custo do equipamento	Sem efeito sobre esporos ou enzimas; Pouco penetrativo em materiais condutivos;	Pasteurização de alimentos;
Sistema fotodinâmico	Baixo custo; Não requer aditivos; Pode ser incorporado em embalagens ou utilizado como um processo de fábrica.	Provoca oxidação em alimentos sensíveis; Alguma resistência bacteriana.	Embalagens ativas; Descontaminação em processo de lavagem; Tratamento de água.
Radiação gama	Excelente penetração nos alimentos; Adequado para esterilização; Confiável; Adequado para uso em larga escala.	Alto custo Risco localizado de radiação Alterações no alimento por oxidação.	Frutas e vegetais; Ervas e especiarias; Embalagens; Carne e peixes.

Fonte: GOULD, 1995 com adaptações

### 3.5. Processamentos a alta pressão

O tratamento a altas pressões foi reconhecido como uma técnica de preservação em potencial há aproximadamente um século atrás, com trabalhos realizados na década de 1890 por Hite (PATTERSON, 2014). Primeiramente, o processo à alta pressão hidrostática foi utilizado com sucesso para melhorar a qualidade do leite e também para demonstrar a suscetibilidade de micro-organismos presentes em frutas (JAY, 2005). Desde então, o processamento por altas pressões em alimentos tem sido extensamente estudado durante o último século.

Em 1899, Hite desenvolveu um equipamento capaz de produzir pressões da ordem de 100.000 psi (em torno de 6800 Bar) submetendo vários alimentos e bebidas. Em 1914, Bridgam fez a primeira observação sistemática do efeito da pressão em proteína. Ele observou que a aparência da albumina do ovo submetida a 7500 bar (~750 MPa) era semelhante ao seu cozimento a 100°C, e que o efeito era irreversível. Isto levou a uma excepcional contribuição para a influência da pressão em biomoléculas nos últimos 50 anos, incluindo aí os alimentos (PATTERSON et al., 2007).

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 (PEREIRA e VICENTE, 2010).

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

Para compreender os efeitos da alta pressão sobre os componentes alimentares é necessário conhecer seus princípios básicos como o isostático, ou seja, a pressão é transmitida de maneira uniforme e instantânea por todo o alimento, independente da sua forma ou tamanho. O princípio de “Le Chatelier”, de acordo com o qual todo e qualquer fenômeno (transição de fase, mudança na configuração molecular, reação química) acompanhado de decréscimo de

volume é incrementado pela alta pressão e, se acompanhado de aumento de volume é dificultado pela alta pressão (HEREMANS, 2002).

Ainda de acordo com Heremans (2002), uma das principais vantagens da utilização da alta pressão para o processamento de alimentos é o não rompimento das ligações químicas covalentes, as quais apresentam pequena compressibilidade, devido à mínima distância entre os átomos envolvidos na ligação, resultando na preservação dos principais compostos responsáveis pelo aroma, sabor e valor nutritivo, conservando a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos.

Existem dois métodos utilizados para o processamento de alimentos por alta pressão: o método de alta pressão hidrostática (APH), no qual o produto é processado já dentro da embalagem final e o método de homogeneização a ultra alta pressão ou alta pressão dinâmica (HUAP), onde o produto é processado de forma contínua e depois embalado de forma asséptica (PATTERSON, 2014).

A aplicação do processo de alta pressão hidrostática (APH) tem como princípio fundamental a habilidade em romper as ligações secundárias e terciárias das moléculas enquanto as ligações covalentes não são afetadas, proporcionando maior retenção das características sensoriais e nutricionais do produto (HEINZ e BUCKOW, 2010).

O processo de alta pressão hidrostática consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um recipiente pressurizado, utilizando um meio que transfere pressão ao produto. Em sistemas comerciais, as pressões utilizadas enquadram-se na faixa de 4000 a 7000 Bar. Na pressurização realizada em espaço confinado, emprega-se fluido (que no caso da alta pressão hidrostática é a água) que atua como meio de transferência da pressão. A pressão é aplicada de igual modo em todas as direções, o que permite aos sólidos a retenção de seu formato original (HEINZ e BUCKOW, 2010).

A utilização do método de homogeneização a ultra alta pressão ou alta pressão dinâmica (HUAP) vem se desenvolvendo consideravelmente desde a década de 2000. Este processo baseia-se no mesmo princípio dos homogeneizadores tradicionais, mas operam em níveis de pressão muito mais altos. O desenvolvimento deste processo permitiu a utilização do mesmo como método de preservação, uma vez que causa inativação microbiana. Inicialmente desenvolvido para a indústria de laticínios, o processo passou a ser aplicado também pela indústria farmacêutica, química e biotecnológica para dispersar, misturar e processar emulsões e suspensões (DIELS et al., 2005).

Em termos gerais, durante o processo de homogeneização em alta pressão (HUAP), o fluido é forçado a passar através de uma abertura estreita existente na válvula do homogeneizador, onde ele é submetido a uma rápida aceleração, como consequência, fenômenos como cavitação e turbulência são simultaneamente induzidos o que conduz a um aumento de temperatura instantânea cuja magnitude depende da intensidade da pressão (PANOZZO et al., 2014).

### **3.6 Processamento a alta pressão utilizando dióxido de carbono**

O uso de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) (pressões acima de 73 bar, e temperaturas acima de 32°C) é considerado um tratamento não térmico promissor. Dados publicados demonstraram que esta tecnologia pode efetivamente inativar micro-organismos e enzimas não só em meio de cultura, mas também em alimentos líquidos, frutas frescas, vegetais e carnes (ZHAO et al. 2012). Quando comparado ao uso em líquidos, a aplicação de SC-CO<sub>2</sub> para alimentos sólidos tem sido menos estudada e, devido à complexidade da matriz, acredita-se que pode tornar a ação bactericida do CO<sub>2</sub> mais difícil aliado à falta de informações sobre o mecanismo de inativação (FERRENTINO e SPILIMBERGO, 2011). No entanto, estudos realizados até agora propõem que o CO<sub>2</sub> atue em contato com a membrana celular e provoque consequentes modificações físico-químicas como o passo fundamental do processo (FERRENTINO et al., 2013A).

Dados recentes indicam que a maior parte da investigação foi focada em suspensões de culturas puras de diferentes micro-organismos inoculados ou que ocorrem naturalmente em produtos alimentares líquidos (por exemplo, sumos de fruta, cerveja, vinho e leite) que afetam o alimento causando deterioração e trazem maior preocupação com a saúde (ARREOLA et al., 1991; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006). O método parece ser muito promissor porque o SC – CO<sub>2</sub> é capaz de eliminar bactérias, leveduras e fungos, a pressão moderada e baixa temperatura preservando mais atributos de qualidade dos produtos do que os tratamentos tradicionais (FERRENTINO et al., 2009; SPILIMBERGO e CIOLA, 2010).

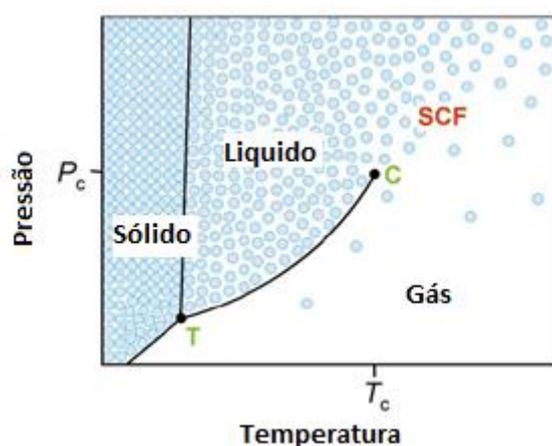
O processamento com SC – CO<sub>2</sub> envolve o contato dos alimentos com um fluido supercrítico (ou pressurizado), durante um determinado tempo, podendo ser de forma contínua ou semi-contínua (ZHANG et al., 2006).

Um fluido supercrítico pode ser definido como uma substância na qual sua temperatura e pressão estão acima dos valores críticos (Figura 1). Darr e Poliakoff (1999), definem que “um fluido supercrítico (SCF) é qualquer substância, onde a temperatura e a pressão são maior do

que os seus valores críticos”. Contudo, esta definição não é de grande valor porque poucos químicos considerariam gás  $H_2$  ( $T_c = 33K/-240.1500^\circ C$  e  $P_c = 1.23Mpa/ 12,3 \text{ bar}$ ) como sendo "supercrítico" à temperatura ambiente e pressão de 12,3 bar, porque sua densidade sob estas condições é muito abaixo do seu valor crítico ( $\rho_c = 0,03 \text{ g/mL}$ ). Assim, quando apresentar valores muito inferior à sua densidade crítica, um fluido deixa de exibir as propriedades não ideais tipicamente associado com as de fluidos supercríticos. Estas propriedades, às vezes denominadas "híbrido entre um líquido e um gás", incluem a capacidade para se dissolver os sólidos, com a miscibilidade de gases permanentes, de alta difusividade, baixa viscosidade, etc. Próximo da densidade crítica, fluidos supercríticos apresentam propriedades que estão muitas vezes entre aquelas de um líquido e um gás. Por exemplo, um fluido supercrítico pode ser relativamente denso e dissolver certos sólidos, exibindo alta difusividade e baixa viscosidade. Ainda, fluidos supercríticos são altamente compressíveis e a densidade pode ser alterada sobre uma vasta faixa de pressão e temperatura (Figura 2a). Esta propriedade pode ser explorada, por exemplo, na separação de produtos reacionais ou no fracionamento de polímeros. Dentre os fluidos supercríticos, o dióxido de carbono tem sido amplamente usado, uma vez que sua utilização pode acarretar em alguns benefícios reais, como, a redução da utilização de solventes orgânicos tóxicos e a facilidade da separação do solvente (DARR e POLIAKOFF, 1999).

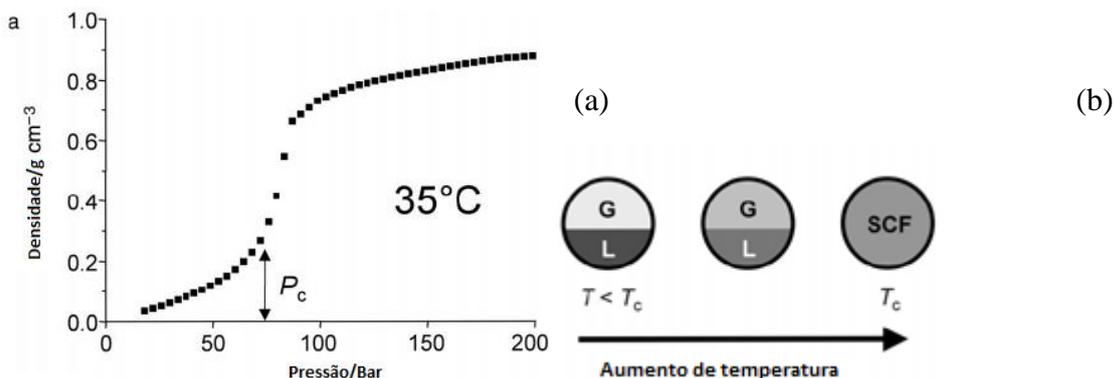
Quando um líquido é aquecido acima de sua temperatura crítica a uma pressão que exceda sua pressão crítica, a transição de líquido para fluido supercrítico é contínua (Figura 2b).

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



Fonte: Cooper, (2000).

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



Fonte: Cooper, (2000).

Entretanto, sob condições apropriadas (logo abaixo da temperatura e pressão crítica), o dióxido de carbono líquido apresenta propriedades semelhantes às dos fluidos supercríticos (baixa viscosidade e densidade). Como consequência, o CO<sub>2</sub> líquido próximo de sua condição crítica demonstra um grau de compressibilidade limitado e suas propriedades podem ser “ajustadas” em função da pressão. Uma vantagem prática de se trabalhar com CO<sub>2</sub> líquido é que densidades relativamente altas podem ser encontradas em pressões moderadas, por exemplo, a densidade do CO<sub>2</sub> líquido a 20°C é de 818,74 Kg/m<sup>3</sup> em pressões acima de 75 bar.

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) e Clifford e Williams, (2000):

- ✓ 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.

Segundo Choi et al. (2008), a tecnologia utilizando fluido supercrítico explora o poder solvente e propriedades físicas de um composto puro ou misturado a temperaturas e pressões perto do ponto crítico na fase de equilíbrio.

Erkmen (2000), avaliando a inativação microbiana com dióxido de carbono a 61 bar e tempo de 150 min, conseguiu reduzir 5 log a contagem de *Brochothrix thermosphacta* em carne.

A técnica de esterilização usando CO<sub>2</sub> supercrítico mostrou ser eficiente, uma vez que após o tratamento durante 15 min, operando a uma pressão de 150 bar, levou a mesma redução microbiana obtida no tratamento com pressão hidrostática de 3000 bar na mesma temperatura. Até o momento, foi demonstrado que o método garante uma inativação microbiana total de muitas espécies de bactérias, principalmente suspensa em soluções simples (SPILIMBERGO, et al., 2002).

Na literatura diversos autores, Diels e Michiels (2006), Haas et al. (1989), Wei et al. (1991), Lin et al. (1992), Nakamura et al. (1994), Enomoto et al. (1997), Debs-Louka et al. (1999), Hong e Pyun (1999), citaram que o dióxido de carbono é o fluido de escolha viável para reduzir à carga microbiana no processamento a alta pressão e que poucos pesquisadores aplicaram outros gases pressurizados para este processo sendo que o gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) foi um dos gases mais estudados.

### **3.7 Aplicação do tratamento a alta pressão em alimentos**

O processo utilizando dióxido de carbono pressurizado tem sido aplicado, na sua maioria, em alimentos líquidos, particularmente, em suco de frutas. Park, et al. (2002) avaliaram o efeito do CO<sub>2</sub> pressurizado na qualidade de suco de cenoura. O tratamento foi realizado nas seguintes condições de pressão e tempo: 9,8; 29,4 e 49 bar por 10 minutos. O processo possibilitou a redução do pH, sendo que na pressão de 49 bar, o pH diminuiu de 6,5 para 4,4. A contagem de micro-organismos aeróbios também foi afetada pelo tratamento, sendo que, a redução na contagem inicial foi maior, com o aumento da pressão; na condição de 49 bar, foi

obtida uma redução de 4 ciclos logarítmicos. Em relação ao efeito na atividade enzimática, nenhuma das condições avaliadas foi suficiente para a total inativação da polifenol-oxidase, responsável pelo escurecimento enzimático, no suco. A utilização da pressão de 49 bar possibilitou uma redução de 70% na atividade enzimática da lisil-oxidase, esta enzima destrói os ácidos graxos essenciais, produzindo compostos que alteram o sabor do suco (*off flavor*). Os autores também avaliaram o efeito combinado de CO<sub>2</sub> pressurizado e o tratamento a alta pressão hidrostática. Quando combinados, os processamentos possibilitaram uma inativação total da carga de micro-organismos aeróbios. E ainda, o suco não apresentou diferença significativa na sua cor. Em relação à atividade enzimática, a combinação dos processos possibilitou a obtenção de um suco com atividade enzimática residual de 20%.

O efeito do processamento de suco de laranja com CO<sub>2</sub> pressurizado foi avaliado por Kincal et al. (2005). O processo permitiu a redução de 5 ciclos logarítmicos da carga de micro-organismos deteriorantes do suco e das bactérias patogênicas *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.

Damar e Balaban (2006) avaliaram o efeito do CO<sub>2</sub> pressurizado nas características microbiológicas, sensoriais e físico-químicas de água de coco. A melhor condição para a inativação microbiana foi obtida com os seguintes parâmetros de processo: 13% CO<sub>2</sub>, 25°C, 345 bar por 6 minutos. Os autores concluíram que é possível obter um produto (água de coco) com uma vida útil superior a nove semanas (armazenado à 4°C), apresentando características sensoriais próximas ao do produto *in natura*.

Amostras de pimenta-do-reino em pó, inoculadas com aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de esporos de *Bacillus cereus*, foram submetidas ao tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico de 350 bar, a 40°C, durante 30, 45 e 60 minutos. Nenhuma das condições avaliadas foi suficiente para alterar a população de *B. cereus* inoculada na pimenta-do-reino. Os autores indicam que a ausência de efetividade do tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico pode estar relacionada com a baixa atividade de água da pimenta-do-reino. O efeito da pressão e, principalmente, do CO<sub>2</sub> supercrítico são aumentados na presença de água. A água é necessária para a dissolução do CO<sub>2</sub> para formar o ácido carbônico, que diminui o pH que, por sua vez, age sobre o micro-organismo, eliminando-o (FROEHLICH et al., 2009). A temperatura influencia a inativação de esporos no processamento com CO<sub>2</sub> supercrítico, temperaturas maiores (na faixa de 50 à 60°C) estimulam a difusividade do CO<sub>2</sub> e podem também aumentar a fluidez da membrana, facilitando a penetração do CO<sub>2</sub>; conseqüentemente, diminuindo a taxa de sobrevivência de esporos bacterianos (ENOMOTO et al., 1997).

Choi et al. (2009) avaliaram o efeito do CO<sub>2</sub> supercrítico no processamento de molho de soja, molho de pimenta e em produto suíno marinado, para a inativação de *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, e *E. coli* O157:H7, nas condições: 100, 120 e 140 bar, 40 e 45°C, por 20, 30 e 40 min. O tratamento foi mais efetivo na destruição dos micro-organismos patogênicos nas amostras de molhos quando comparados com o produto suíno marinado. Na condição de 140 bar, 45°C e 40 minutos possibilitou uma redução maior no molho de soja (2,52–3,47 log UFC/cm<sup>2</sup>) do que no molho de pimenta (2,12–2,72 log UFC/cm<sup>2</sup>). Nesta mesma condição, a redução de *L. monocytogenes* na carne suína marinada com molho de soja e com molho de pimenta foi de 2,49 e 1,92 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Suco de maçã foi submetido ao tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado, nas condições: 35, 50 e 60°C, a 7, 13 e 160 bar, por 40, 80 e 150 minutos, para avaliação do efeito no pH, °Brix, cor e na carga microbiana. A redução de cinco ciclos logarítmicos foi obtida na condição de 160 bar, 60°C e 40 minutos. Os resultados obtidos indicam que a temperatura exerce papel importante no processo com utilização de CO<sub>2</sub> pressurizado, sendo que a inativação foi maior quando a temperatura aumentou de 35 para 60°C. Por outro lado, as faixas de pressão utilizadas não apresentaram influência na inativação microbiana.

Ao avaliar o efeito de ciclos de pressurização e despressurização em suco de Grapefruit os autores obtiveram a redução de cinco ciclos logarítmicos, quando aplicados seis ciclos, a 130 bar, 35°C por 10 minutos (FERRENTINO et al., 2009).

Fabroni et al. (2010), submetem suco de laranja a três diferentes condições de processo com CO<sub>2</sub> pressurizado. Os resultados com o processamento do suco na condição 130 bar, na razão mássica de 0,385g CO<sub>2</sub>/g suco, por 15 minutos, permitiu a obtenção de um produto com prazo de validade de 20 dias, armazenado em refrigeração. Sendo que, as propriedades nutricionais e antioxidantes do produto foram praticamente inalteradas durante esse período.

Valverde et al. (2010) utilizaram pêssegos *in natura* fatiadas, como um exemplo de alimento pronto para o consumo, para ser tratado com CO<sub>2</sub> pressurizado. Experimentos foram realizados com um fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> em diferentes pressões (60 à 300 bar), temperaturas (25 à 55°C) e tempos de exposição (10 à 90 minutos) para avaliar a inativação de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos com CO<sub>2</sub> pressurizado foram mais eficientes quando comparados aos tratamentos com calor, realizados nas mesmas condições de temperatura e tempo. A inativação total da levedura (5 ciclos logarítmicos) foi obtida na temperatura de 55°C, na utilização de CO<sub>2</sub> pressurizado, e 70°C, nos experimentos envolvendo apenas calor. O pH e o °Brix da fruta não foram afetados pelo tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado. Por outro lado, os autores relataram

perda de firmeza e o escurecimento das frutas. Houve apenas uma redução parcial da atividade da peroxidase. A adição de um antioxidante não foi eficiente para evitar o escurecimento das frutas.

Li et al. (2012), estudaram o efeito individual e combinado de CO<sub>2</sub> pressurizado, aquecimento brando e adição de nisina na inativação dos micro-organismos naturalmente presentes no suco de lichia. As amostras foram submetidas a pressão de 100 bar e temperaturas de 32, 42 e 52°C por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Os resultados indicaram que a temperatura é parâmetro importante para a inativação das bactérias aeróbias e de bolores e leveduras. A redução de 4,19 ciclos logarítmicos foi obtida pela combinação de CO<sub>2</sub> pressurizado e aquecimento à temperatura de 52°C, por 15 minutos. Sendo que, a inativação das bactérias aeróbias foi total com a combinação de CO<sub>2</sub> pressurizado, aquecimento brando e adição de nisina.

Casas et al. (2012) avaliaram o efeito do processo com CO<sub>2</sub> pressurizado na inativação do micro-organismo formador de esporos, *A. acidorrestris*, em creme de maçã. Os resultados indicaram uma redução de 4 ciclos logarítmicos da carga inicial dos micro-organismos, nas condições de processo à 30°C e 100 bar. Os autores relataram uma pequena perda na quantidade de vitamina C, porém, o processo não alterou as principais características sensoriais e reológicas do produto processado.

Galvanin et al. (2014), verificou a inativação por CO<sub>2</sub> pressurizado em três matrizes sólidas distintas: corte fresco de cenoura (*Daucus carota*) enriquecida com *E. coli*, superfície de presunto cru enriquecida com *Listeria monocytogenes* e corte de coco fresco (*Cocos nucifera*) enriquecida com *Salmonella enterica*. Para as cenouras ocorreu inativação de *E. coli* a níveis indetectáveis em 7 e 10 min de tratamento com a pressão de 100 e 120 bar e a 26 e 35° C, respectivamente. Para o presunto cru a inativação *L. monocytogenes* foi alcançada com pressão de 80 bar, 50° C por 60 minutos. Porém para os cortes de coco fresco os resultados mostraram que foram necessárias condições extremas de processo (120 bar, 40° C, 60 min) para induzir 3.5 redução Log. Além disso, um aumento de temperatura de 50°C não aumentou significativamente a taxa de inativação, provavelmente devido a alta resistência da *S. enterica* a permeação do CO<sub>2</sub>.

Ainda é limitado o número de publicações sobre a aplicação do CO<sub>2</sub> pressurizado - SC - CO<sub>2</sub> em alimentos sólidos. Comparado com os sistemas alimentares líquidos, a aplicação de CO<sub>2</sub> pressurizado em alimentos sólidos é mais difícil no que diz respeito à segurança microbiana, atributos de qualidade, físicos e nutricionais.

Geralmente, é necessário um tempo de tratamento mais longo para atingir substancial inativação microbiana, como resultado de (i) interações entre os ingredientes dos alimentos e fatores intrínsecos, e (ii) a difusão de CO<sub>2</sub> mais limitada em matrizes sólidas e células, uma vez que a amostra não pode ser agitada. Conseqüentemente, a probabilidade de que propriedades sensoriais poderiam ser afetadas negativamente é aumentada.

### **3.8 Aplicação do tratamento a alta pressão em pescados**

A primeira tentativa de aplicar o tratamento de SC – CO<sub>2</sub> para a preservação de pescados foi realizada por Wei et al. (1991). Neste estudo, amostras de camarão inoculado com *Listeria* foram tratados por SC – CO<sub>2</sub> a 58,5 bar, 35° C durante 2h, os resultados demonstraram que o tratamento reduziu as contagens bacterianas apenas 35 e 45%, mas o aumento da pressão para 137 bar conseguiu uma redução microbiana igual a 99%.

Observações de qualidade das amostras de camarão tratados por Wei et al. (1991) mostraram algumas mudanças de cor após o tratamento de SC – CO<sub>2</sub> realizado a 137 bar, 35 °C durante 2 h, os autores relataram que a camada externa dos camarões ficaram esbranquiçada e a aparência de ter sido preparados rapidamente a baixa temperatura ou embebida em ácido. Houve também perda de pequena quantidade de líquido dando a idéia de algum tecido danificado causado pelo tratamento.

Para observar os efeitos do CO<sub>2</sub> como técnica de pasteurização não térmica, os experimentos foram realizados *in vitro* em cultura de bactérias de estirpe não patogênica de *Vibrio* utilizado como um modelo para *Vibrio* spp. e várias bactérias isoladas a partir de um homogeneizado de ostras. Os autores relataram que o nível de inativação bacteriana total foi obtido com o tratamento de SC – CO<sub>2</sub> (100 bar durante 30 min a 37°C ou a 172 bar durante 60 min a 60° C), foi comparável ao alcançado com vários métodos de processamentos pós-colheita aprovado pelo FDA para ostras, de alta pressão hidrostática e ultracongelados (PRAPAIWONG et al., 2009).

Mais recentemente, uma abordagem inovadora para processamento pós-colheita de ostra foi introduzida incidindo sobre os efeitos do dióxido de carbono supercrítico em contaminantes bacterianos preso no sistema digestivo de ostras. Meujo et al. (2010), ao estudarem o efeito do CO<sub>2</sub> supercrítico na inativação microbiana de ostras inteiras, obtiveram 2 reduções logarítmicas e 3 reduções logarítmicas na contagem de micro-organismos aeróbios, nas condições 100 bar e 37°C por 30 minutos e 172 bar e 60°C por 60 minutos, respectivamente. Inclusive, o desprendimento dos músculos adutores da concha foi observado em ostras tratadas

a 172 bar e 60°C durante 60 minutos, o que não foi o caso para as ostras tratadas a 100 bar e 37°C durante 30 minutos. A análise sensorial indicou que não houve diferença significativa na aparência, odor e textura das ostras *in natura* e ostras tratadas. E ainda, os autores avaliaram a inativação de *Vibrio fisheri* e obtiveram a redução de seis ciclos logarítmicos.

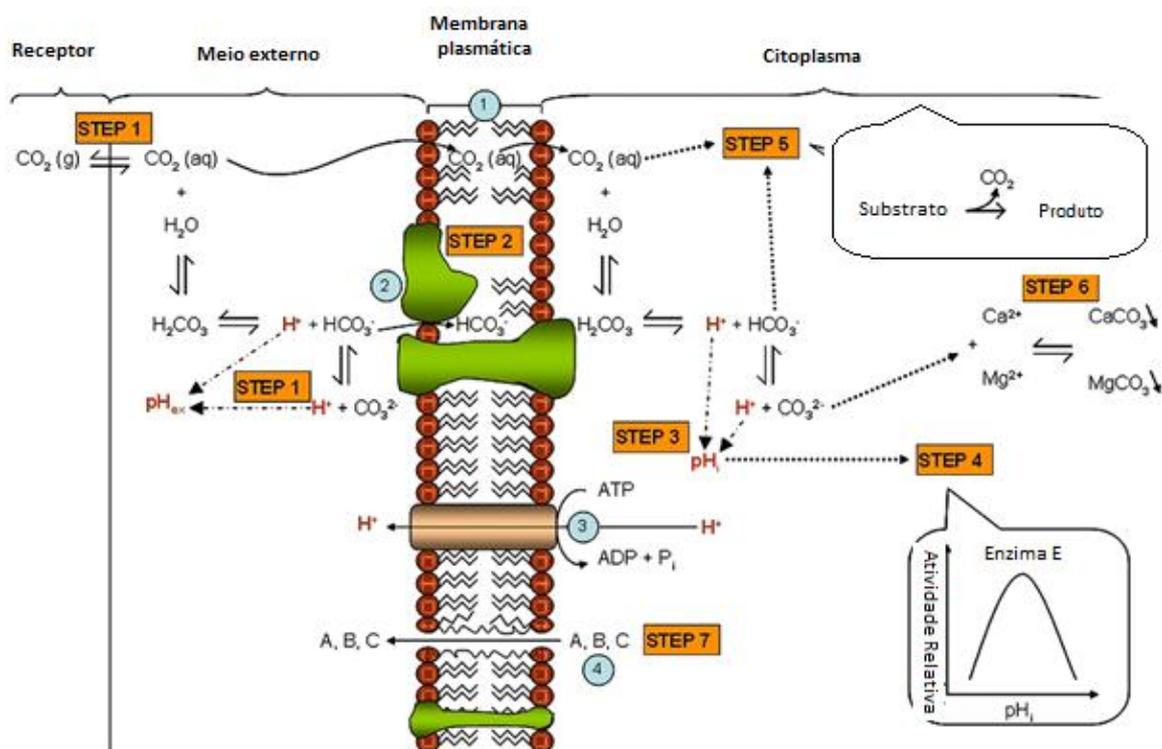
As ostras tratadas foram comparadas com dois padrões: uma recém retirada da concha e uma ostra deixada à temperatura ambiente durante cerca de dois dias para desenvolver um odor suave associado com ostras estragadas. A análise sensorial revelou que as ostras mantiveram aspecto aceitável considerando-se a sua aparência física, textura e cheiro depois da exposição ao processo de CO<sub>2</sub> (100 e 200 Bar para 20 e 50 min a 37°C) (MEUJO et al., 2010).

### **3.9 Mecanismos de Inativação de micro-organismos usando dióxido de carbono pressurizado**

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

A Figura 3 ilustra esquematicamente como o CO<sub>2</sub> pressurizado pode exercer sua ação letal sobre as bactérias. As diferentes etapas deste mecanismo de inativação de forma simplificada e hipotética podem ser resumidas como segue: (1) solubilização de CO<sub>2</sub> pressurizado na fase líquida externa, (2) modificação da membrana celular, (3) redução do pH intracelular (pHi), (4) inativação da enzima chave/inibição do metabolismo celular devido à redução do pHi, (5) efeito inibitório direto do CO<sub>2</sub> molecular e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre o metabolismo, (6) transtorno do equilíbrio eletrolítico intracelular, e (7) remoção dos componentes vitais a partir de células e membranas celulares. Deve-se notar, no entanto, que a maioria destes passos não irá ocorrer consecutivamente, mas simultaneamente de uma forma complexa e inter-relacionada.

Figura 3 - Diagrama esquemático de como o CO<sub>2</sub> pressurizado pode exercer a sua ação letal sobre bactérias.



Fonte: Garcia-Gonzalez et al., (2007).

Segundo Garcia-Gonzalez et al. (2007), 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 (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), o qual se dissocia em bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e hidrogênio (H<sup>+</sup>) 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 os lados. 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  $\text{HCO}_3^-$  no metabolismo molecular: 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 se aplica pressão e acumula-se dióxido de carbono no interior do citoplasma das células bacterianas. Este fato pode converter o  $\text{HCO}_3^-$  para  $\text{CO}_3^{2-}$ , 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 (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007) também sugeriram que o CO<sub>2</sub> acumulado pode ser devido ao seu poder de solvência relativamente alto e "extração" de constituintes vitais das células ou das membranas celulares. Neste mecanismo, sob pressão, o CO<sub>2</sub> penetra primeiro 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 Choi et al. (2008), o dióxido de carbono supercrítico é facilmente absorvido pela carne (por exemplo) e pode diminuir o pH. Quando a amostra (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 (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 por explosão 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.

### **Efeito de parâmetros físicos e microbiológicos na Inativação de Células vegetativas**

- Efeitos da pressão e temperatura: Estes parâmetros afetam a inativação microbiana em sua maioria por dominar o efeito sobre as características de transferência de massa de CO<sub>2</sub> e as atividades biológicas das células microbianas. Em geral, a inativação microbiana é acelerada com o aumento pressões de CO<sub>2</sub>. Como consequência, a pressões mais

elevadas, é necessário menor tempo de exposição para inativar o mesmo nível de células microbianas (LIN et al., 1993, LIN et al., 1994, HONG e PYUN, 1999). A pressão controla a taxa de solubilização de CO<sub>2</sub> e a sua solubilidade total num meio de suspensão. Portanto, uma pressão mais elevada aumenta a solubilização de CO<sub>2</sub> para facilitar tanto a acidificação do meio externo, como o seu contato com as células. Além disso, o CO<sub>2</sub> com pressões mais elevadas, em geral, exibe um poder de diluição superior. A inativação microbiana é também sensível à aplicação da temperatura. Em geral, a taxa de inativação aumenta com aumento da temperatura (em igualdade de condições). Temperaturas mais altas estimulam a difusividade do CO<sub>2</sub>, e pode também aumentar a fluidez da membrana celular para realizar a penetração mais facilmente (LIN et al., 1993; HONG e PYUN, 1999). No entanto, o tratamento de SC – CO<sub>2</sub> não deve ser operado a temperaturas muito acima da sua temperatura crítica (certamente, na vizinhança da pressão crítica de CO<sub>2</sub>), porque dentro desta região, sua densidade e sua capacidade de solubilização diminui muito rapidamente conforme a temperatura aumenta. Assim, a temperatura tem efeito estimulante na penetração de CO<sub>2</sub> podendo ser parcialmente contrabalançada por ter efeito inibidor sobre a solubilidade de CO<sub>2</sub>. Tratamentos com SC – CO<sub>2</sub> não devem ser realizados a temperaturas muito elevadas, porque eles podem deteriorar a qualidade dos alimentos em muitas aplicações.

- Efeito do estado físico do CO<sub>2</sub>: Dependendo da temperatura e da pressão, tratamentos com SC – CO<sub>2</sub> podem ser realizados tanto no estado subcrítico (líquido ou gasoso) como no estado supercrítico. Estudos comprovaram que o CO<sub>2</sub> supercrítico é mais eficaz na inativação de células microbianas que o CO<sub>2</sub> em condições subcríticas. A letalidade microbiana é aumentada com CO<sub>2</sub> supercrítico podendo ser atribuído às suas propriedades físico-químicas interessantes, que estão entre aqueles de líquidos e gases. O CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta maior densidade como líquido, enquanto propriedades de transporte de massa (isto é, viscosidade e difusividade) são mais próxima de um gás. A densidade semelhante a líquido permite uma maior solvatação (e, conseqüentemente, maior extração) de energia em comparação com o estado gasoso. Por outro lado, a massa de gás tem propriedade semelhante de transporte com melhor taxa de difusão quando comparado com o estado líquido. Além disso, a tensão superficial muito baixa do CO<sub>2</sub> supercrítico permite a penetração fácil em materiais microporosos. Assim, CO<sub>2</sub> supercrítico com essas propriedades melhoradas podem ser mais eficazes do que o CO<sub>2</sub> gasoso e líquido a penetrar em células e extrair componentes intracelulares o que resulta em um aumento da perturbação dos sistemas biológicos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

- Efeito da agitação: A agitação pode aumentar a solubilização do CO<sub>2</sub> e seu contato com células bacterianas, tornando a penetração celular mais fácil. Portanto, apropriada agitação geralmente melhora a inativação microbiana por SC – CO<sub>2</sub>. Diversos autores (LIN et al., 1992, LIN et al., 1993, LIN et al., 1994; DILLOW et al., 1999), têm relatado a importância da agitação adequada, mas não há dados específicos. Tsuji et al. (2005) observaram taxas de redução mais elevadas com o aumento da velocidade de rotação. Sem agitação, Lin et al. (1992) relataram uma significativa diminuição das taxas de inativação de células de levedura.

- Efeito do conteúdo de água: Inativação microbiana depende fortemente do teor de água (ou a atividade da água) do meio no qual as células são suspensas durante o tratamento SC – CO<sub>2</sub>. Experimentos com diferentes teores de água demonstraram que as células vegetativas com baixo conteúdo de água foram mal inativadas, e que a sua resistência à inativação aumentou com a diminuição do teor de água. Além disso, Haas et al. (1989) sugeriram que o tratamento a SC – CO<sub>2</sub> não seria aplicável a substâncias secas.

A razão pela qual as células microbianas molhadas são mais propensas a inativação por SC – CO<sub>2</sub> é provavelmente o resultado direto de um aumento de solubilidade do CO<sub>2</sub> e, por conseguinte, um aumento da formação e de dissociação (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que libera mais íons H<sup>+</sup> que, posteriormente, reduz o pH<sub>ex</sub> do meio de suspensão para valores mais baixos. Além disso, Lin et al. (1993) também atribuíram o efeito sinérgico de água para as paredes celulares e membranas inchadas, devido à presença de água, pelo que estas barreiras biológicas são expandidas para se tornar mais penetrável pelo CO<sub>2</sub>.

- Efeito da taxa de despressurização: Acredita-se que as células microbianas sejam rompidas por meio da ação de explosão durante a descompressão. Esta descompressão explosiva (ou flash) consiste de uma fase de pressurização para induzir a primeira penetração do CO<sub>2</sub> gasoso aplicado nas células microbianas, seguido por um flash posterior com liberação repentina da pressão aplicada com CO<sub>2</sub> a partir do meio de suspensão que resulta na expansão rápida de gás no interior das células. Com este sistema, a maior parte das células microbianas são rompidas mecanicamente como um "estouro de balão" no momento da despressurização do flash, devido à diferença de pressão entre o interior o exterior desequilibrado das células bacterianas.

- Suscetibilidade dos micro-organismos: A sensibilidade microbiana ao tratamento SC – CO<sub>2</sub> varia grandemente entre as espécies. No entanto, as comparações são difíceis de fazer porque há diversas interferências como o tipo de equipamento, o tratamento,

estirpes, as condições de teste, etc. Portanto, somente estirpes diferentes dentro de um estudo podem ser comparadas. Em geral, micro-organismos gram-positivos são mais resistentes do que as gram-negativas devido a composição de sua da parede celular (mais grossa), embora exista muitas vezes inúmeras exceções, mesmo dentro do mesmo estudo.

- Efeito da concentração inicial de bactérias na eficiência do processo: A concentração inicial de bactérias afeta a eficiência do processo com CO<sub>2</sub> pressurizado. Nas mesmas condições, quando há uma concentração menor de bactérias, obtém-se maior inativação. Consequentemente, nos casos em que a concentração inicial de micro-organismos é elevada, será necessário aumentar o tempo de processo para obter o mesmo nível de inativação (ERKMEN, 2000). Uma elevada concentração inicial parece exercer um efeito de proteção nas células microbianas, que estarão menos expostas ao efeito do CO<sub>2</sub> pressurizado. Por outro lado, quando a carga microbiana inicial é menor, as células ficarão mais expostas ao CO<sub>2</sub> durante o processo e, portanto, mais sensíveis a inativação (TAHIRI et al., 2006).

- Efeito das características físicas e químicas do meio: A taxa de inativação é fortemente afetada pelos constituintes do meio de cultura e pela composição do alimento, durante o processo. Alimentos, que possuem característica físico-química complexa, parecem exercer uma proteção das células microbianas quando comparados com soluções mais simples (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). O aumento da resistência à inativação de células vegetativas suspensas em um meio complexo está relacionado a presença de componentes lipídicos. A gordura provavelmente dificulta a penetração do CO<sub>2</sub> nas células por meio de uma alteração na parede e membrana celular (ERKMEN e KARAMAN, 2001).

- Efeito do pH do meio de suspensão de células microbianas: A inativação microbiana é reforçada quando o pH inicial da suspensão de células é menor. O pH reduzido aparentemente contribuí para um aumento da permeabilidade das células a fim de facilitar a penetração de CO<sub>2</sub> para as células (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

- Efeito das condições de cultura e do estágio de crescimento: De um modo geral, os micro-organismos que estão na fase estacionária são mais resistentes à temperatura e pressão quando comparados com aqueles que estão na fase log. Células que estão no final da fase exponencial foram mais sensíveis ao tratamento quando comparadas com células que estavam na fase estacionária. A maior resistência da fase estacionária pode ser explicada pelo fato de que, neste estágio, os micro-organismos são capazes de sintetizar novas proteínas que protegem as células contra condições adversas (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

### 3.10 Considerações sobre o estado da arte

No Brasil, o consumo de pescado *in natura* cresce a cada ano, sendo o peixe cru (*sushi* e *sashimi*) um produto cada vez mais consumido em diversos estabelecimentos, inclusive churrascarias e restaurantes *self-service* (não especializados). A culinária japonesa pode ser destacada como uma das principais responsáveis pelo maior consumo de pescado, que é um alimento completo, capaz de proporcionar ao organismo todas as substâncias necessárias e não sintetizáveis, tratando-se de um produto de excelente composição de aminoácidos, vitaminas e sais minerais, além de ser rico em ácidos graxos. Na produção destes produtos deve-se trabalhar com peixes de ótima qualidade e de procedência conhecida. Dentre os pescados utilizados na preparação destes produtos está o salmão e com a crescente popularização do consumo de peixe cru (*sushi* e *sashimi*) aumenta a preocupação com a qualidade higiênico-sanitária dos pescados e de suas preparações, uma vez que pescados crus são veículos de agentes causadores de infecções e intoxicações alimentares.

A utilização de tratamentos térmicos é uma possibilidade para melhorar a qualidade higiênico-sanitária. Porém, este tipo de processo pode acarretar em alterações indesejáveis nas características sensoriais do produto, além de ocasionar perdas de componentes nutricionais/bioquímicos fundamentais devido a possível ocorrência de processos oxidativos, favorecidos neste tipo de processamento. Desta forma, a utilização de processos não térmicos surge como uma alternativa para melhorar a qualidade microbiológica deste produto, preservando as características sensoriais do produto *in natura*, além de promover o aumento da vida útil, facilitando a sua comercialização, manuseio e transporte.

Dentre os diferentes processos não térmicos, a literatura relata o emprego de processos à alta pressão (high-pressure processing – HPP), por mecanismo de pressão hidrostática, que também apresentam limitações, tais como: ocorrência de micro-organismos resistentes à pressão após tratamentos sucessivos, altos custos de investimento devido as elevadas pressões de operação e a natureza não contínua do processo. A utilização do dióxido de carbono pressurizado como tratamento para a inativação de micro-organismos, por sua vez aparece como alternativa interessante neste campo, dado que pressões muito mais amenas estão envolvidas. Porém, a maioria dos estudos publicados está concentrada em avaliar o efeito deste processo na redução de bactérias, em cultura pura, há um número pequeno de pesquisas realizadas com a utilização do dióxido de carbono a alta pressão em alimentos *in natura*. Entretanto, o estudo utilizando dióxido de carbono pressurizado para investigar a inativação de

determinados micro-organismos deve ser feita considerando que a composição do produto influenciará a eficácia do tratamento. Desta forma, é importante ter cuidado ao extrapolar os resultados de cultura pura para situações em que há um produto contaminado pelo mesmo micro-organismo. Além disso, um fato importante em relação ao *status quo* da literatura diz respeito ao sistema empregado, uma vez que aparatos que empregam o princípio por extração ao final do processo resultam em perdas significativas na qualidade do produto final, tendo em vista o arraste natural de substâncias essenciais na corrente de dióxido de carbono, conferindo aparência de produto “cozido”, de cor pálida, o uso, por sua vez, de aparato de volume variável, como o empregado neste trabalho, além de permitir alternância da pressão durante o processo de tratamento, não ocasiona em arraste de elementos essenciais aos alimentos, implicando em ganho significativo de processo e melhoria importante da qualidade do produto final.

Neste sentido, o presente trabalho, tem como finalidade a proposição de um novo sistema, baseado em inovação tecnológica e um processo diferente dos atuais meios, de inativação de micro-organismos presentes em pescados e, possivelmente aplicável a outros produtos denominados “pescados e frutos do mar”, justificando assim a execução da presente tese.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho desenvolvido está dividido em três partes. A primeira delas foi realizada com o objetivo de inativar a cultura pura de *Staphylococcus aureus* em matriz líquida com dióxido de carbono supercrítico. A segunda etapa consistiu na avaliação da inativação de *Staphylococcus aureus* em matriz sólida (salmão) em dióxido de carbono supercrítico, bem como avaliação dos aspectos de qualidade do produto. E, finalmente, para a melhor condição de processo, identificada na segunda etapa, realizou-se a cinética de inativação de *S. aureus* em salmão previamente contaminado.

### 4.1 PREPARO DO INÓCULO

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizado no estudo foi 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 *S. aureus* em um tubo de ensaio com 10 mL de meio líquido Luria Bertani 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 24 horas foi realizado um repique em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio LB líquido, em seguida acrescentados 1 mL do inóculo anterior.

Os experimentos com a matriz líquida foram feitos carregando-se a célula de trabalho após o fechamento da mesma, injetando-se de forma asséptica 18g da suspensão de *S. aureus* com 10<sup>5</sup> UFC/mL e, posteriormente 4g de CO<sub>2</sub>. Para o salmão cru denominado matriz sólida, 5g de amostra foram contaminados com a solução bacteriana de *S. aureus*, contendo em torno de 10<sup>5</sup> UFC/mL) que em seguida, após o tempo de contato, foi levado até célula de trabalho, com auxílio de pinça estéril sob condições assépticas. Outros 13g de salmão cru não inoculado foram colocados no interior da célula para manter uma massa mínima de 18g (massa proporcional ao volume da célula para evitar que o pistão de pressurização esmague a amostra) e, posteriormente a célula foi fechada, e carregada com CO<sub>2</sub>, respeitando as proporções de massa de CO<sub>2</sub> e massa de amostra e definidas no planejamento.

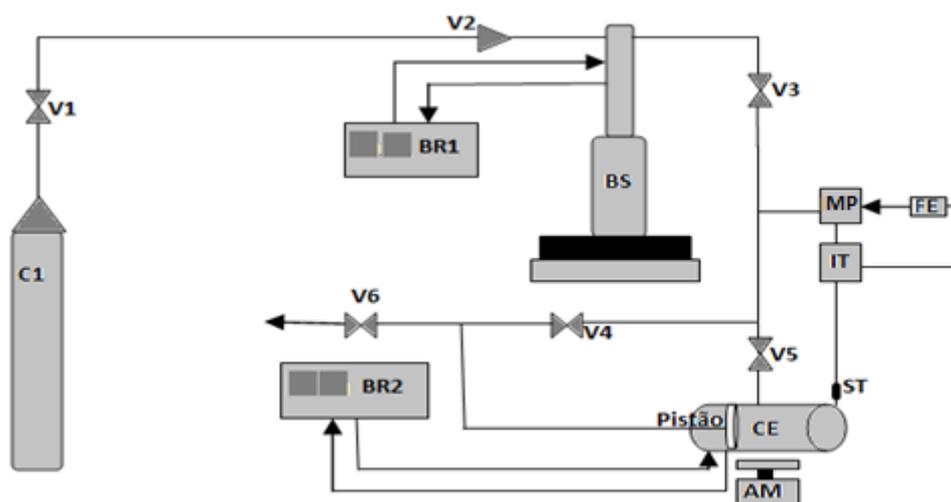
### 4.2 APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Todos os experimentos envolvendo o emprego do dióxido de carbono supercrítico foram realizados com o mesmo aparato experimental e seguindo um procedimento padrão. Além disso, as análises microbiológicas foram realizadas de acordo com uma única metodologia.

Dessa forma, optou-se em descrever inicialmente as características da unidade experimental utilizada, as etapas do procedimento experimental e a metodologia das análises microbiológicas realizadas. Para em seguida descrever os aspectos específicos do processo utilizando a cultura pura de *S. aureus* e o salmão.

#### 4.2.1 Descrição do aparato experimental

Figura 4: Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.



Fonte: Ferrentino, et al., (2013<sup>a</sup>) com adaptações.

As medidas experimentais de inativação de micro-organismos a altas pressões realizadas neste trabalho foram conduzidas em uma célula de equilíbrio de volume variável. A unidade experimental encontra-se disponível no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI – Erechim. A Figura 4 apresenta o diagrama esquemático da unidade experimental usado neste estudo, enquanto a Figura 5 apresenta a unidade e a célula de trabalho, as quais consistem basicamente dos seguintes itens com suas respectivas funções:

**C1)** Reservatório de solvente: armazenamento do solvente utilizado nos experimentos;

**V1)** Válvula de esfera (Marca SWAGELOK, Modelo SS-83KS4). Esta válvula quando aberta permite o fluxo do solvente do cilindro para bomba;

**BR1)** Banho de recirculação (Marca NOVA ETICA, Modelo 521-2D): é usado para manter a temperatura no cilindro da bomba constante;

**BS)** Bomba de alta pressão (ISCO 260D): 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 260D) que possui um cilindro interno de 260 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 42 mL. 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 (V5); uma entrada frontal (janela frontal) e traseira (fechamento e conexão com a válvula V4);

**V2)** Válvula de via única (Marca HIP, Modelo 15-41A1T): 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 e V4)** Válvulas de esferas (Marca SWAGELOK, Modelo SS-83KSA): 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: 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; também funciona como válvula de descarga: usada para descarga do sistema e despressurização do fundo da célula;

**V5)** 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;

**V6)** Válvula de descarga (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1): Usada para descarga do sistema e despressurização do fundo da célula;

**BR2)** Sistema de aquecimento da célula: o sistema de aquecimento da célula é composto por uma dupla camisa de metal envolta na célula de inox com duas aberturas para acoplamento de mangueiras do banho externo ao sistema. O controle de temperatura é realizado por um

banho termostático de recirculação (BR2) (Marca NOVA ETICA, Modelo 521/3D) onde há circulação de água de banho passando para a célula e retornando ao banho.

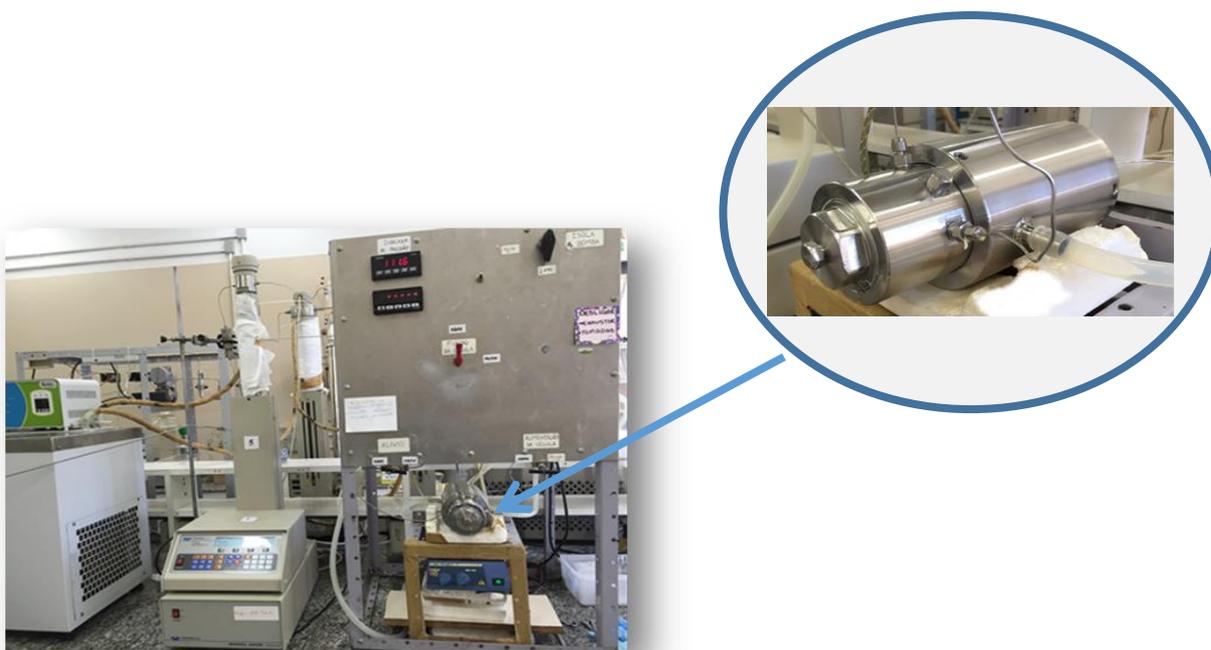
**IT)** Indicador de temperatura (Marca DIGMEC, Modelo FHMD): é um conjunto composto por um sensor de temperatura (termopar) tipo Y e um indicador de temperatura. Usado para medir o valor real da temperatura no interior da célula. Este sensor é inserido na célula de modo que a junta fria fique no centro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

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

**AM)** Agitador (Marca IKA RH BASIC 2): utilizado para garantir homogeneização da solução no interior do sistema;

**ST)** Termopar, acoplado ao interior da célula para controle interno de temperatura.

Figura 5: Imagem do Aparato Experimental e célula de equilíbrio.



Fonte: O autor, 2015.

#### 4.2.2 Procedimento para inativação de *Staphylococcus aureus* em altas pressões

O procedimento experimental adotado para inativação de micro-organismos a altas pressões, utilizando o aparato experimental descrito anteriormente, iniciou com o carregamento

do cilindro da bomba com solvente (dióxido de carbono) proveniente do cilindro de estocagem. A carga de solvente envolve algumas etapas, sendo a primeira a transferência do solvente do cilindro para a câmara interna da bomba. Deve-se ter uma quantidade de solvente relativamente grande dentro da câmara da bomba já que o próprio solvente é utilizado como fluido pressurizador.

Posteriormente, foi ajustada a temperatura do banho de recirculação (BR1), a 7°C, para manter a temperatura no cilindro da bomba constante e a pressão mantida a 100 bar até iniciar a alimentação, quando foi reduzida para 80 bar. As válvulas V3 foram então abertas e a pressão elevada através da bomba, pressurizando toda a linha. Enquanto o fluxo do solvente estabiliza, foi realizada a montagem da célula de equilíbrio. Para isto, foram obedecidos passos cuidadosos para a montagem e fechamento da mesma (ESTEVEES et al., 2009).

Primeiramente, a montagem do pistão foi realizada, de forma que o o mesmo possa deslizar pelo interior da célula e não permita a passagem de fluido do fundo para frente e vice-versa. Posteriormente, são manipuladas as roscas de fechamento da célula.

A amostra (quando líquida) foi retirada da solução estoque, com o auxílio de uma seringa estéril de 10 mL dentro de uma câmara de fluxo, e posteriormente injetada na válvula do termopar com a célula fechada. Quando realizado experimento com salmão (matriz sólida) o mesmo foi adicionado em câmara de fluxo antes do fechamento da janela frontal e após o fechamento da janela traseira.

Após essa etapa, as linhas que contêm as válvulas V5 e V6 são conectadas na célula e preenchidas com o solvente a baixa pressão e depois evacuadas, para remover o ar remanescente.

A bomba de seringa possui um reservatório interno encamisado (cilindro da bomba) de forma que se pode conhecer o volume de solvente dentro do reservatório a uma determinada pressão e temperatura. A medida do volume deslocado, a fim de formar uma mistura de composição desejada, é computada baseada no decréscimo do volume interno do cilindro da bomba pela abertura da válvula V5. 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. Desta forma, a célula é carregada com composição global conhecida. Uma vez que o sistema encontra-se estabilizado (fluxo da bomba estável em  $\pm 0,01$  mL/min – em torno de 30 minutos), a válvula V5 é aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, até que o volume da câmara

da bomba atinja o valor pré-estabelecido para fornecer a composição desejada dentro da célula. 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 (em torno de 60 bar) e, com a válvula V5 fechada, a válvula de esfera V4 é aberta para permitir que o solvente entre em contato com o fundo do pistão. O sistema de aquecimento é então acionado.

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

Todos os experimentos foram realizados, considerando uma pressão inicial de 80 bar e a final dependente do experimento. O tempo total de processo englobou um ciclo (inicialmente de 2 horas e depois conforme o experimento, nas cinéticas), com pressurização de 30 bar.min<sup>-1</sup> e posterior despressurização conforme o planejamento, sendo que cada ciclo consiste de: uma etapa de pressurização, uma fase estacionária (permanência em pressão teste) e uma etapa de despressurização até 80 bar e a temperatura de operação do sistema foi fixada em 33°C.

### **4.3 INATIVAÇÃO DE CULTURA PURA DE *Staphylococcus aureus* - MATRIZ LÍQUIDA**

Para cada experimento o inóculo inicial foi preparado conforme descrito no passo 4.1.

#### **4.3.1 Otimização do processo de inativação de *S. aureus***

Os efeitos do CO<sub>2</sub> pressurizado sobre a inativação de *S. aureus* foram avaliados através de um planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> (Delineamento Central Composto Rotacional – DCCR). As variáveis independentes estudadas foram: pressão, taxa de despressurização e razão entre massa do inóculo e massa do CO<sub>2</sub> conforme demonstrado na Tabela 2. Como variáveis dependentes (respostas) avaliou-se a contagem microbiana.

Tabela 2: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial  $2^3$  para inativação de *S. aureus* em matriz líquida.

Variáveis independentes**	Níveis		
	-1	0*	+1
Pressão (bar)	120	160	200
Taxa de despressurização (bar/mim)	10	55	100
Razão (v/v)***	0,2:1	0,6:1	1,0:1

\* Triplicata do ponto central; \*\*Variáveis independentes fixas: quantidade de inóculo  $10^5$  (UFC/mL), tempo de processo de 2h e temperatura 33°C. \*\*\* Volume/volume massa de CO<sub>2</sub> e inóculo.

#### 4.4.2 Determinação da cinética de inativação de *S. aureus* em cultura pura

Foi realizada uma cinética de inativação para avaliar o efeito da pressão sobre a inativação de *S. aureus* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico. Foram realizados experimentos com pressões variando de 90 a 140 bar, com as demais variáveis iguais ao ponto central (Pressão máxima de 160 bar, taxa de despressurização de 55 bar/min e razão entre massa de CO<sub>2</sub> e inóculo de 0,6:1). Todos experimentos foram conduzidos conforme descrito no passo 4.2.2.

Para avaliar o efeito do tempo de exposição sobre a inativação de *S. aureus* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico, foram realizados experimentos com 15, 30, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos de exposição, as pressões avaliadas foram de 100, 130 e 160 bar.

Os indicadores biológicos possuem o chamado valor D que serve para definir o tempo para reduzir em um log a concentração da carga microbiana inicial, e com isso podemos determinar o tempo mínimo de tratamento que os produtos devem ser expostos ao agente esterilizante. O valor D, tempo de redução decimal, é o tempo em minutos necessário para reduzir a população microbiana em 90% ou um ciclo logaritmo, a uma condição específica, isto é, para uma fração sobrevivente de 1/10 (RDC 17/2010). O valor Z é o aumento de temperatura, necessário para reduzir em 90% o tempo de destruição térmica, ou seja, que ocasione o mesmo efeito letal em um décimo do valor D. O valor Z reflete a resistência relativa de um microrganismo para diferentes temperaturas destrutivas, ou seja reduzir o valor D 10 vezes (Forsythe, 2013). Com isto é possível calcular processos térmicos equivalentes sob diferentes temperaturas. Os valores D e Z variam para cada microrganismo e conforme as condições do meio.

Para determinar o valor D e Z, foi utilizado o modelo matemático conforme a seguir:

A determinação do tempo de redução decimal (valor-D) de *S. aureus* em uma determinada pressão foi baseado em um balanço diferencial de primeira ordem, Equação 1.

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

Onde N é o número de UFC, t é tempo de processo, K é a constante de proporcionalidade.

Integrando-se a Equação (1) com a seguinte condição inicial  $N(t=0) = N_0$ , onde  $N_0$  é o número de UCF inicial, tem-se (Equação 2);

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

Rearranjando a Equação (2) em termos de log tem-se (Equação 3);

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = \frac{-1}{D} t \quad (3)$$

Onde,  $k = 1/D$  e D é definido como a constante de redução decimal, a qual representa o tempo necessário para haver a redução de um ciclo logarítmico no processo.

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

A constante de resistência de morte de *S.aureus* a pressão (valor-Z) foi determinada pela Equação 4:

$$\text{Log} \frac{D_1}{D_2} = \frac{1}{Z} (C_1 - C_2) \quad (4)$$

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 pressões (C) e o log do respectivo valor D, sendo z obtido a partir do inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

#### 4.4 INATIVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* PREVIAMENTE INOCULADO EM SALMÃO CRU - MATRIZ SÓLIDA

Para cada experimento o inóculo inicial, bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), foi preparado conforme descrito no passo 4.1, sob condições assépticas.

O salmão, obtido em forma de filé congelado foi obtido em um mercado local (Figura 6). As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e transportadas para o Laboratório, onde permaneceram congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o início dos ensaios. Foram realizadas análises preliminares para identificação da presença de *S. aureus* no salmão e constatou-se a ausência do micro-organismo nas amostras.

Figura 6: Filé de salmão adquirido em mercado local.



Para os experimentos de inativação de *S. aureus*, o salmão cru foi cortado em cubos de aproximadamente 5g ( $\pm 100\text{mm}^2$ ) e estes contaminados com uma suspensão bacteriana (FERRENTINO et al., 2014), testando-se previamente a concentração de bactérias nesta suspensão e a forma de inoculação desta nos cubos de salmão cru.

#### 4.4.1 Testes prévios com salmão cru tratado com CO<sub>2</sub> supercrítico

Inicialmente foram realizados testes preliminares a fim de elucidar questões técnicas como a quantidade de inóculo a ser utilizado na amostra para teste, qual o tempo de exposição a alta pressão para verificar a eficácia do tratamento, qual a forma a ser utilizada para inocular o micro-organismo na amostra, em seguida partiu-se para os testes para otimização do processo.

##### 4.4.1.1 Inativação de *Staphylococcus aureus* em função quantidade de inóculo e tempo de exposição

Nesta etapa foi avaliada a eficiência do dióxido de carbono supercrítico na inativação de *Staphylococcus aureus* previamente impregnado em pedaços de salmão cru. As amostras foram submetidas a contaminação inicial por 1 minuto com inóculos com diferentes cargas microbianas, obtendo-se contagens entre 10<sup>3</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, nas amostras controle. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito em 4.2.2, variando-se os tempos de exposição ao CO<sub>2</sub> supercrítico, entre 15 minutos até 5 horas.

Após definir-se a quantidade de inóculo, com base em estudo anterior, optou-se por trabalhar com inóculo inicial com contagens em torno de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Para tanto o inóculo inicial foi incubado individualmente em caldo LB (LB Merck) por 24 horas a 35-37°C. Em seguida 5g de salmão foram contaminados com uma solução bacteriana de *S. aureus* por diferentes tempos (1, 30 e 60 minutos), avaliando-se as contagens iniciais obtidas. As amostras foram submetidas a uma pressão inicial de 80 bar; logo após, 200 bar com pressurização de 30 bar.min<sup>-1</sup> e posterior despressurização (100 bar.min<sup>-1</sup>), com diferentes tempos de pressurização máxima (15, 30, 60, 90 e 120 minutos) a 33°C.

##### 4.4.1.2. Inativação de *Staphylococcus aureus* em salmão cru em função da forma de inoculação do micro-organismo

Nesta etapa foi avaliada a eficiência do dióxido de carbono supercrítico na inativação de *Staphylococcus aureus* previamente impregnado em pedaços de salmão cru sob diferentes formas: com injeção de 1 mL de suspensão bacteriana com 10<sup>6</sup> UFC/mL de *S. aureus* no interior da amostra (contaminação profunda) usando seringa estéril e com manutenção da amostra mergulhada em contato com o inóculo de *S. aureus* (contaminação superficial) em tempos de 1, 30 e 60 minutos a fim de obter uma contagem final da amostra em torno de 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>.

#### 4.4.2 Otimização do processo de inativação de *S. aureus*

Os experimentos para otimização do processo de inativação de *S. aureus* em salmão cru foram feitos com inoculação prévia por injeção de 1mL de suspensão bacteriana ( $10^6$  UFC/mL) em cubos de salmão de aproximadamente 5g.

Os efeitos do CO<sub>2</sub> pressurizado sobre a inativação de *S. aureus* inoculado em salmão, foram avaliados através de um planejamento experimental fatorial completo 2<sup>3</sup> (Delineamento Central Composto Rotacional – DCCR). As variáveis independentes estudadas foram: pressão, taxa de despressurização e razão entre massa do inóculo e massa do CO<sub>2</sub> conforme apresentado na Tabela 3. Como variáveis dependentes (respostas) avaliou-se a contagem microbiana, atividade de água, cor e pH.

Tabela 3: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para inativação de *S. aureus* em Salmão cru.

Variáveis independentes**	Nível				
	-1,68	-1	0*	+1	+1,68
Pressão (bar.min <sup>-1</sup> )	92,8	120	160	200	227
Taxa de despressurização (bar.min <sup>-1</sup> )	<10	10	55	100	130
Massa de CO <sub>2</sub> :Massa de salmão	0,1:1	0,2:1	0,6:1	1,0:1	1,3:1

\* Triplicata do ponto central; \*\*Variáveis independentes fixas: quantidade de inóculo 10<sup>5</sup> (UFC/mL), tempo de processo de 2h e temperatura 33°C.

#### 4.4.3 Determinação da cinética de inativação de *S. aureus* em salmão cru

Foi realizada uma cinética de inativação para avaliar o efeito da pressão sobre a inativação de *S. aureus* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico. Foram realizados experimentos com pressões variando de 100 a 250 bar, com as demais variáveis iguais ao ponto central (Pressão máxima de 160 bar, taxa de despressurização de 55 bar/min e razão entre massa de CO<sub>2</sub> e massa de salmão e de 0,6:1). Todos experimentos foram conduzidos conforme descrito no item 4.2.2.

Para avaliar o efeito do tempo de exposição sobre a inativação de *S. aureus* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico, foram realizados experimentos com 15, 30, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, baseada em teste anterior a pressão avaliada foi fixada em 225 bar.

4.4.4 Avaliação das alterações físicas do salmão cru após os tratamentos com CO<sub>2</sub> supercríticos.

A fim de avaliar as alterações físicas do salmão após o tratamento com CO<sub>2</sub> supercríticos, foram realizados testes de Aw, cor e pH, conforme descrito nos itens 4.5.2 a 4.5.4

## **4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS**

### **4.5.1 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas com as amostras antes (controle) e depois do processamento com o dióxido de carbono supercrítico, no laboratório de Biotecnologia, da URI Erechim/RS.

Imediatamente após o término de cada experimento, retirou-se a amostra da célula, na capela de fluxo, e realizou-se a sua diluição em água peptonada 0,1% com auxílio de Stomacher (Stomacher<sup>®</sup> 400 Circulator, Seward Limited UK) e posterior plaqueamento em meio ágar Baird-Parker (Baird-Parker Agar Base - Merck<sup>®</sup>) estéril. As placas foram incubadas invertidas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas, sendo que após o período de incubação, realizou-se a contagem dos micro-organismos de cada placa, expressos em UFC/g.

### **4.5.2 Atividade de água (Aw)**

A atividade de água foi determinada utilizando o aparelho Aqualab (modelo Aqua lab, mod-cx-2, série- 461453), cujo funcionamento se baseia nos higrômetros de resposta rápida.

### **4.5.3 Cor**

A cor foi determinada utilizando um colorímetro portátil (Minolta CR400 - mod-ch-400, série c8201504.), com fonte de luz D65, na escala de L\*, a\*, b\* do sistema CIELAB, realizando-se as leituras em temperatura ambiente. No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L\*, a\*, b\*, a coordenada L\* corresponde a luminosidade, a\* e b\* referem-se às coordenadas de cromaticidade verde(-)/vermelho(+) e azul (-)/amarelo(+), respectivamente.

### **4.5.4 pH**

O pH foi determinado por potenciometria, usando um medidor digital de pH (Hamilton Instruments Inc., Bonaduz, Suíça), a mensuração se deu após a calibração com tampão

comercial com soluções a pH 7,0 e 4,0. A amostra tratada (2 g) foi homogeneizada com água destilada (10 mL), agitada em bequer e o pH registrado após a estabilização do sinal. As medidas foram realizadas em triplicata (BRASIL, 2005).

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 95% utilizando o programa Statistica® 8.0 (STATSOFT Inc).

Os resultados obtidos nos planejamentos fatoriais foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 8.0, com nível de significância de 95 % de confiança. Para validação dos modelos foi utilizada a análise de variância, verificando-se o coeficiente de correlação e a amplitude de grandeza do F calculado em relação ao F tabelado ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 INATIVAÇÃO DE CULTURA PURA DE *Staphylococcus aureus* COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

#### 5.1.1. Otimização da inativação de *S. aureus*

A Tabela 4 apresenta a matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> (valores reais e codificados) para os percentuais de redução de *S. aureus*, avaliando diferentes taxas de despressurização (bar/min), razão (entre a massa de CO<sub>2</sub> e a massa de cultura bacteriana) e pressão (bar).

Tabela 4: Matriz do delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> (valores reais e codificados) da inativação de *S. aureus* e as respostas em redução percentual e logarítmica.

Ensaio	X1	X2	X3	Redução	Redução
	Pressão (bar)	Taxa despressurização (bar/min)	Razão (CO <sub>2</sub> :inóculo)	% (Log/g)	Log UFC/g
<b>1</b>	(120)-1	(10)-1	(0,2)-1	24,0	1,2
<b>2</b>	(120)-1	(10)-1	(1,0)+1	34,0	1,7
<b>3</b>	(120)-1	(100)+1	(0,2)-1	44,0	2,2
<b>4</b>	(200)+1	(10)-1	(0,2)-1	100,0	5,0
<b>5</b>	(120)-1	(100)+1	(1,0)+1	46,0	2,3
<b>6</b>	(200)+1	(100)+1	(0,2)-1	100,0	5,0
<b>7</b>	(200)+1	(10)-1	(1,0)+1	100,0	5,1
<b>8</b>	(200)+1	(100)+1	(1,0)+1	100,0	5,0
<b>9</b>	(160)0	(55)0	(0,6)0	100,0	5,2
<b>10</b>	(160)0	(55)0	(0,6)0	100,0	5,0
<b>11</b>	(160)0	(55)0	(0,6)0	100,0	5,2

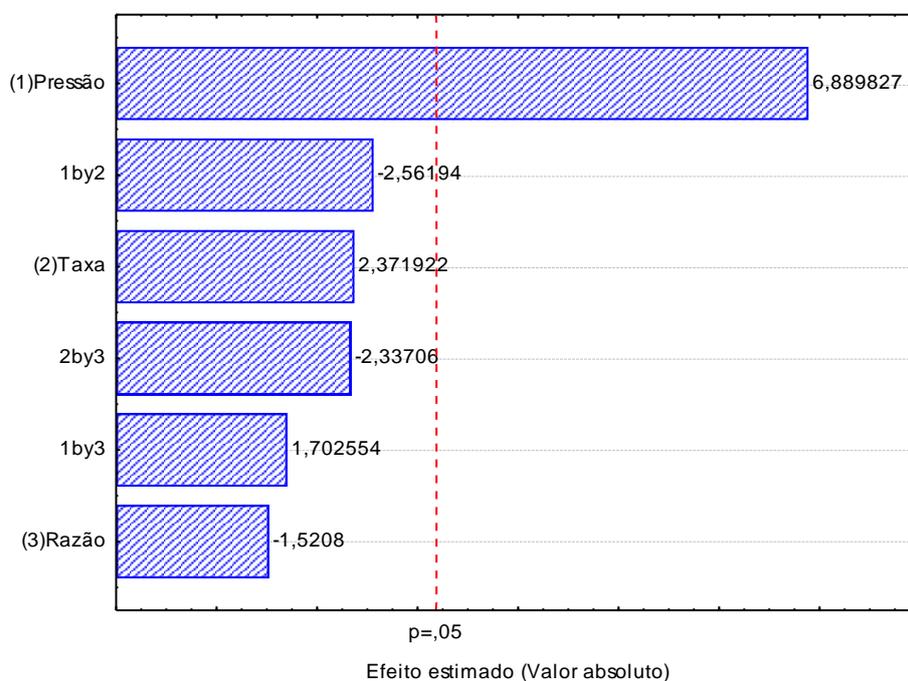
Considerando a redução na contagem de *S. aureus* da amostra processada, é possível verificar reduções de 100% da carga inicial nos ensaios 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, impactando uma redução logarítmica da carga inicial de 5,0 a 5,2 Log UFC. g<sup>-1</sup>.

Ao analisar os demais ensaios observa-se reduções na faixa de 46 e 44% nos ensaios 5 e 3 (reduções de 2,3 e 2,2 Log UFC.g<sup>-1</sup>) e reduções de 34 e 24% nos ensaios 2 e 1 (reduções de 1,7 e 1,2 Log UFC.g<sup>-1</sup>), sendo valores considerados baixos levando-se em conta os demais

ensaios. Estes resultados mostram que a redução na pressão (120 bar) dificulta a inativação microbiana.

Os resultados foram tratados estatisticamente e a Figura 7 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas. Verifica-se que a somente a pressão apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) positivo, indicando que, quanto maior a pressão, maior será a inativação de *S. aureus*. A taxa de despressurização e a razão, bem como a interação entre elas não exerceram influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada.

Figura 7: Gráfico de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo  $2^3$  para a inativação de *S. aureus* com dióxido de carbono.



Em geral, a inativação microbiana é acelerada com o aumento das pressões de  $\text{CO}_2$ . Como consequência, a pressões mais elevadas, é necessário menor tempo de exposição para inativar o mesmo nível de células microbianas (LIN et al., 1994; HONG E PYUN, 1999). A pressão controla a taxa de solubilização de  $\text{CO}_2$  e a sua solubilidade total num meio de suspensão. Portanto, uma pressão mais elevada aumenta a solubilização de  $\text{CO}_2$  para facilitar tanto a acidificação do meio externo, como o seu contato com as células. Além disso, o  $\text{CO}_2$  com pressões mais elevadas, em geral, exibe um poder de diluição superior. A inativação microbiana é também sensível à aplicação da temperatura. Em geral, a taxa de inativação aumenta com aumento da temperatura (em igualdade de condições). Temperaturas mais altas

estimulam a difusividade do CO<sub>2</sub>, e pode também aumentar a fluidez da membrana celular para realizar a penetração mais facilmente (LIN et al., 1994; HONG E PYUN, 1999).

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.

Spilimbergo et al. (2002), obtiveram esterilização completa de bactéria Gram-positiva *B. Subtilis*, assim como de bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, sob pressão de operação de 74 bar e um tempo de exposição em condições estáveis de 2,5 min. Segundo este estudo a hipótese mais provável para a inativação de bactérias é o efeito sinérgico de diminuição do pH intracelular e a modificação da membrana citoplasmática causada por dissolução de CO<sub>2</sub>. O passo limitador da velocidade é, por conseguinte, a taxa de pressurização que determina a velocidade de saturação do CO<sub>2</sub> no meio. Em particular, o CO<sub>2</sub> tem relativamente baixa solubilidade em água; pelo contrário, é bem solúvel em lipídios, dependendo da pressão e temperatura utilizada no processo.

O fato da razão entre produto e CO<sub>2</sub> não se mostrar significativa no processo significa que é possível usar a menor quantidade de CO<sub>2</sub>, ocasionando uma maior economia no processo, devido a um menor consumo de CO<sub>2</sub>. Dados divergentes foram relatados por Soares et al. (2013), onde a razão entre a massa de cultura de *L. monocytogenes* e a massa de CO<sub>2</sub> mostrou-se significativa ( $p < 0,05$ ) ou seja, quanto maior a oferta de dióxido de carbono, mais eficiente foi a inativação de *L. monocytogenes*. No entanto, os mesmos autores, usando quantidade de CO<sub>2</sub> menor (1:0,2) obtiveram redução de 100%, indicando que é possível obter redução microbiana com baixas concentrações de CO<sub>2</sub>. Segundo Erkmen e Karaman (2001), a maior concentração de CO<sub>2</sub> facilita a 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. Fatores como as características da parede celular do micro-organismo Gram + como é o caso do *S. aureus* e a presença de gordura no salmão devem ser considerados como favoráveis a solubilização do CO<sub>2</sub>. Embora conforme demonstrado por diversos autores citados por Perrut (2012), a deterioração microbiana aumenta com o aumento da pressão e não com a

quantidade de CO<sub>2</sub> presente no meio, pois a pressão é que provoca aumento na dissolução do fluido através da membrana e parede celular.

### 5.1.2 Inativação de *S. aureus* em matriz líquida em função da pressão

A fim de verificar a influencia da pressão na inativação de *S. aureus* foram realizados testes com pressões variando entre 90 e 140 bar.

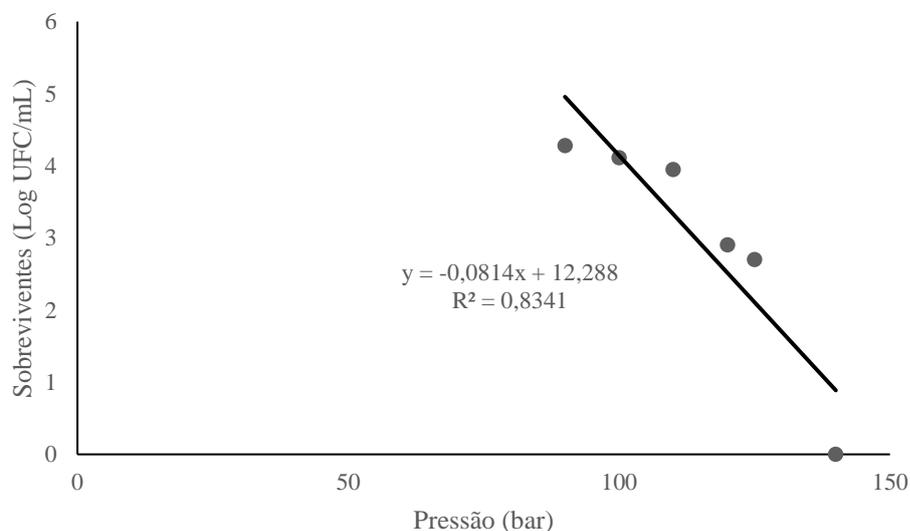
A Tabela 5 apresenta os resultados do efeito da pressão sobre a inativação de *S. aureus* através da utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico.

Tabela 5: Evolução da inativação (Nº de sobreviventes e Log) de *S. aureus* empregando diferentes pressões

Pressão (bar)	Densidade (Kg/m <sup>3</sup> )	Nº Sobreviventes UFC/mL	Log UFC/mL
140	815,57	0	0
130	801,26	0	0
125	793,27	500	2,69
120	784,57	800	2,90
110	764,36	9000	3,95
100	738,34	13000	4,11
90	700,34	19000	4,27

A inativação de *S. aureus* em matriz líquida, tratados à diferentes pressões, combinada com taxa de despressurização de 55 bar.min<sup>-1</sup> a uma temperatura fixa de 33°C, tempo total de tratamento de 2 horas e razão de 1:0,2 (inóculo:CO<sub>2</sub>), apresentaram reduções significativas quando houve aumento da pressão de trabalho com redução significativa na sobrevivência do micro-organismo: redução de cerca de 5 log foram obtidos a partir de 130 bar. Os dados de densidade são apresentados na Tabela 5 uma vez que possuem efeito positivo na solvatação do CO<sub>2</sub>. A Figura 8 demonstra que há redução linear no número de micro-organismos sobreviventes conforme se aumenta a pressão, com redução total de *S. aureus* a 130 bar. Diversos estudos relataram o efeito benéfico de pressão durante tratamentos com CO<sub>2</sub> supercrítico (FERRENTINO et al, 2014). O aumento de pressão é benéfico sobre a inativação microbiana graças ao aumento dramático da densidade e poder de solvatação de CO<sub>2</sub> que promove o contato com as células que induzem a remoção de componentes vitais a partir de células ou membranas celulares (BRUNNER, 2005).

Figura 8: Inativação de *S. aureus* em função da pressão.



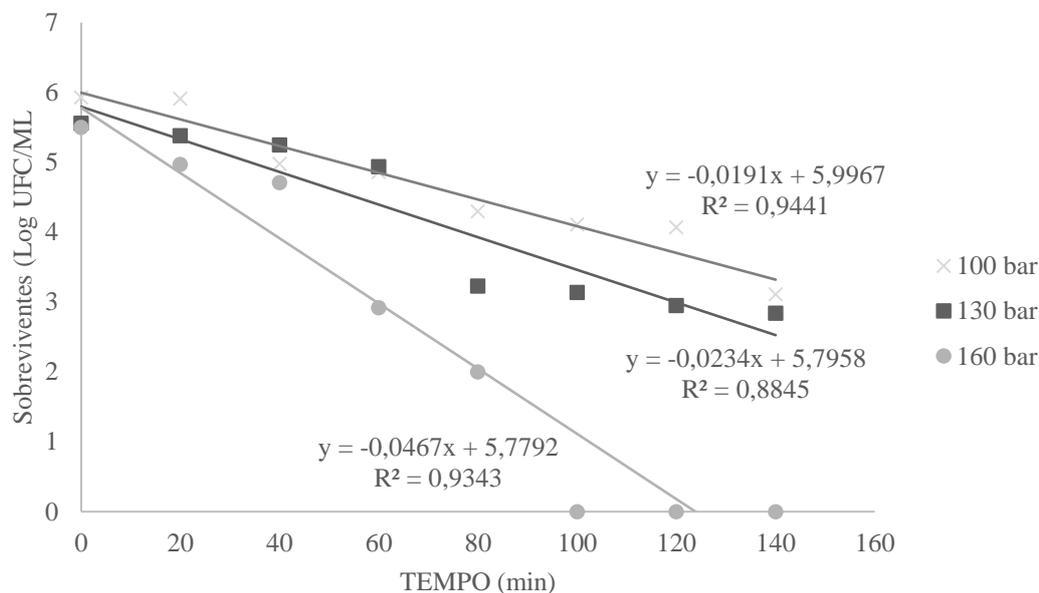
Os dados deste estudo corroboram com achados de Liao et al. (2010), que obteve reduções de 5,24 ciclos log para testes com suco de cenoura em pressões de 100, 200 e 300 bar, e temperaturas de 32, 37 e 42°C, o tempo de tratamento foi de 5-90 min para inativação de *Salmonella typhimurium* e concluíram que o efeito de inativação foi melhorada pelo aumento da pressão e temperatura. Liao et al. (2007) testou a inativação de *Escherichia coli* em sumo de maçã através do dióxido de carbono supercrítico, seus testes foram realizados com CO<sub>2</sub> a 200 bar e 37°C e a 300 bar e 42°C, o que o levou a concluir que temperatura ou pressão mais elevada aumentou significativamente o efeito bactericida ( $p < 0,05$ ), a redução máxima foi de 7,66 log UFC a 450 bar e 52°C durante 30 min. Já reduções de até 8 log foram obtidos por Erkmen e Karaman (2001), que trataram *S. typhimurium* em 75,6 bar e 35°C suspenso em solução salina. Estes resultados mesmo com diferentes pressões e temperaturas indicam que a pressão influencia a eficácia do processo.

### 5.1.3 Inativação de *S. aureus* em função do tempo total do processo

Considerando os resultados obtidos no item 5.1.2, optou-se por avaliar a inativação de *S. aureus* em função de diferentes tempos de pressurização (0 a 120 min.) em diferentes pressões. A Figura 9 demonstra as cinéticas de inativação a 100, 130 e 160 bar, respectivamente, durante 120 min. A razão e taxa de despressurização foram mantidas constantes conforme o

ponto central do planejamento (0,6:1 massa de CO<sub>2</sub>:massa de inóculo e 55 bar/min, respectivamente).

Figura 9: Cinética de inativação de *S. aureus* com pressão de 100 bar, 130 bar e 160 bar.



A Figura 9 apresenta a redução de *S. aureus* em diferentes pressões (100, 130 e 160 bar), pela qual é possível dizer que a taxa de inativação aumenta conforme se aumenta a pressão do sistema, permitindo desta forma reduzir o tempo de tratamento. É possível verificar que a 100 bar a inativação ocorre de forma lenta, quando ocorre aumento de pressão para 130 bar a redução de 6 Log é alcançada em 120 minutos de tratamento, porém quando houve incremento da pressão (160 bar) esta redução ocorre em 90 minutos.

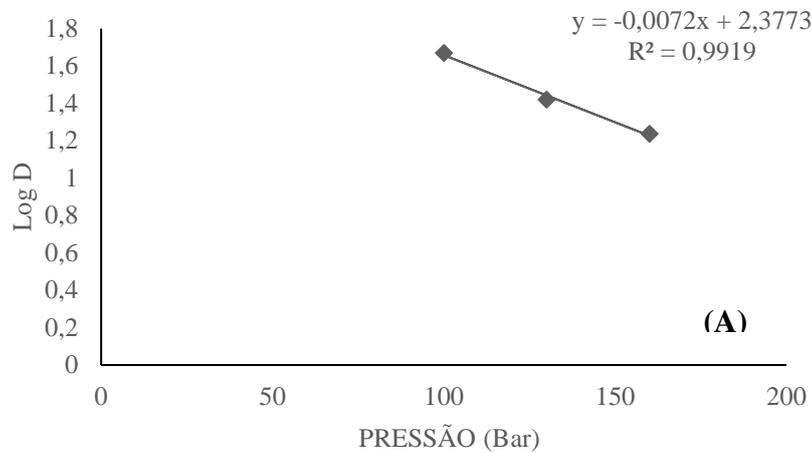
Desta forma, a partir dos coeficientes angulares das equações das retas obtidas na linearização dos pontos em cada uma das cinéticas de inativação de *S. aureus* em função do tempo, com pressões fixadas em 100, 130 e 160 bar, foram obtidos os valores de D (-1/b), os quais podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de D e log de D para as cinéticas de inativação de *S. aureus* em função da Pressão.

Pressão (bar)	Valor de D (min)	Log D
100	46,7	1,66
130	26,3	1,41
160	17,3	1,23

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 necessárias para a curva de resistência térmica atravessar um ciclo logaritmo. Este 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  $y= -0,0072x + 2,3773$ , obtivemos  $Z=138$  bar.

Figura 10: Valores de Log D para a obtenção do parametro Z, para os resultados experimentais.



Conhecendo o valor de Z pode-se simular o valor de D para qualquer outra pressão utilizando a Equação 6:

$$\log(D) = \frac{-1}{z} * (P - Pref) + \log(D ref) \quad (6)$$

Onde P e Pref representam a pressão do tratamento e pressão de referência, respectivamente. Os valores de D e Dref são o tempo de redução decimal na pressão do sistema e na pressão de referência, respectivamente.

O valor de D obtido é similar ao reportado por Neagu et al. (2014), que descreve como uma cinética de primeira ordem de reação e um efeito sinérgico de pressão e temperatura foi notado para o intervalo experimental, onde a pressão variou de 54 a 70 bar e a temperatura variou de 30 a 50 °C para a inativação de *Aspergillus ochraceus* usando dióxido de carbono

supercrítico. O tempo de redução decimal (D) variaram entre 47,07 minutos (a 54 bar e 30°C) e 5,04 minutos (70 bar e 50°C).

Erkmem (2000), estudando *L. monocytogenes*, em suspensões em meio de cultura BHI, a 25°C, encontrou valores de D (min) 34,49 utilizando 15,1 bar de pressão, 18,59 utilizando 30,2 bar e 13,0 para pressão de 60,5 bar. Nessas condições o valor de Z obtido foi de Z=115,8. Segundo Torrezan (2003), a morfologia das células dos micro-organismos influencia sua sensibilidade aos efeitos da pressão, sendo os bacilos mais sensíveis do que os cocos.

Erkmen e Karamen (2001), realizaram uma cinética de inativação de *Salmonella typhimurium* com dióxido de carbono pressurizado na faixa de 15,1 para 75,6 bar a 35°C e encontraram o valor de D que variou de 23,63 para 1,48 min. Sendo que a 75,6 bar o autor encontrou um D de 1,48 min usando solução salina e um D igual 9,43 com meio de cultura BHI, nas mesmas condições. A inativação seguiu uma cinética de reação de primeira ordem. A dependência da pressão das taxas de inativação de *Salmonella typhimurium* pode ser descrita pelo valor D, dependendo das soluções modelos de meios de cultura e solução salina fisiológica. O dióxido de carbono dissolve-se melhor na solução aquosa (solução salina) sob pressão para formar ácido carbônico. A solubilização de CO<sub>2</sub> pode, portanto, ser relacionada com as alterações de pH na suspensão.

Já Silva (2011), testou a eficiência do uso CO<sub>2</sub> supercrítico na inativação de *E. coli* em meio de cultura. Durante todos os experimentos foi mantida uma relação constante entre massa de CO<sub>2</sub> e massa de meio líquido contendo as células de *E. coli*, onde foi empregado 7 g de CO<sub>2</sub> e 5 g de meio líquido, a uma taxa de despressurização de 100 bar.min.<sup>-1</sup> A temperatura foi mantida constante em 36 °C. Inativação microbiana seguiu uma cinética de primeira ordem, onde as taxas aumentaram com o aumento da pressão de 80 - 160 bar. A 160 bar foi necessário um tratamento 1,03 min (valor de D) para reduzir um ciclo na contagem, enquanto que à 80 bar foram necessários 5,35 min (valor de D). Através desses valores foi encontrado valor de Z= 113,64.

Soares et al. (2013), avaliaram a inativação de *L. monocytogenes* utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. 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 com 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos, com 1 ciclo, razão entre massa de CO<sub>2</sub> e massa de inóculo de 0,2:1, temperatura de 33°C, e pressão fixa de 200 bar. As taxas de despressurização foram de 100, 120 e 160 bar.min<sup>-1</sup>. O autor encontrou

um valor de D igual a 12,66; 14,99 e 17,85 para uma pressão de 160, 120 e 100 bar, respectivamente. O valor de Z encontrado foi igual a 500.

## **5.2 INATIVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* INOCULADO EM SALMÃO CRU APLICANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Após determinar a viabilidade da inativação de *Staphylococcus aureus* em cultura pura empregando dióxido de carbono supercrítico, passou-se a estudar a inativação do *S. aureus* em salmão cru, denominado como matriz sólida.

Antes dos experimentos para otimização da inativação de *S. aureus*, foram realizados testes prévios visando obter-se informações sobre o tempo de exposição a alta pressão, o inóculo inicial a ser impregnado no salmão cru, o tempo de contato do salmão com a cultura bacteriana e a forma de inoculação da suspensão bacteriana nas amostras de salmão cru.

Considerando uma menor eficácia do dióxido de carbono supercrítico em inativar micro-organismos em matriz sólida (FERRENTINO e SPILIMBERGO, 2011), os experimentos prévios foram realizados em condições mais drásticas de pressão e taxa de depressurização (200 bar e depressurização de 100 bar.min<sup>-1</sup>), em relação a melhor condição obtida com a matriz líquida.

### **5.2.1 Inativação de *Staphylococcus aureus* em função do tempo de tratamento a alta pressão e da carga bacteriana presente na amostra de salmão cru**

A fim de esclarecer o tempo necessário para que o dióxido de carbono supercrítico pudesse inativar diferentes cargas bacterianas presentes na amostra, foi avaliada a eficiência do mesmo na inativação de *Staphylococcus aureus* previamente impregnado em diferentes contagens em pedaços de salmão cru. As amostras foram submetidas a contaminação inicial superficial por 1 minuto em inóculos com diferentes cargas microbianas, obtendo-se contagens entre 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, em seguida submetidas a uma pressão inicial de 80 bar; logo após, 200 bar com pressurização de 30 bar.min<sup>-1</sup> e posterior depressurização (100 bar.min<sup>-1</sup>), com diferentes tempos de pressurização máxima, 15 minutos até 5 horas, a 33°C, conforme apresentado na Tabela 7.

Analisando os resultados do tratamento das amostras com carga inicial de 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, observa-se que o tratamento se mostrou totalmente eficaz, pois a partir de 15 minutos (0,2 h)

de exposição ao CO<sub>2</sub>, com inativação total do *S. aureus* previamente inoculado. Para se obter uma inativação total de *S. aureus* previamente inoculado em salmão com inóculo inicial de 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> são necessários 30 minutos de exposição a 200 bar. Já, com inóculo inicial de 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, não houve inativação total, mesmo com 5 horas de exposição a alta pressão, apenas redução das contagens (Tabela 7).

Tabela 7: Cinética de inativação de *S. aureus* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) em função do inóculo inicial (10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>), à pressão constante de 200 bar e despressurização de 100 bar.min<sup>-1</sup>.

Tempo (horas)	10 <sup>3</sup> UFC.g <sup>-1</sup>		10 <sup>5</sup> UFC.g <sup>-1</sup>		10 <sup>8</sup> UFC.g <sup>-1</sup>	
	Branco	Alta pressão	Branco	Alta pressão	Branco	Alta pressão
0,2	3,8	0	4,0	3,3	7,9	6,9
0,5	3,5	0	4,8	0	7,8	6,6
1	2,7	0	4,6	0	7,8	6,1
2	2,5	0	4,5	0	7,7	5,9
3	2,3	0	4,4	0	7,6	5,5
5	2,0	0	4,2	0	7,2	4,2

Ao analisar a Tabela 7, verifica-se que, quanto maior a carga microbiana inicial no produto, menor a eficácia do dióxido de carbono supercrítico na inativação de *S. aureus*. O efeito do parâmetro sobre o processo é evidente. A carga bacteriana inicial da amostra indica que a tecnologia é aliada da produção, porém jamais substituirá as boas práticas de fabricação e os cuidados higiênico sanitários ao longo da cadeia produtiva. Mesmo assim quando a carga bacteriana é alta, um aumento de tempo de tratamento induziu uma redução significativa na sobrevivência do micro-organismo. Embora o tratamento não tenha sido totalmente eficaz, obteve-se redução de 1,8 logs com 2 horas de tratamento a pressão de 200 bar. Observa-se alta correlação negativa (-0,98) entre o número de sobreviventes e o tempo de pressurização.

Em tratamento com dióxido de carbono supercrítico, a temperatura e o tempo são os fatores que influenciam significativamente a inativação microbiana (DEBS-LOUKA et al., 1999). A pressões mais elevadas, um tempo de tratamento mais curto pode ser utilizado para inativar o mesmo nível de células microbianas. Porém pressões mais elevadas influenciam na solubilização do CO<sub>2</sub> que agem na acidificação e expansão da membrana celular do micro-organismo, comparado a aplicação da técnica em alimentos líquidos onde o CO<sub>2</sub> tem maior facilidade de permear e com isso destruir o micro-organismo. Resultados divergentes foram encontrados por Ferrentino et al. (2013b) ao verificar que, a temperatura e pressão parecia

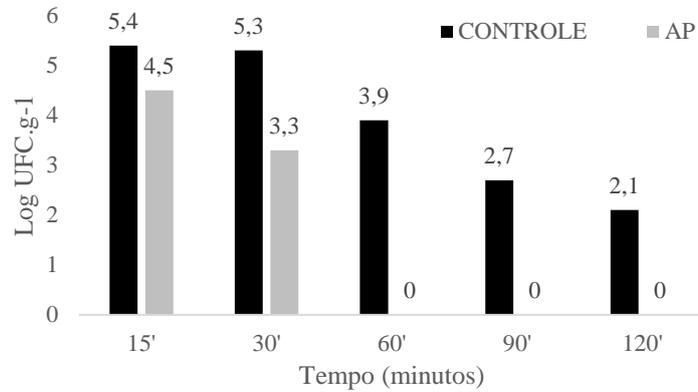
influenciar significativamente a inativação microbiana, enquanto o tempo de tratamento não mostrou influência, para 120 bar e 50°C, um aumento de tempo de 5 a 15 min não resultaram em qualquer melhoria de redução microbiana. Comportamento microbiano semelhante foi mostrado por Valverde et al. (2010), que relataram efeitos insignificantes do tempo de tratamento para inativação de *Saccharomyces cerevisiae* em pêras frescas. Estes autores defendem que em produtos sólidos, onde o contato entre o CO<sub>2</sub> e a amostra é direto, ao contrário do que acontece para substratos líquidos, o tempo de tratamento pode ser reduzido, uma vez que o CO<sub>2</sub> não precisa saturar o meio: o tempo de exposição necessário depende essencialmente da resistência específica das estirpes microbianas alvo.

Segundo Erkmen (2000), a dificuldade em inativar micro-organismos está relacionada à natureza da matriz e a presença de compostos como carboidratos e gorduras que podem desempenhar um importante papel na proteção dos micro-organismos e a dificultar a ação bactericida do dióxido de carbono, dados relatados pelo autor que investigaram a inativação de *Brochothrix thermosphacta* por SC-CO<sub>2</sub> (610 bar, 45°C, 150 min) em carne picada e relataram redução de 1 Log UFC.g<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes também foram obtidos por Sirisee et al. (1998) que testaram a tolerância ao CO<sub>2</sub> supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) de *E. coli* e *S. aureus* inoculados em carne moída a 42,5°C e 310 bar. Com base nestes resultados fixou-se a carga microbiana inicial de 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, para a contaminação das amostras e tempo de contaminação inicial por 1 minuto para estudos posteriores.

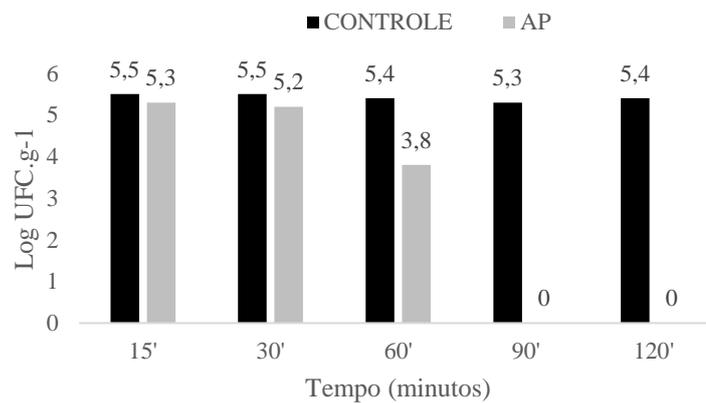
5.2.2. Inativação de *S. aureus* em salmão cru em função do tempo de tratamento a alta pressão e tempo de contato do inóculo com a amostra

Baseado no estudo anterior, optou-se por trabalhar com inóculo inicial com contagens em torno de 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> na suspensão bacteriana usada para inocular as amostras de salmão cru, visando obter-se contagens próximas a 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> nas amostras. As Figuras 11 A, B e C apresentam os resultados de inativação de *S. aureus* em salmão cru, após o contato com o inóculo durante 1, 30 e 60 minutos, respectivamente.

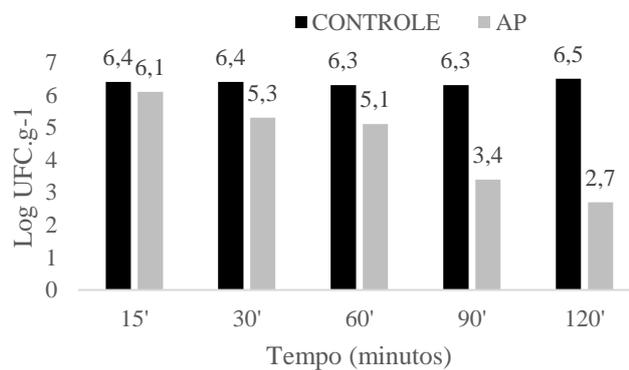
Figura 11 A, B e C: Contagem de colônias sobreviventes (Log UFC.g<sup>-1</sup>) em função do tempo de tratamento à pressão constante de 200 bar (AP) para o tempo de 1 minuto, 30 minutos e 60 minutos de contato da amostra com o inóculo (33°C, 100 bar.min<sup>-1</sup> de despressurização).



(A)



(B)



(C)

Analisando a Figura 11 A, observa-se que são necessários 60 minutos de exposição ao dióxido de carbono supercrítico (200 bar) para haver uma redução significativa na

sobrevivência do micro-organismo de cerca de 4 log, obtendo-se inativação total do micro-organismo.

Conforme mostra a Figura 11 B, o tempo de 30 minutos do salmão em contato com o inóculo fez com que a contaminação fosse menos superficial, ocasionando maior dificuldade para o CO<sub>2</sub> permear a matriz sólida e inativar o micro-organismo. Com 60 minutos de exposição à alta pressão, nas mesmas condições (200 bar e despressurização de 100 bar.min<sup>-1</sup>), observou-se uma redução de 1,6 Log UFC.g<sup>-1</sup>. Quando este tempo foi estendido para 90 minutos não houve permanência de *S. aureus*, comportamento microbiano diferente foi encontrado por Valverde et al. (2010), que relataram não haver influência do tempo na inativação de *Saccharomyces cerevisiae* em pêras frescas, embora o tempo tenha sido aumentado de 10 para 90 min a 100 bar. Eles postularam que em produtos sólidos, onde o contato entre o CO<sub>2</sub> e a amostra é direto, ao contrário do que acontece para substratos líquidos sem qualquer interferência no meio, o tempo de tratamento pode ser reduzido, pois o CO<sub>2</sub> não precisa saturar e neste caso o tempo de exposição depende mais da resistência da estirpe bacteriana alvo. Os resultados do presente trabalho indicam que a afirmativa feita por estes autores pode ser válida quando a contaminação é superficial, entretanto com contaminações no interior do produto, esta possibilidade de redução no tempo de tratamento pode não trazer os mesmos resultados.

A pressão de 200 bar, combinada com a taxa de despressurização de 100 bar. min<sup>-1</sup> à temperatura constante de 33°C, mostrou-se mais eficaz nos tempos de contaminação de 1 e 30 minutos, Figuras 11 A e B, com inativação total do *S.aureus*, a partir de 60 e 90 minutos de exposição a alta pressão, respectivamente.

A Figura 11 C, na condição de contaminação inicial de 1 hora de contato do salmão com o micro-organismo, resultou em uma contagem inicial de 1,9 x 10<sup>6</sup> a 2,5 x 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e redução de apenas 1,0 Log UFC.g<sup>-1</sup> com até 30 minutos de pressurização, chegando a 3,8 Log UFC.g<sup>-1</sup> com 120 minutos de pressurização.

Estudos de Damar e Balaban (2006) apresentam pesquisas com dióxido de carbono supercrítico sendo conduzidas usando suspensões de culturas puras com diferentes micro-organismos e aplicado preferencialmente a produtos alimentares líquidos, como sucos, cervejas, vinhos e leites.

As pesquisas com alimentos sólidos são excassas. Além disso, percebe-se que a inativação em matriz líquida é maior do que em matriz sólida. Segundo Garcia-Gonzalez et al. (2007) a taxa de inativação é fortemente afetada pelos constituintes do meio de cultura e pela composição do alimento, durante o processo com CO<sub>2</sub> pressurizado. Alimentos que possuem

característica físico-química complexa parecem exercer uma proteção das células microbianas quando comparados com soluções mais simples.

Damar e Balaban (2006), em suspensões de culturas puras de diferentes microorganismos, demonstraram que a inativação microbiana alcançada pela alta pressão com dióxido de carbono variou de 2-9 logs com pressões abaixo de 300 bar e temperaturas entre 5 a 60°C.

Soares et al. (2013) avaliaram a inativação de *Listeria monocytogenes*, através da utilização de dióxido de carbono supercrítico e observaram efeitos da temperatura, taxa de despressurização, ciclos de pressão e a proporção em massa de suspensão de células para o CO<sub>2</sub> sendo que a melhor condição experimental para inativar *L. monocytogenes* foi massa de suspensão de células para o CO<sub>2</sub> na proporção de 1:0,2, taxa de despressurização de 100 bar, 1 ciclo de pressão, a 33°C durante 2 h levando à redução de 6,1 log.

Segundo Valverde et al. (2010), mais pesquisas são necessárias para estudar o efeito específico da alta pressão de dióxido de carbono em alimentos. As condições de tratamentos devem ser otimizadas a fim de obter a maior descontaminação para cada produto e a menor perda sensorial, já que a comercialização bem-sucedida deste método depende fortemente do impacto do CO<sub>2</sub> nas propriedades organolépticas dos produtos.

Ferrentino et al. (2014), obtiveram reduções de cerca de 7 log em cenouras com temperatura fixa de 26°C, com 25 minutos de pressurização a 80 bar, e 10 minutos de pressurização a 120 bar. Quando se utiliza temperatura fixa no tratamento é recomendável variar a pressão para melhorar o desempenho do processo, porém neste estudo as contagens para *S. aureus* encontradas a partir de 60 minutos indicam que a pressão de 200 bar é adequada para o processo.

Segundo Erkmen (2000), bactérias Gram-positivas como *L. monocytogenes* e *S. aureus* são mais resistentes ao tratamento de alta pressão do que as Gram-negativas, porque apresentam parede celular mais espessa, apresentando uma espessura de 20 a 80 nm, enquanto que Gram-negativas apresentam um valor máximo de 20 nm. O tempo necessário para a difusão do CO<sub>2</sub> através da parede celular e a solubilização dos compostos no interior da célula de *S. aureus* (Gram-positiva) pode ser a causa da menor inativação nos primeiros 60 minutos. Isso permite explicar a dificuldade em reduzir a contaminação persistente quando a amostra de salmão permaneceu em contato com o inóculo de *S. aureus* durante 1 hora.

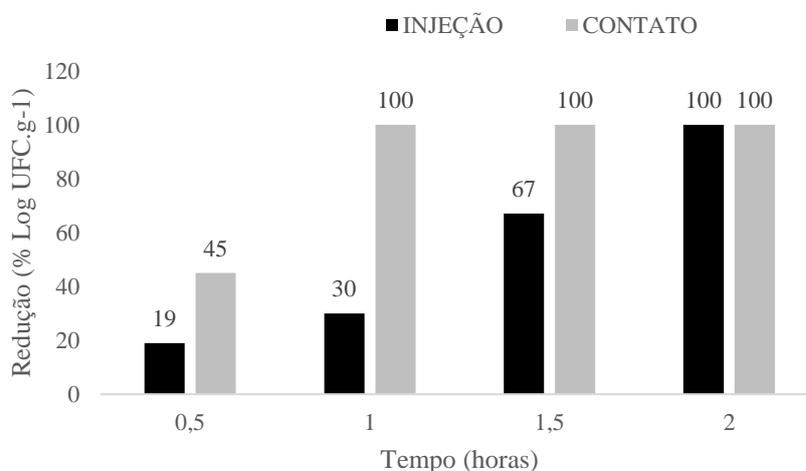
No que se refere a temperatura de trabalho no sistema, a taxa de inativação aumenta com o aumento da temperatura. Temperaturas altas estimulam a difusividade do CO<sub>2</sub>, e também

podem aumentar a fluidez através das membranas celulares para tornar mais fácil a penetração de CO<sub>2</sub>. No entanto, o tratamento não deve ser operado a temperaturas muito acima da temperatura crítica do CO<sub>2</sub> (31,1°C) porque dentro desta região a capacidade de solubilização do solvente diminui muito rapidamente à medida que a temperatura aumenta. Além disso, tratamento com dióxido de carbono supercrítico não deve ser realizado a temperaturas muito altas, pois poderia comprometer a qualidade dos alimentos em muitas aplicações (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

### 5.2.3. Inativação de *S. aureus* em salmão cru em função da forma de inoculação do micro-organismo

A fim de elucidar as questões relativas a dificuldade em inativar os micro-organismos quando em superfície e quando internamente inoculado conforme a matriz em estudo, foram realizados testes em salmão, porém com inoculação de 1 mL de inóculo de *S. aureus* no interior da amostra. A Figura 12, indica a redução de *S. aureus* em salmão quando tratado após a contaminação via injeção e contato (1min), mostrando que a remoção do micro-organismo é maior quando a amostra permanece em contato com o inóculo de *S. aureus* (contaminação superficial) e uma redução menor quando a amostra é contaminada via injeção (contaminação profunda).

Figura 12: Percentual de redução de *S. aureus* em função do tempo de tratamento e da forma de inoculação da bactéria no salmão.



Não há consenso entre os pesquisadores sobre a forma de efetuar a contaminação das amostras para os testes, assim optou-se pelo método que apresentou maior dificuldade em remover o micro-organismo.

Valverde et al. (2010), utilizou a contaminação superficial para o teste em pêras, deixando as mesmas entre 10 e 15 minutos em contato com *S. cerevisiae* a  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. Ferrentino et al. (2014), em seu estudo com cenouras, coco fresco e presunto utilizou 2 gramas de amostra em contato com o micro-organismo teste a  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> por 1 hora. Enquanto Choi et al. (2009), utilizou procedimento singular, 50 mL de solução estéril e 0,2% de solução salina misturada a fezes suínas formaram seu inoculo de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>, que foi misturado por 2 minutos a carne moída de porco e levada a refrigeração por uma noite para dar início ao tratamento.

#### 5.2.4. Otimização da inativação de *S. aureus* em salmão cru

A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo (valores reais e codificados) com as variáveis independentes de estudo e a resposta redução de *S. aureus* em Log e % Log (Log UFC.g<sup>-1</sup>). Em função dos resultados anteriores, inativação microbiana, a variável tempo de processo foi fixada em 2 horas, a amostra foi submetida a injeção com inóculo em torno de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> e temperatura de processo de 33°C. Os percentuais de redução variaram entre 28,0 e 100% (0,14 e 5,4 Log UFC.g<sup>-1</sup>), experimentos 5 e 10, respectivamente. Avaliando-se os resultados, verificou-se que a melhor condição para reduzir a contagem de micro-organismos (experimentos 4, 8 e 10) ocorrem com pressão igual ou superior a 220 bar e taxa de despressurização igual ou superior a 55 bar.min<sup>-1</sup>.

Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> (valores codificados e reais) e a resposta redução em Log e % de Log (Log UFC.g<sup>-1</sup>) de *S. aureus* utilizando SC-CO<sub>2</sub>.

Ensaio	VARIÁVEIS			RESPOSTAS	
	X1 Pressão (bar)	X2 Taxa (bar)	X3 Razão	Redução (Log)	Redução (% de Log)
1	(120)-1	(10)-1	(0,2)-1	0,79	13,79
2	(200)1	(10)-1	(0,2)-1	0,47	8,96
3	(120)-1	(100)1	(0,2)-1	1,04	17,24
4	(200)1	(100)1	(0,2)-1	5,30	100,0
5	(120)-1	(10)-1	(1,0)+1	0,14	2,64
6	(200)1	(10)-1	(1,0)+1	2,96	55,63
7	(120)-1	(100)1	(1,0)+1	0,98	16,89
8	(200)1	(100)1	(1,0)+1	4,14	73,18
9	(92,8) -1,68	(55)0	(0,6)0	1,14	21,72
10	(227) +1,68	(55)0	(0,6)0	5,40	100,0
11	(160)0	(<10)-1,68	(0,6)0	0,68	11,76
12	(160)0	(130)1,68	(0,6)0	1,23	21,99
13	(160)0	(55)0	(0,1)-1,68	0,92	18,42
14	(160)0	(55)0	(1,3)+1,68	1	20,0
15	(160)0	(55)0	(0,6)0	1,26	22,08
16	(160)0	(55)0	(0,6)0	0,92	17,06
17	(160)0	(55)0	(0,6)0	0,79	13,79

\*X<sub>1</sub>= pressão (bar), X<sub>2</sub>= taxa de despressurização (bar/min), X<sub>3</sub>= relação massa de suspensão de células. Variáveis independentes fixas: inóculo da suspensão injetada de 5x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de *S. aureus*, tempo de pressurização de 2 horas a 33°C.

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a redução de *S. aureus* em função das variáveis significativas analisadas (pressão e taxa de despressurização e razão), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 9) onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,89 e o F calculado 17,97 valor este maior que o valor tabelado (3,20), o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e/ou curva de contorno apresentadas na Figura 13 (a) e (b).

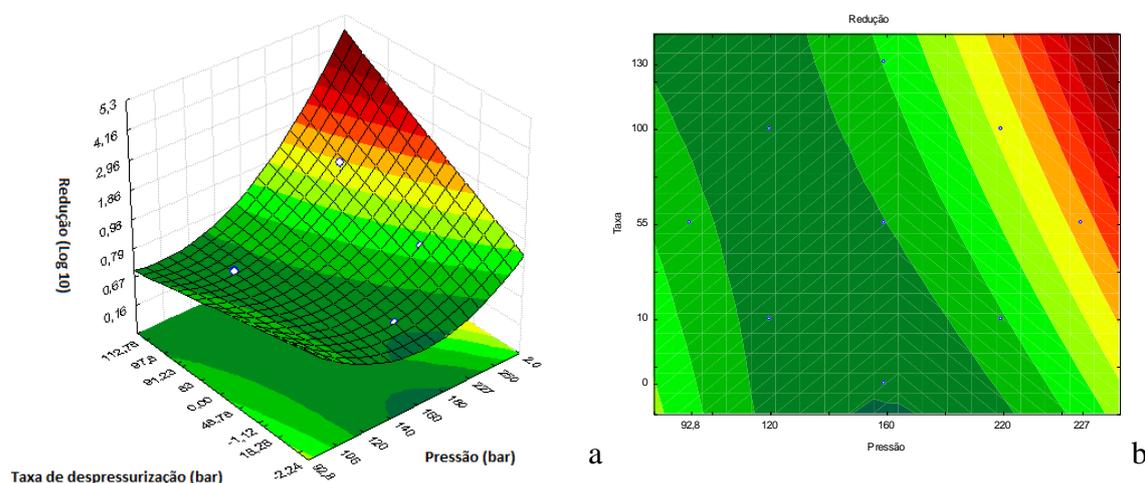
$$\text{Redução} = 0,97 + 1,25xP + 0,85P^2 + 0,58T + 0,61PxT - 0,38TxR$$

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a variável redução de *S. aureus* do DCCR 2<sup>3</sup>.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	39,40	5	7,88	17,97
Resíduo	4,82	11	0,44	
Falta de Ajuste	4,705	9		
Erro Puro	0,118	2		
Total	44,2192	16		
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $R^2 = 0,89$ ; $F_{tab} = 3,203874$				

Com base na resposta observada (Tabela 9) determinou-se o coeficiente de regressão por meio da técnica de mínimos quadrados para prever o modelo polinomial linear para redução microbiana (*S. aureus*). A análise de ANOVA indica que o modelo linear selecionado representa os dados de forma adequada. O modelo de regressão para a redução de *S. aureus* foi significativo ( $p < 0,05$ ) com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,89, indicando aptidão do modelo.

Figura 13: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução de *Staphylococcus aureus* em salmão.



Com base nestes resultados, a superfície de resposta gerada como uma função de pressão (92,8 - 220 bar) e taxa de depressurização (<10 - 100 bar.min<sup>-1</sup>), foram os fatores que influenciaram significativamente a inativação microbiana, enquanto a razão entre a massa de CO<sub>2</sub> e a massa de salmão, não foi significativa. Como mostrado na Figura 13 (a e b) a inativação microbiana aumenta com o aumento da pressão e da taxa de depressurização.

Notadamente, pressão e taxa de despressurização desempenham papéis muito importantes na inativação microbiana de alimentos sólidos por SC-CO<sub>2</sub>. Devido a complexidade da matriz (sólida) é mais difícil o CO<sub>2</sub> dissolver e penetrar no alimento e conseqüentemente atuar como bactericida. A combinação de pressão elevada com alta taxa de despressurização apresentaram efeito promissor. Jay (2005), postulou que os produtos do mar são mais promissores para inativação microbiana que outros produtos a base de carne por serem mais repletos de água e possuírem menos gordura do que os animais terrestres. Wei et al. (1991), obteve redução de 99% de *Listeria* em camarão após tratar os mesmos a 137 bar e 35°C por 2 h 23 min. Recentemente, Chen et al. (2015) relataram uma redução de 3 Log em camarão (*Litopenaeus vannamei*) após o tratamento SC-CO<sub>2</sub> a 150 bar, 45°C por 35 minutos. Meujo et al. (2010), relataram uma redução no nível de bactérias totais (TPC) na ordem de 2-3 Log com tratamento SC-CO<sub>2</sub> (100 bar, 37°C durante 30 minutos ou 170 bar por 60 minutos a 60°C).

Os poucos estudos publicados até agora sobre aplicabilidade SC-CO<sub>2</sub> à carne relatam a necessidade de condições severas para alcançar um determinado nível de inativação, porém não citam a taxa de despressurização como parâmetro estudado na inativação.

Dados reportados por Chen et al. (2015), realizados em camarões (*Metapenaeus ensis*) e conchas de moluscos (*Rapana venosa*) mostram que o efeito bactericida do SC-CO<sub>2</sub> foi significativamente melhorado pelo aumento de pressão e de temperatura. Este fenômeno foi consistente com os observados em outros estudos (GUNES et al., 2005, MEUJO et al., 2010) que relatam que pressão superior melhora a solubilização de CO<sub>2</sub>, mas o efeito estimulante é limitada pela capacidade de saturação CO<sub>2</sub>. Além disso, foi sugerido que a inativação microbiana por SC-CO<sub>2</sub> foi mais sensível à temperatura do que a pressão.

Dados divergentes foram encontrados por Soares et al. (2013), onde a proporção de massa de suspensão de células e CO<sub>2</sub> foi estatisticamente significativa, indicando que o aumento da proporção de CO<sub>2</sub> no sistema favorecia a inativação microbiana, porém o mesmo utilizou matriz líquida cuja inativação é facilitada devido a difusão celular quando comparado a alimentos sólidos, devido à complexidade da matriz, que torna ação bactericida mais difícil (FERRENTINO e SPILIMBERGO, 2011).

Durante o tratamento a alta pressão a membrana citoplasmática do micro-organismo é o alvo principal e, portanto, quanto maior a pressão de alimentação maior o efeito na redução. A pressão influencia a taxa de solubilização do CO<sub>2</sub> e uma pressão mais elevada pode melhorar o processo de acidificação do citoplasma da célula, permitindo a inativação da enzima chave, provocando distúrbio nas atividades de metabolismo celular e removendo os materiais

citoplásmicos de células bacterianas (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). Spilimbergo e Bertucco (2003) revelaram que, quando a pressão é aumentada para uma determinada medida, a solubilidade de CO<sub>2</sub> é aumentada em função da pressão inativando apenas micro-organismos planctônicos. Quando a pressão é medida acima do seu valor crítico (738 bar a 31,1°C), a difusividade do CO<sub>2</sub> é principalmente dependente da pressão, em vez da temperatura (ZHANG et al., 2006).

#### 5.2.5 Influência do tratamento com dióxido de carbono supercrítico sobre a Aw, cor e pH do salmão cru

Além das análises microbiológicas para determinação da redução de *S. aureus* após o tratamento com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>), também foram realizadas análises físicas do salmão (Aw, cor e pH). A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo (valores reais e codificados) com as variáveis independentes de estudo e respostas em termos de pH, Aw e cor em salmão, após tratamento com dióxido de carbono supercrítico para avaliar efeitos de pressão (92,8 a 227 bar), taxa de despressurização (<10 a 100 bar) e a proporção em massa de CO<sub>2</sub> e massa de salmão cru (0,2:1 a 1,0:1).

Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> (valores codificados e reais) e as respostas de Aw, cor e pH das amostras de salmão tratadas com SC-CO<sub>2</sub>.

Ensaio	VARIÁVEIS			RESPOSTAS (redução em relação a amostra não tratada)				
	X1	X2	X3	Aw	COR			pH
	Pressão (bar)	Taxa (bar/min)	Razão		Cor L	Cor A	Cor B	
1	(120)-1	(10)-1	(0,2)-1	0,011	1,58	-0,48	1,21	0,29
2	(220)1	(10)-1	(0,2)-1	0,009	-8,04	-2,28	-5,13	0,24
3	(120)-1	(100)1	(0,2)-1	0,004	5,61	-2,16	-0,66	0,31
4	(220)1	(100)1	(0,2)-1	0,008	5,23	1,65	1,52	0,2
5	(120)-1	(10)-1	(1,0)+1	0,023	-5,21	-3,58	-3,36	0,38
6	(220)1	(10)-1	(1,0)+1	0,015	1,26	-4,34	-3,02	0,23
7	(120)-1	(100)1	(1,0)+1	0,014	3,13	-2,19	-0,96	0,34
8	(220)1	(100)1	(1,0)+1	0,023	3,88	-4,80	-1,48	0,2
9	(92,8) -1,68	(0)55	(0,6)0	0,013	-9,96	-2,69	-4,69	0,2
10	(227) +1,68	(0)55	(0,6)0	0,004	-0,21	0,62	0,16	0,29
11	(160)0	(<10)-1,68	(0,6)0	0,012	-4,88	-0,77	-1,63	0,22
12	(160)0	(130)1,68	(0,6)0	0,016	-6,32	-0,35	-2,22	0,02
13	(160)0	(55)0	(0,1)-1,68	0,018	-3,92	-1,04	-2,19	0,24
14	(160)0	(55)0	(1,3)+1,68	0,023	-11,49	-2,18	-5,13	0,17
15	(160)0	(55)0	(0,6)0	0,011	-0,92	-2,89	-1,96	-0,05
16	(160)0	(55)0	(0,6)0	0,019	-1,19	-4,08	-2,6	0,01
17	(160)0	(55)0	(0,6)0	0,011	-0,52	-4,13	-2,07	0,1

\*X<sub>1</sub>= pressão (bar), X<sub>2</sub>= taxa de despressurização (bar/min), X<sub>3</sub>= Razão (relação massa de suspensão de células). Variáveis independentes fixas: 5x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de *S. aureus*, tempo de pressurização de 2 horas a 33°C.

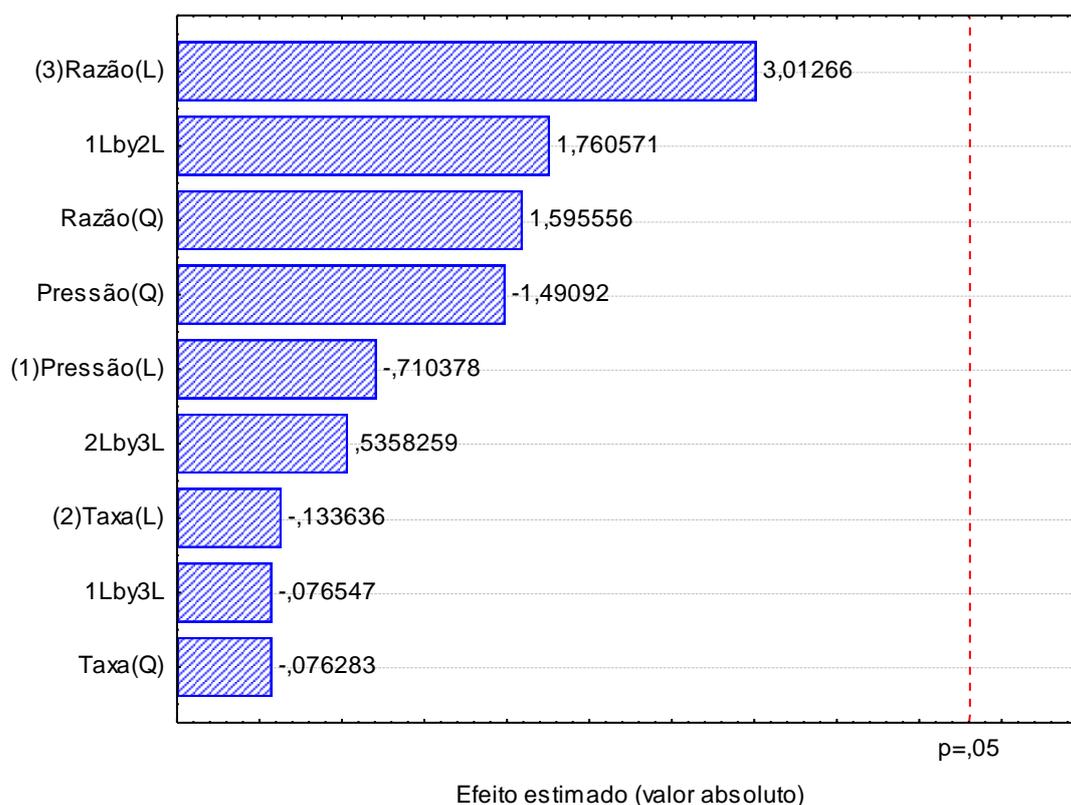
Os resultados obtidos na Tabela 10 foram tratados estatisticamente e apresentados como diagramas de Pareto, uma vez que não foi possível validar modelos estatísticos para nenhum dos parâmetros avaliados (Aw, cor e pH). Os resultados foram expressos como diferença em relação ao controle (salmão cru não submetido a alta pressão). Assim, valores positivos referem-se a redução em relação ao controle e valores negativos, a aumento em relação ao controle, após os diferentes tratamentos.

### Atividade de Água ( $A_w$ )

Os valores de  $A_w$  das amostras sob os diferentes tratamentos variaram entre 0,975 e 0,994, enquanto as amostras controle tiveram  $A_w$  média de 0,998.

Analisando a Figura 14, é possível verificar que nenhuma das variáveis avaliadas teve influência sobre a atividade de água ( $p > 0,05$ ), indicando que o tratamento do salmão cru com  $\text{CO}_2$  supercrítico nas faixas estudadas não interfere neste importante parâmetro físico.

Figura 14: Diagrama de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo  $2^3$  para a variação de atividade de água ( $A_w$ ) em SC- $\text{CO}_2$ .



Este resultado corrobora com resultados obtidos em alta pressão hidrostática. Dados obtidos por Slongo (2008), que ao tratar presunto em alta pressão hidrostática verificou que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de  $a_w$  entre as diferentes amostras (controle e diferentes condições de pressão), nem ao longo de 45 dias de armazenamento a  $4^\circ\text{C}$ . Resultados semelhantes também foram encontrados por Marcos et al. (2007) em salsichas

embaladas a vácuo submetidas ao processo de alta pressão hidrostática e armazenadas por 28 dias. Ros-Polski et al. (2015), concluíram em seu estudo com carne de frango em alta pressão hidrostática que o tratamento não teve nenhum efeito significativo sobre a  $A_w$  de amostras mesmo quando a mesma possuía NaCl. Nenhuma tendência ou relevante diferença foi observada como uma função dos parâmetros de alta pressão hidrostática. Isto pode ser devido a uma combinação complexa de efeitos entre tratamento a alta pressão, composição de proteína, gordura e outros constituintes que ocorrem simultaneamente. Contudo, o mecanismo, magnitude e direção do desvio de  $A_w$  como uma função de pressão não tenham ainda sido extensivamente estudados e relatados (FDA - FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2011), além de não terem sido encontrados trabalhos na literatura avaliando o efeito de  $CO_2$  supercrítico na  $A_w$  de alimentos.

#### Cor

Considerando que a aparência é uma das propriedades sensoriais que mais influência a preferência dos consumidores na compra de alimentos, foram realizados testes para verificar a alterações de cor. Os parâmetros de cor analisados apresentaram variações de 39,04 a 56,14; 8,28 a 13,24 e 10,07 a 16,41 para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , respectivamente. Já as amostras controle apresentaram valores de 50,53, 12,62 e 15,20 para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , respectivamente.

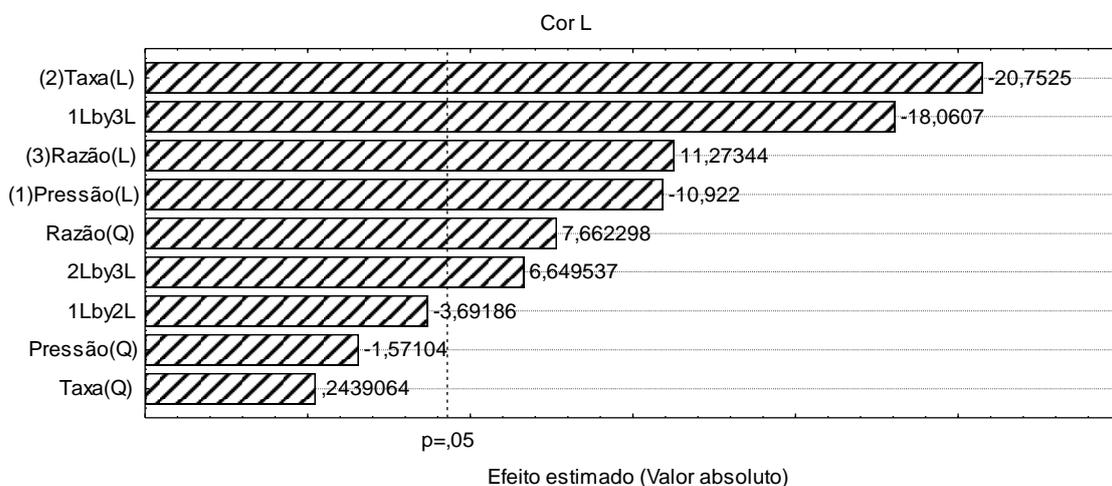
Os parâmetros são apresentados na Tabela 10, de acordo com as variações em relação a amostra controle. O parâmetro  $L^*$  (luminosidade) apresentou variação de -11,49 (ensaio 14) a -5,61 (ensaio 3) em relação ao controle. Esta escala apresenta valores que variam de zero (preto) a cem (branco), indicando que as amostras dos ensaios com diferença positiva em relação ao controle, apresentaram escurecimento da carne do salmão, enquanto as amostras dos ensaios com diferença negativa, ficaram mais claras em relação ao controle.

Os valores de  $a^*$  (cromaticidade) refletem cores, desta forma  $a^*$  maior que zero vai em direção ao vermelho e  $a^*$  menor que zero vai em direção ao verde. Os valores de  $a^*$  negativos (acréscimo em relação ao padrão) indicam diferença positiva em relação ao controle, ou seja, tendência de aumento da coloração vermelha, enquanto os valores positivos (redução em relação ao padrão) indicam tendência de aumento da cor verde. A coloração avermelhada é desejável em salmão. A escala de  $b^*$  (cromaticidade) também reflete cores e desta forma  $b^*$  maior que zero vai em direção ao amarelo e  $b^*$  menor que zero vai em direção ao azul.

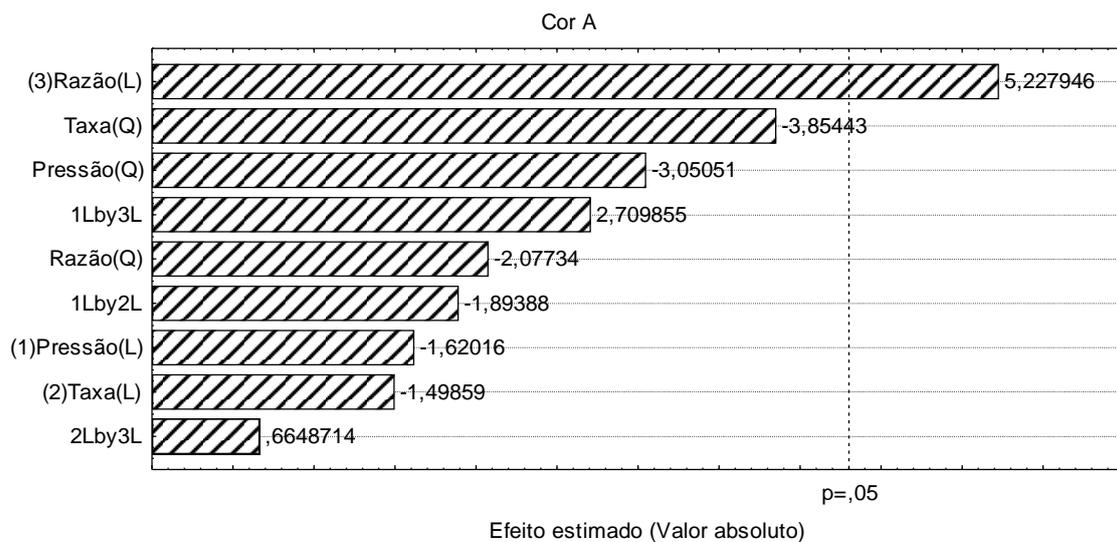
Os valores de  $b^*$  negativos (acréscimo em relação ao padrão) indicam diferença positiva em relação ao controle, ou seja, tendência de aumento da coloração amarela, enquanto os valores positivos (redução em relação ao padrão) indicam tendência de aumento da cor azul. A manutenção da cor em relação ao padrão ou tendência ao amarelo favorece a coloração avermelhada do salmão.

Por meio dos diagramas de Pareto (Figura 15 A, B e C) é possível identificar os efeitos dos tratamentos na cor das amostras. No parâmetro  $L^*$  (luminosidade – Figura 15A) o efeito apresenta-se negativo para taxa de despressurização e pressão, indicando que as maiores pressões e taxas de despressurização aumentam os valores de  $L^*$  em relação a amostra controle (tendência a ficar mais esbranquiçada). A razão entre a massa de  $CO_2$  e massa de salmão demonstrou efeito positivo, indicando que aumentos nesta proporção levam a um escurecimento das amostras. Para o parâmetro  $a^*$  (vermelho - Figura 15B) apenas a razão entre massa de  $CO_2$  e de salmão apresentou efeito significativo positivo, indicando que aumentos nesta razão provocam um deslocamento em direção ao verde. Com relação ao parâmetro  $b^*$ , (amarelo - Figura 15C) a razão massa de  $CO_2$  e de salmão apresenta efeito positivo provocando deslocamento em direção ao azul. A taxa de despressurização tem efeito negativo no parâmetro  $b^*$ , indicando que aumentos desta levam ao deslocamento em direção ao amarelo. A pressão não foi significativa para este parâmetro.

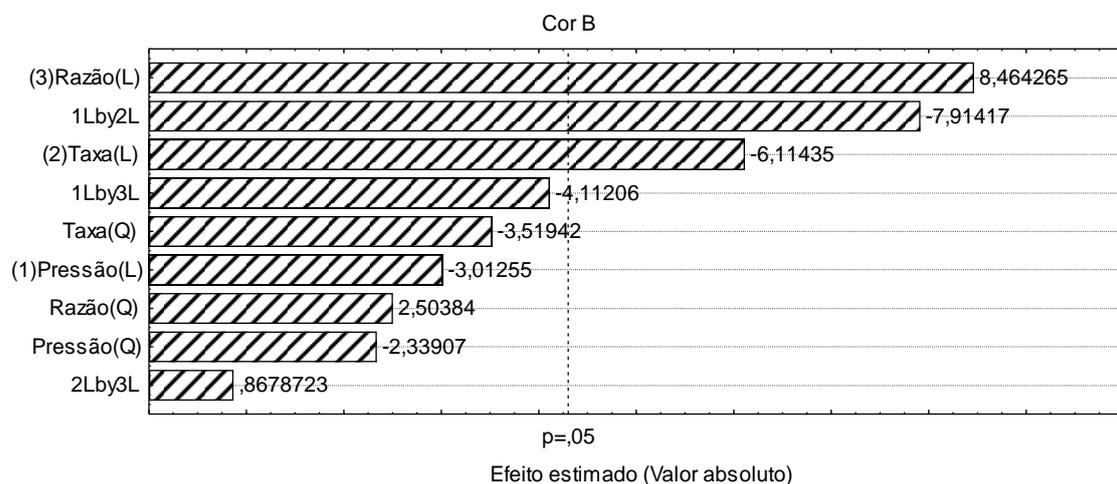
Figura 15: Diagrama de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo  $2^3$  para a inativação de *S. aureus* em SC- $CO_2$  para os parâmetros de cor em salmão ( $L$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ).



(A)



(B)



(C)

Relatos de Amanatidou et al. (2000) indicam que valores de  $L^*$  de salmão aumentaram conforme a intensidade e tempo de tratamento, tratamento a alta pressão de 1500 bar, durante 60 minutos ou 2000 bar durante 10 minutos resultaram em um produto opaco (valor  $L^* > 70$ ), valores de  $a^*$  que indicam a cor vermelha (a intensidade da cor do salmão) diminuíram com o aumento pressão e tempo de tratamento.

Há vários fatores que influenciam na cor do salmão, pois a maior parte dos carotenóides do salmão (Astaxantina,  $\beta$ -caroteno, astacene) podem reagir rapidamente com agentes oxidantes ou radicais livres (WOODALL et al., 1997). A mioglobina, também presente em peixes pigmentados pode agir como um catalisador de oxidação (DENG et al., 1977).

Estudos de Goto et al. (1993), recomendam tratamentos entre 0 e 5000 bar a 5°C durante 20 min para a carne de salmão. No estudo atual, no entanto a pressão só demonstrou influência

na luminosidade ( $L^*$ ). Segundo estes autores o efeito sobre a cor de salmão depende, não só da pressão, mas também do tempo no intervalo de 10-60 min. A cor do peixe é ditada, em grande parte por vários fatores ligados a pressão que podem ser inibidos ou estimulados por ela, assim como o pH que é estimulado pela pressão, os pigmentos, o estado químico e o grau de desnaturação, mas os mecanismos exatos de mudanças de cor não são elucidados. A perda da transluminescência da carne de peixe é devido a desnaturação de diferentes miosinas entre 1000 e 2000 bar, porém o fenômeno é complexo, acredita-se que seja através de efeito catalítico sobre a reação química entre  $O_2$ ,  $CO_2$  e os componentes do tecido (ANGUSPANICH e LEDWARD, 1998).

Estudos de Zhu et al. (2004), encontraram alterações significativas nos valores de  $L^*$  em amostras tratadas a 2000 bar, corroborando com os achados deste estudo onde o valor de  $L^*$  foi influenciado pela pressão porém tratado por pressão muito inferior, sendo o limite máximo de tratamento 227 bar, talvez isso explique a variação menor de cor no salmão tratado nos ensaios. Picouet et al. (2011), obtiveram os seguintes resultados para salmão quando processado por alta pressão: o brilho ( $L^*$ ) das amostras aumentou com a pressão até um valor significativo de 69,5 ( $P>0,05$ ) para o tratamento a 4000 bar, para valores de  $a^*$ , uma significancia ( $P<0,05$ ) decrescente de 2,3 pode ser observada para amostras tratadas a 2100 bar, e para outras duas amostras pressurizadas não houve nenhuma diferença significativa ( $P<0,05$ ), para o valor  $b^*$ , todas as amostras tratadas a alta pressão não apresentaram significancia ( $P<0,05$ ) com redução nos valores entre 2,0 e 2,1. A modificação do brilho devido ao tratamento também foi observado por Yağız et al. (2009) em salmão fresco e por vários autores (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; LAKSHMANAN et al., 2005) sobre salmão defumado frio, corroborando com os obtidos neste estudo.

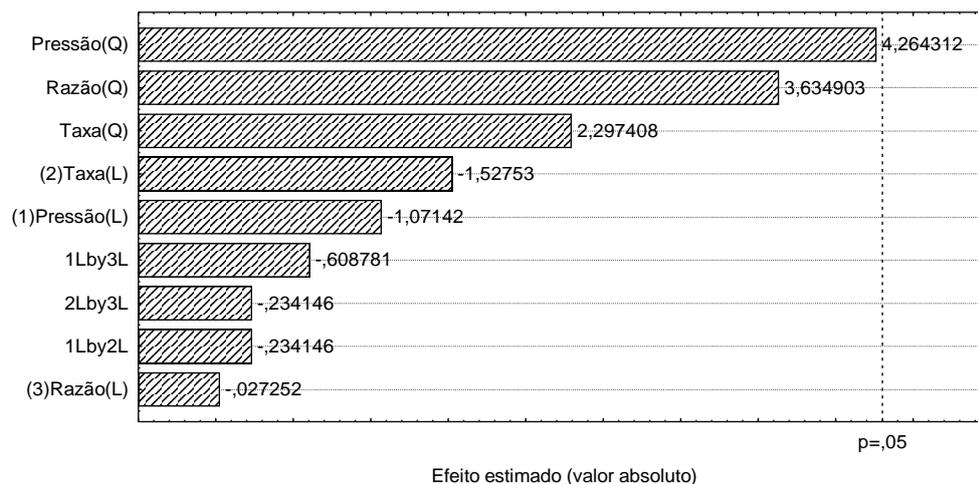
## pH

Os valores de pH das amostras sob os diferentes tratamentos variaram entre 6,12 e 6,55, enquanto as amostras controle tiveram pH médio de 6,50.

Analisando a Tabela 10, verifica-se que os valores de pH do salmão tratado com dióxido de carbono supercrítico não foram afetados de forma significativa pelo tratamento, fato que pode ser comprovado no diagrama de Pareto (Figura 16). Dados estes que corroboram com os de Ferrentino et al. (2013a), para presunto cozido fresco e processado, onde foi observado que o pH não foi significativamente afetado pelo tratamento com SC- $CO_2$  e, inclusive após o

armazenamento, o pH da amostra tratada permaneceu constante. Picouet et al. (2011), obtiveram valores de pH inicial em amostras frescas de salmão igual a 6,38.

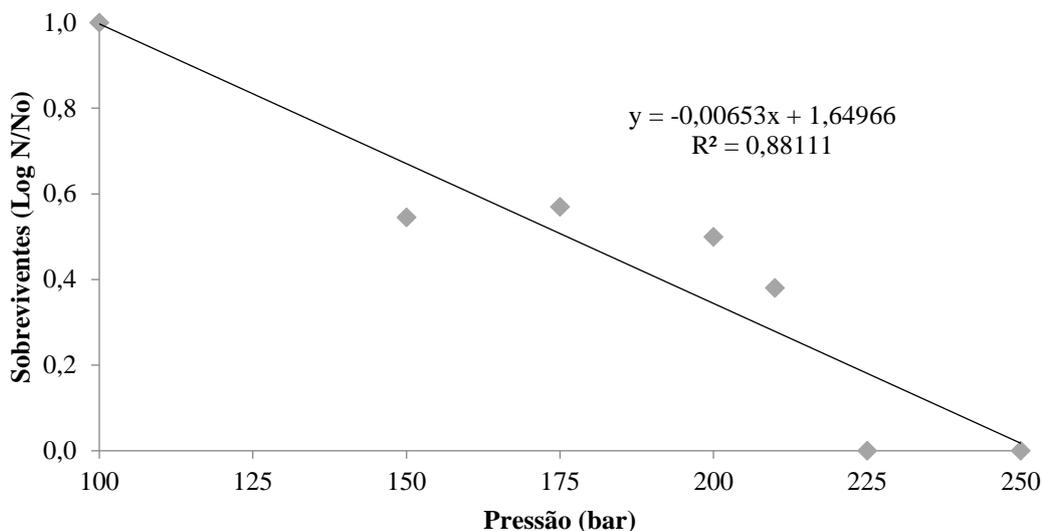
Figura 16: Diagrama de Pareto com efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo  $2^3$  para a inativação de *S. aureus* em SC-CO<sub>2</sub> para os valores de pH em salmão.



### 5.3 INFLUÊNCIA DA PRESSÃO E DO TEMPO NA INATIVAÇÃO DE *S. aureus* EM SALMÃO CRU USANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRTICO

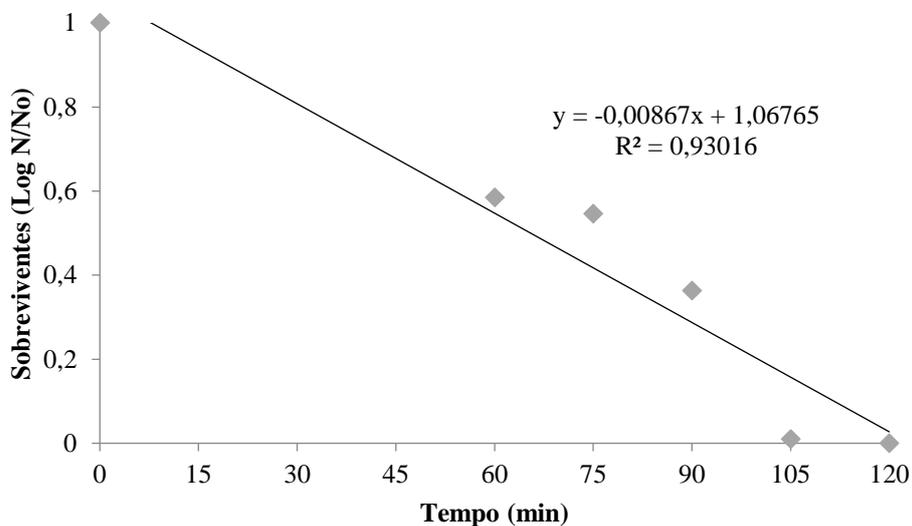
Os efeitos da pressão e do tempo de exposição ao CO<sub>2</sub> supercrítico sobre a inativação de *S. aureus* em salmão, foram avaliados também isoladamente, mantendo as demais condições fixas. Como a taxa de despressurização teve efeito significativo positivo na inativação de *S. aureus* e seu aumento não influencia em custos do processo, fixou-se a taxa de despressurização em 130 bar. A razão entre a massa de CO<sub>2</sub> e de salmão foi fixada em 0,6:1, uma vez que a mesma teve pouca influência nos diferentes parâmetros avaliados e esta razão facilita a utilização do equipamento. A temperatura foi mantida constante (33 °C), como em todos os demais experimentos e o tempo de processo foi de 120 minutos. Foram realizados experimentos com 100, 150, 175, 200, 210, 225 e 250 bar de pressão (Figura 17).

Figura 17: Inativação de *Staphylococcus aureus* em função da pressão.



A inativação completa da carga inicial de *S. aureus* previamente inoculada em salmão foi obtida a pressão de 252,6 bar, conforme a equação  $Y = -0,00653x + 1,64966$  (Figura 17).

Figura 18: Cinética de inativação de *Staphylococcus aureus* em função do tempo.



A inativação completa da carga inicial de *S. aureus* previamente inoculada em salmão foi obtida a partir de 123,1 minutos de processo, conforme a equação  $Y = -0,00867x + 1,06765$  (Figura 18), correspondendo a uma redução de cinco ciclos logarítmicos. Por outro lado, quando apenas o inóculo de *S. aureus* foi submetido ao tratamento (matriz líquida), a inativação de

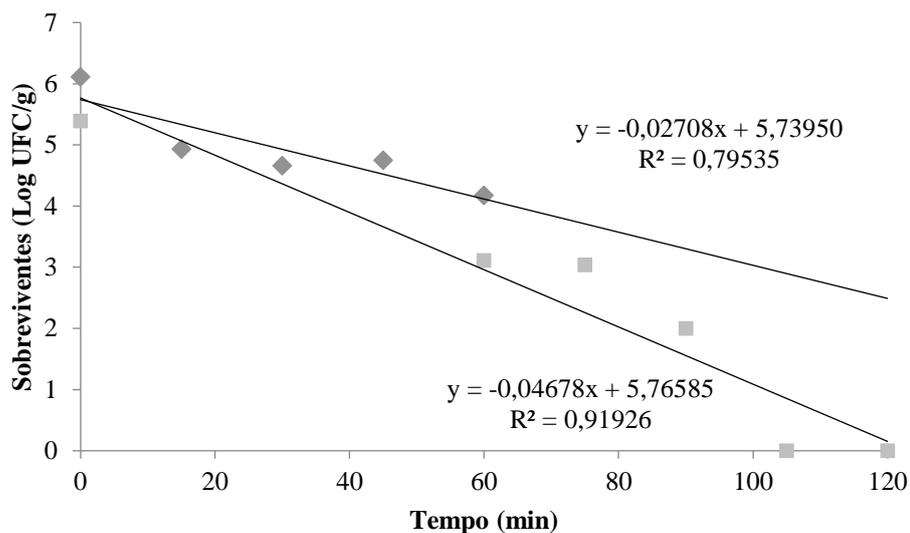
100% da carga inicial foi alcançada com apenas 60 minutos de processo, correspondendo a uma redução de 6,46 ciclos logarítmicos.

A diferença entre o tempo necessário para uma completa inativação do micro-organismo quando está presente no alimento e quando está em um caldo líquido (cultura pura) pode ser explicada pelo fato que, a presença de gordura, proteínas e outros constituintes do alimento, como acontece no salmão, provavelmente dificultam a penetração do CO<sub>2</sub> nas células e, conseqüentemente, o grau de inativação. Erkmen (2000), observou que a inativação de *E. coli* em leite integral não foi tão eficiente quanto a inativação do micro-organismo em caldo, sugerindo que a gordura, presente no leite, possivelmente aumentou a resistência do micro-organismo ao tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado.

Chen et al. (2015), postulou que, a redução logarítmica na contagem total de mesófilos de camarão e conchas melhora quando há um aumento acentuado no tempo de exposição e temperatura (com uma pressão de 140 bar). Além disso, a interação entre o tempo de exposição e temperatura também era óbvio. O tempo de exposição é considerado o fator mais significativo na inativação microbiana por SC-CO<sub>2</sub>, com base na análise de variância de modelos térmicos. Uma conclusão contraditória foi relatada por Ferrentino et al. (2012), que verificaram que o tempo de tratamento por SC-CO<sub>2</sub> não influencia significativamente a inativação microbiana.

Considerando os resultados obtidos anteriormente, realizou-se estudo para avaliar a inativação de *S. aureus* em função de diferentes tempos de pressurização (0 a 120 min.) em diferentes pressões. A Figura 19 apresenta as cinéticas de inativação a 150 e 225 bar. A razão e taxa de despressurização foram mantidas constantes conforme o ponto central do planejamento (0,6:1 massa de CO<sub>2</sub>:massa de inóculo e 55 bar/min, respectivamente).

Figura 19: Cinética de inativação de *S. aureus* com pressão de 150 e 225 bar.



A Figura 19 apresenta a redução de *S. aureus* em diferentes pressões (150 e 225 bar), onde observa-se o número de sobreviventes (Log UFC/g) diminuir à medida que se aumenta a pressão do sistema, permitindo desta forma reduzir o tempo de tratamento. É possível verificar que a 150 bar a inativação ocorre de forma lenta com valor D igual a 36,92 minutos. Porém com pressão de 225 bar a redução de aproximadamente 5 Log é alcançada em 123,2 minutos de tratamento, obtendo-se valor D igual a 21,37 minutos.

Estudos de Cappelletti et al. (2015), realizados com carne suína, demonstraram que um aumento de 60 para 160 bar permitiu aumentar, mas não significativamente, a inativação microbiana: a uma temperatura fixa de 35°C, 60 min foram necessários para alcançar cerca de 3 reduções de Log a 80, 120 e 160 bar. É bem sabido que em pressões mais altas ocorre aumento significativo da densidade e do poder de solvatação do CO<sub>2</sub>, o que, promove o contato com as células, induzindo a remoção de constituintes vitais de células ou membranas celulares (Damar et al., 2009). No entanto, este aumento é limitado pela solubilidade de saturação do CO<sub>2</sub>: uma vez que o meio de tratamento é saturado com CO<sub>2</sub>, o efeito do agente bactericida não se alterou significativamente.

Estudos de Chen et al. (2015), realizados com camarão e conchas, encontraram resultados semelhantes ao deste estudo, eles postularam que o efeito bactericida de SC-CO<sub>2</sub> foi aumentado significativamente por aumentos na pressão ou temperatura. Quando a pressão foi aumentada para 140 bar e a temperatura foi elevada para 45°C (com um tempo de exposição de 35 min), observou-se uma redução de 3,1 Log na contagem total de mesófilos em camarão,

enquanto em conchas, a redução logarítmica encontrada foi de 2,71. O tempo de exposição foi considerado o fator mais importante para a inibição microbiana por SC-CO<sub>2</sub>.

A cinética de destruição de microrganismos depende não apenas dos parâmetros de pressão, como também o tipo e a composição dos alimentos. Neste estudo obtivemos valores D de 46,7; 26,3 e 17,3 para matriz líquida tratada durante 120 minutos a 100, 130 e 160 bar respectivamente, enquanto para salmão cru os valores D foram de 36,92 e 21,37 minutos a 150 e 225 bar. Sirisee et al. (1998), trataram carne moída suína inoculada com *Escherichia coli* em forma de pedaços e suspensão de células com SC-CO<sub>2</sub> (42,5°C e 310 bar) e depois compararam os valores D dos dois Sistemas. Eles observaram que 178 min eram necessários na carne moída para alcançar redução de 1 Log, já quando a amostra se encontrava em suspensão apenas 1,7 min foram necessários, indicando que os atributos estruturais do produto (carne de porco moída) têm influência na eficácia do tratamento, mas que o tratamento foi considerado suave em comparação com outras técnicas utilizando SC-CO<sub>2</sub>. Estes resultados mostram que o SC-CO<sub>2</sub> tem um amplo escopo para uso prático na descontaminação da carne de porco moída. Estudo realizado Erkmen (1998), investigou a inativação de *Brochothrix thermosphacta* com SC-CO<sub>2</sub> em carne picada e obteve redução de 1 Log (UFC/g) com 61 bar a 45°C e 150 min. Segundo este autor, o tempo de tratamento considerado longo foi atribuído à natureza da matriz e à presença de compostos como carboidratos e gorduras que poderiam desempenhar papel na proteção de microrganismos ao tratamento em alta pressão de CO<sub>2</sub>.

## 6. CONCLUSÕES

A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

O tratamento com dióxido de carbono supercrítico apresenta efeito positivo na inativação de *Staphylococcus aureus* em cultura pura e em salmão cru;

Os resultados mostraram que a pressão tem influência significativa na inativação de *S. aureus* em cultura pura, enquanto a taxa de despressurização e a razão entre a massa de inóculo e a massa de CO<sub>2</sub> não foram significativa ( $p < 0,05$ );

A cinética de inativação em cultura pura de *S. aureus*, mostrou que o número de sobreviventes diminuiu com o aumento da pressão, sendo que a 130 bar e 120 minutos, houve inativação total de *S. aureus*;

Os tempos de redução decimal em cultura pura (Valor D) variaram de 17,43 a 46,7 min com pressões entre 100 e 160 bar;

Com relação às análises em salmão cru, verificou-se que, quanto maior a carga microbiana inicial no produto, menor a eficácia do dióxido de carbono supercrítico na inativação de *S. aureus*.

Com relação ao tempo de exposição do salmão ao *S. aureus* e ao tempo de tratamento com dióxido de carbono supercrítico, foi possível observar que o tratamento se mostrou mais eficaz nos tempos de contaminação superficial de 1 e 30 minutos, com inativação total do *S. aureus*, a partir de 60 e 90 minutos de exposição a alta pressão, respectivamente.

Quanto a forma de inoculação de *S. aureus* no salmão, ficou evidente que a redução microbiana é maior quando a contaminação é superficial;

A pressão (92,8 a 220 bar) e taxa de despressurização ( $< 10$  a  $100 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ ), foram os fatores que influenciaram significativamente a inativação microbiana, enquanto a razão entre a massa de CO<sub>2</sub> e a massa de salmão, não influenciou o sistema de forma isolada, ou seja, a inativação microbiana aumenta com o aumento da pressão e da taxa de despressurização, porém quando há interação entre a taxa de despressurização e a razão, houve influência significativa.

Com relação a Aw, cor e pH, o tratamento com dióxido de carbono supercrítico não exerceu influência sobre a Aw e pH e com relação a cor há influência significativa. No parâmetro L\* o efeito apresenta-se negativo para taxa de despressurização e pressão, levando a um escurecimento das amostras. Para o parâmetro a\*, vermelho, apenas a razão entre massa de CO<sub>2</sub> e de salmão apresentou efeito significativo positivo, indicando que aumentos nesta razão provocam um deslocamento em direção ao verde. Já, para o parâmetro b\*, amarelo, a razão

massa de CO<sub>2</sub> e de salmão apresenta efeito positivo provocando deslocamento em direção ao azul. A taxa de despressurização tem efeito negativo no parâmetro b\*, indicando que aumentos desta levam ao deslocamento em direção ao amarelo. A pressão não foi significativa para este parâmetro;

A cinética de inativação de *S. aureus* para avaliar o efeito da pressão em salmão cru (100 a 225 bar), mostrou que o número de *S. aureus* sobreviventes diminuiu com o aumento da pressão, sendo que a 252,6 bar houve inativação total de *S.aureus*. A inativação completa da carga inicial de *S. aureus* com pressão de 225 bar foi obtida a partir de 123,1 minutos de processo, correspondendo a uma redução de aproximadamente cinco ciclos logarítmicos. Os tempos de redução decimal em salmão cru (valor D) variaram de 21,37 a 36,92 min com pressões de 150 e 225.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Conforme os resultados apresentados neste 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 outros produtos alimentícios,
- 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;
- Determinação de “Shelf life”;

## 8. PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS

A. Importância da tecnologia Supercrítica para a inocuidade dos alimentos. **Prêmio**. VII Congresso Latino Americano XIII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos. Armação de Buzios, Rio de Janeiro, Brasil 28 de Abril a 01 de Maio de 2015.

B. J. Barbosa, M. Cuppini, C. Steffens, G. Toniazzo, R. L. Cansian, E. Franceschi. Tecnologia Supercrítica para Controle de *Staphylococcus aureus* em salmão cru. **VII Congresso Latino Americano XIII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**. Armação de Buzios, Rio de Janeiro, Brasil 28 de Abril a 01 de Maio de 2015.

C. Barbosa, J., Cuppini, M., Toniazzo, G., Cansian, R. L., Franceschi, E. Tecnologia supercrítica para controle de *Staphylococcus aureus* em salmão cru. **Higiene Alimentar**. v.29, n. 242/243, p.2973 - 2977, 2015. Encarte eletrônico.

D. J. Zeni, M. Cuppini, J. Barbosa, E. Franceschi, G. Toniazzo, R. L. Cansian. Planejamento de Experimentos aplicado na inativação de *S. aureus* com SC-CO<sub>2</sub> em Salmão Cru. **5º Simposio de Segurança Alimentar**. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil, 26 a 29 de maio de 2015.

E. Cuppini M., Barbosa J., Toniazzo G., Cansian R. L. Cinética de inativação de **Staphylococcus aureus** em salmão cru (matriz sólida) utilizando fluido pressurizado. **II CSBEA – 20 Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos – 04 a 07 de Outubro, 2015, Blumenau, SC, Brasil.**

F. J. Barbosa, M. Cuppini, I. A. Fernandes, G. Toniazzo, R. L. Cansian, E. Franceschi. Influência do tempo de contaminação no controle de *Staphylococcus aureus* por tecnologia supercritica em salmão cru. **1<sup>TH</sup> International Congress of Management, Technology and Innovation** - September 21-25, 2015, Erechim, RS, Brazil

G. J. Barbosa, M. Cuppini, I. A. Fernandes, G. Toniazzo, R. L. Cansian. Inativação de *Staphylococcus aureus* em matriz líquida com dióxido de carbono a diferentes pressões. **IX SIAL – Simpósio de Alimentos – 15 e 16 de outubro de 2015, Passo Fundo/RS, Brazil.**

H. M. Cuppini, J. Zeni, J. Barbosa, E. Franceschi, G. Toniazzo and R. L. Cansian. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Raw Salmon with Supercritical CO<sub>2</sub> using Experimental Design. **Food Science and Technology** (Campinas), 36 (Suppl. 1): 8-11, Apr. 2016.

I. J. Barbosa, M. Cuppini, B. Fisher, A. Junges, E. Franceschi, G. Toniazzo, R. L. Cansian. Determinação de valores D e Z para inativação de *Staphylococcus aureus* por tecnologia supercritica em matriz liquida. **2th International Congress of Management, Technology and Innovation. III Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. September 26-30, 2016, Erechim, RS, Brazil.

J. J. Barbosa, M. Cuppini, B. Fisher, A. Junges, E. Franceschi, G. T. Backes, R. L. Cansian. Efeito da pressão na inativação de *Staphylococcus aureus* por tecnologia supercrítica em matriz líquida. **2th International Congress of Management, Technology and Innovation. III Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. September 26-30, 2016, Erechim, RS, Brazil.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANATIDOU, A.; SCHLÜTER, O.; LEMKAU, K.; GORRIS L.G.M.; SMID, E.J.; KNORR, D. Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.1, n. 2, p. 87-98, 2000.

ANGUSPANICH, K.; LEDWARD, D. A. High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. **Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p.39-50, 1998.

APHA, American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3ª ed. Whashington: DCC Vanderzant & DF Splittstoesser, 2001.

ARREOLA, A.G.; BALABAN, M.O.; WEI, C.I.; PELOW, A.; MARSHALL, M.; CORNELL, J. Effect of supercritical carbon dioxide on microbial populations in single strength juice. **Journal of Food Quality**. V.14, p. 275–284, 1991.

BERK, Z. Spoilage and Preservation of Foods, In Food Science and Technology, edited by Zeki Berk, Academic Press, San Diego, **Food Process Engineering and Technology (Second Edition)**, p. 395-398, 2013.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011**. Brasília: SVS, 2011. Disponível em: <[http://www.portal.saude.gov.br/.../dados\\_epidemiologico\\_dta\\_15911](http://www.portal.saude.gov.br/.../dados_epidemiologico_dta_15911)>. Acesso em: 04/08/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução: RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 19/05/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 1998. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf) >. Acesso em: 19/05/2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providências**. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília. 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRIONES, L. S.; REYES, E.J.; TABILO-MUNIZAGA, E.G.; PÉREZ-WON, O.M.; Microbial shelf-life extension of chilled Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and abalone (*Haliotis rufescens*) by high hydrostatic pressure treatment, **Food Control**, v. 21, Issue 11, p. 1530-1535, 2010.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing, **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21–33, 2005.

CAIA (Canadian Aquaculture Industry Alliance); **Aquaculture Benefits and Impacts on the Environment**. 2013. Disponível em: <[http://www.aquaculture.ca/files/documents/2013-11-19FarmedSeafoodandCanadianHealth\\_Paper.pdf](http://www.aquaculture.ca/files/documents/2013-11-19FarmedSeafoodandCanadianHealth_Paper.pdf)>. Acesso em: 10.08. 2015.

CARDOSO, P. J. Supercritical fluid extraction and characterization of oil from hazelnut. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v.104; p.402-409, 2002.

CASAS, J.; VALVERDE, M. T.; MARÍN-INIESTA, F.; CALVO, L. Inactivation of alicyclobacillus acidoterrestres spores by high pressure CO<sub>2</sub> in apple cream. **International journal of food microbiology**, v. 156, n. 1, p. 18-24, 2012.

CAPPELLETTI, M.; FERRENTINO, G.; SPILIMBERGO, S. High pressure carbon dioxide on pork raw meat: Inactivation of mesophilic bacteria and effects on colour properties, **Journal of Food Engineering**, v. 156, p. 55-58, 2015.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks. United States, 2008. **MMW - Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 9, n.35, p. 1197-202. 2011.

CHEN, M.; SUI, X.; MA, X.; FENG, X.; HAN, Y. Application of response surface methodology to optimise microbial inactivation of shrimp and conch by supercritical carbon dioxide, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1016-1023, 2015.

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, KIM Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and E. coli O157:H7 in marinades and marinated pork, **Meat Science**, v. 82, n. 4, p. 419-424, 2009.

CHOI, Y. M.; RYU, Y. C.; LEE, S. H.; GO, G. W.; SHIN, H. G.; KIM, K. H.; RHEE, M. S.; KIM, B. C. Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine longissimus dorsi muscle. **LWT - Food Science and Technology**, v 41, p 317-322, 2008.

CHOUHAN, A.; KAUR, B. P.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing and thermal treatment on quality of hilsa (Tenulosa ilisha) fillets during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 151-160, 2015.

CLIFFORD, A. A., WILLIAMS, J. R. Introduction to supercritical fluids and their applications. In: Supercritical fluid methods and protocols. Totowa, NJ: **Human Press Inc**. p.1-15, 2000.

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

COSTA, M.C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; HEDDERLEY, D.; FREWER, L. Non conventional technologies and impact on consumer behavior, **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 4-5, p. 188-193, 2000.

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, n.1, p. R1-R11, 2006.

DAMAR, S., BALABAN, M.O., SIMS, C.A. Continuous dense-phase CO<sub>2</sub> processing of a coconut water beverage. **International Journal Food Science Technology**. v. 44, p. 666-673, 2009.

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

DEBS-LOUKA E.; LOUKA, N.; ABRAHAM, G.; CHABOT, V.; ALLAF, K. Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. **Appl Environ Microbiol**, v.65, n. 2, p. 626-631, 1999.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BALABAN, M.O.; TALCOTT, S.T. Microbial stability, phytochemical retention, and organoleptic attributes of dense phase CO<sub>2</sub> processed muscadine grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5468-5473, 2006.

DENG, J. C.; MATTHEWS, R. F.; WATSON, C. M. Effect of chemical and physical treatments on rancidity development of frozen mullet *Mugil cephalus* fillets. **Journal of Food Science**. v. 42, n. 2, p. 344-347, 1977.

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

DIELS A.M.; 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, n. 2, p. 165-175, 2005.

DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms Por: **Critical reviews in microbiology**, v. 32, n. 4, p. 201-216, 2006.

DILLOW, A.K., DEGHANI, F., HRKACH, J.S., FOSTER, N.R., LANGER, R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 10344-10348, 1999.

- DOONA, C. J.; FEEHERRY, F.E. **High Pressure Processing of Foods**, Oxford, UK, 272p. 2007.
- ENOMOTO, A.; NAKAMURA, K.; HAKODA, M.; AMAYER, N. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 83, n. 3, p. 305-307, 1997.
- ERKMEN, O. Antimicrobial effects of pressurized carbon dioxide on *Brochothrix thermosphacta* in broth and foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1365–1370, 1998.
- ERKMEN, O., KARAMAN, H. Kinetics studies on the high carbon dioxide pressure inactivation of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 1, 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.
- ESTEVEZ, T.M; MEHL, A.; PESSOA, F. L.P. Montagem do aparato experimental para estudo de equilíbrio de fases a altas pressões via metodologia sintética visual. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 27 a 30 de julho, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.
- 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.
- FDA - Food and Drug Administration. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. **Guidance for the Industry**: 4° ed. Florida Sea Grant. 476p. 2011.
- FERRENTINO, G., PLAZA, M.L., RAMIREZ-RODRIGUES, M., FERRARI, G., BALABAN, M.O. Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. **Journal of Food Science**, v.74, P.333–341, 2009.
- FERRENTINO, G.; BALZAN, S.; SPILIMBERGO, S. Optimization of supercritical carbon dioxide treatment for the inactivation of the natural microbial flora in cubed cooked ham International **Journal of Food Microbiology**, v. 161, p.189–196, 2013a.
- FERRENTINO, G.; BALZAN, S.; DORIGATO, A.; PEGORETTI, A.; SPILIMBERGO, S. Effect of supercritical carbon dioxide pasteurization on natural microbiota, texture and microstructure of fresh cut coconut. **Journal of Food Science**, v. 77, p.137-143. 2012.
- FERRENTINO, G.; BALZAN, S.; SPILIMBERGO, S. Supercritical carbon dioxide processing of dry cured ham spiked with *Listeria monocytogenes*: inactivation kinetics, color and sensory evaluations. **Food and Bioprocess Technology**, v.6 n.5 p. 1164-1174, 2013b.
- FERRENTINO, G.; CALLIARI, N.; BERTUCCO, A.; SPILIMBERGO, S. Validation of a mathematical model for predicting high pressure carbon dioxide inactivation kinetics of *Escherichia coli* spiked on fresh cut carrot, **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, p. 17-23, 2014.
- FERRENTINO, G.; SPILIMBERGO, S. High pressure carbon dioxide pasteurization of solid foods: current knowledge and future outlooks, **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 427–441, 2011.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed., Artmed, Porto Alegre, 602p, 2013.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, Ateneu, São Paulo 182p, 2008.
- FROELICH; A.; VILLAVINCENCIO; A.L.C.H.; VANETTI; M.C.D. Potential of ionizing radiation and supercritical CO<sub>2</sub> in the inactivation of *Bacillus cereus* in black pepper. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 303-308, 2009.
- GALVÃO, J. A; OETTERER, M. **Qualidade e processamento de pescado**. 1°ed. Editora Elsevier. p. 256, 2014.

GALVANIN, F.; LUCA R.; FERRENTINO, G.; BAROLO, M.; SPILIMBERGO, S.; BEZZO, F. Bacterial inactivation on solid food matrices through supercritical CO<sub>2</sub>: A correlative study, **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 146-157, 2014.

GARCIA, F. PqC do Pólo Regional Noroeste Paulista/APTA. O que podemos aprender e aplicar na Aqüicultura Brasileira? **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 8, n. 91, 2011.

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.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5ª ed. Editora Manole, São Paulo, 1112p. 2015.

GOTO, H., KAJIYAMA, N., NOGUCHI, A. **High pressure bioscience and food science**, Hayash, Kyoto, 321p. 1993.

GOULD, G. W. **New Methods of Food Preservation**; First Edition, London, 324p. 1995.

GOULD, G. **Preservation principles and new technologies**; In Woodhead Publishing Series in Food Science, **Technology and Nutrition**, v. 1, Second Edition p. 547-580, 2009.

GUDBJORNSDOTTIR, B.; JONSSON, A.; HAFSTEINSSON, H.; HEINZ, V. Effect of high-pressure processing on *Listeria* spp. and on the textural and microstructural properties of cold smoked salmon, **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.366-374, 2010.

GUNES, G.; BLUM, L.K.; HOTCHKISS, J.H. Inactivation of yeasts in grape juice using a continuous dense phase carbon dioxide processing system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2362–2368, 2005.

HAAS, G.J.; PRESCOTT, H.E.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE, L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 253–265, 1989.

HEINZ, V.I.; BUCKOW, R. Food preservation by high pressure, **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 5, n.1, p. 73-81, 2010.

HEREMANS, K. High pressure bioscience and biotechnology: A century and a decade perspective, In: Rikimaru Hayashi, Editor(s), **Progress in Biotechnology**, v. 19, p. 1-6, 2002.

HONG, S.I.; PYUN, Y.R. Inactivation Kinetics of *Lactobacillus plantarum* by High Pressure Carbon Dioxide. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p.728–733, 1999.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J. M. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. In: **International congress of meat science and technology (ICoMST)**, 48., Rome, 25-30 de Agosto de 2002. Proceedings. Rome: Università di Parma/Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). v. 1, p. 85-93, 2002.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Ecología Microbiana de los alimentos**, Factores que afetam a la sobrevivencia de los micro-organismos en los alimentos. v.1: Zaragoza: Acribia, 1980.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods 7**, Microbiological testing in food safety management. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas; métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo, p. 1020, 2005.

JABLONSKY J.M.; BOHACH G.A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE M.H.; BEUCHAT L.R.; MONTVTLLE T. J.; **Food microbiology. Fundamentals and frontiers**. Cap.19, p.353-375, 1997.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 711p. 2005.

JHA, P.; ROY, R. P.; BARAT, S. Application of sensory and microbial analysis to assess quality of fish in Siliguri city of West Bengal, India. **Journal Environmental Biology**, v.31, n.5, p.587 – 594, 2010.

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 of Food Science**. v. 70, n.5 p. M249–M254, 2005.

LAKSHMANAN, R.; PATTERSON, M.F.; PIGGOTT, J.R. Effects of high-pressure processing on proteolytic enzymes and proteins in cold-smoked salmon during refrigerated storage, **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 541-548, 2005.

LEISNER, J. J.; LUND, T. B.; FRANDBSEN, E.A.; ANDERSEN, N.B.E.; FREDSLUND, L.; NGUYEN, V.P.T.; KRISTIANSEN, T. What consumers expect from food control and what they get – A case study of the microbial quality of sushi bars in Denmark. **Food Control**, v. 45, p. 76–80, 2014.

LI, H.; ZHAO, L.; WU, J.; ZHANG, Y. AND LIAO, X. Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin. **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 139- 45, 2012.

LIAO, H.; KONG, X.; ZHANG, Z.; LIAO, X.; HU, X. Modeling the inactivation of Salmonella typhimurium by dense phase carbon dioxide in carrot juice, **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 94-100, 2010.

LIAO, H.; HU, X.; LIAO, X.; CHEN, F.; WU, J. Inactivation of Escherichia coli inoculated into cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide, **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 2, 15, p. 126-131, 2007.

LIMA, C. L. S. Avaliação dos perigos microbiológicos em uma indústria de beneficiamento de pescados e sugestão de um sistema de gestão de qualidade. 2012. 127f. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. 2012.

LIN, H.-M.; CAO, N.J.; CHEN, L.-F. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 59, n.3, p.657–659, 1994.

LIN, H.-M.; YANG, Z.Y.; CHEN, L.-F. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. **Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n.1, p. B29–B34, 1993.

LIN, H.-M.; YANG, Z.Y.; CHEN, L.-F. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide. **Biotechnology Progress**, v. 8, n.5, p.458–461, 1992.

MARCOS, B., AYMERICH, T., GUARDIA, M.D., GARRIGA, M. Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages. **Meat Science**, v.76, p. 46-53, 2007.

MARTINS, F, O. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na Cidade de São Paulo. 2006. 142f. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Saúde Pública, USP – São Paulo, 2006.

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, n.4, p 107–112, 1997.

MEUJO, D. A. F.; KEVIN, D. A.; PENG, J.; BOWLING, J. J.; LIU, J.; HAMANN, M. T. Reducing oyster-associated bacteria levels using supercritical fluid CO<sub>2</sub> as an agent of warm pasteurization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 63-70, 2010.

- MEYER, R. S.; COOPER, K. L.; KNORR, D.; LELIEVELD, H. L. M. High-pressure sterilization of foods. **Food Technology**, v. 54, n. 11, p.67-72, 2000.
- MINAMI, A. W. C.; MANAS C. N.; SEKSUN S.; SHUKO M.; KOUCHI T.; SOU-ICHI M.; KEIKO K. Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand, **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 221-226, 2010.
- MONTANARI, A. S.; FRANCIELLE, P. S. S.; PEREIRA B. G. M.; MARTINELLI T.C.A.; ANDRADE J. S.; ROMÃO N. F. Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis de salmão, preparados e comercializados em restaurante japonês no município de Ji-Paraná – RO, **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, p. 4-16, 2015.
- NAKAMURA, K., ENOMOTO, A., FUKUSHIMA, H., NAGAI, K., HAKODA, M. Disruption of microbial cells by the flash discharge of high-pressure carbon dioxide. *Bioscience*, **Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p. 1297–1301, 1994.
- NEAGU, C.; BORDA, D.; ERKMEN, O. Mathematical modelling of *Aspergillus ochraceus* inactivation with supercritical carbon dioxide – A kinetic study, **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 4, p. 369-375, 2014.
- NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., OPSTEEGH, M., LANGELAAR, M., THREFALL, J. Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139 n. 1, p. S3–S15, 2010.
- PANOZZO, A.; MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M.; LIPPE, G.; NICOLI, M.C. Effect of high pressure homogenization on microbial inactivation, protein structure and functionality of egg white, **Food Research International**, v. 62, p. 718-725, 2014.
- PARK, S.-J.; LEE, J.-I.; PARK, J. Effects of a combined process of high pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. **Journal of Food Science**, v. 67, n.5, p. 1827–1834, 2002.
- PATTERSON, M. F. Microbiology of pressure-treated foods A REVIEW. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n. 6, p.1400-1409, 2005.
- PATTERSON, M.F. Food Technologies: High Pressure Processing, In **Encyclopedia of Food Safety**, edited by Yasmine Motarjemi, Academic Press, Waltham, v.3 p.196-201, 2014.
- PATTERSON, M.F.; LINTON, M.; DOONA, C.J. Introduction to High Pressure Processing of Foods, **In: in High Pressure Processing of Foods**. Edited by C. J. Doona and F. E. Feeherry, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Chapter 1, p. 1-14, 2007.
- PENNA, T. C. V.; MARTINS, A. M. Z.; MACHOSHVILI, I. **Conceitos básicos de esterilização e desinfecção**. Capítulo 01, p. 1-16, 2002.
- PEREIRA, R.N.; VICENTE, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing, **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1936-1943, 2010.
- PERRUT, M. Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 359–371, 2012.
- PICOUET, P. A.; COFAN-CARBO S.; VILASECA H.; BALLBÈ L.C.; CASTELLS P. Stability of sous-vide cooked salmon loins processed by high pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p. 26–31, 2011.
- PRAPAIWONG, N., WALLACE, R. K., & ARIAS, C. R. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.131, n.2-3, p.145-150. 2009.

- RALL, V. L. M.; CARDOSO, K. F. G.; XAVIER, C. Qualidade microbiológica de pescado comercializado na cidade de Botucatu, SP. **Higiene Alimentar**. v. 25, n.192/193, p. 123-125, 2011.
- ROSENTHAL, A.; SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de Alimentos**, v.14, p.37-39, 1997.
- ROS-POLSKI, V.; KOUTCHMA, T.; XUE, J.; DEFELICE, C.; BALAMURUGAN, S. Effects of high hydrostatic pressure processing parameters and NaCl concentration on the physical properties, texture and quality of white chicken meat, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.30, p.31-42, 2015.
- SANTIAGO, J. A. S.; ARAUJO, P. F. R.; SANTIAGO, A. P.; CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R.H.S.F Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados- revisão, **Arquivos de Ciência do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.
- SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação**. 6.ed. Varela, 385p. São Paulo, 2008.
- SILVA, J. M. Inativação de *Escherichia coli* utilizando dióxido de carbono supercrítico. 2011. 53f. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2011.
- SILVA, M.L.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.3, p.208-214, 2008.
- SIRISEE, U.; HSIEH, F.; HUFF, H.E. Microbial safety of supercritical carbon dioxide processes. **Journal Food Process Preservation**. v. 22, n. 5, p. 387–403, 1998.
- SLONGO, A. P. Uso de alta pressão hidrostática em presunto fatiado: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano. 2008. 173f. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Florianópolis. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2008.
- SOARES, D.; LERIN, L.A; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; MAZUTTI, M.A. Inactivation of *Listeria monocytogenes* using supercritical carbon dioxide in a high-pressure variable-volume reactor. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 514–518, 2013.
- SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1–10, 2012.
- SFILIMBERGO, S.; BERTUCCO, A. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. **Biotechnology and Bioengineering**, v 84, n.6, p. 627–638, 2003.
- SFILIMBERGO, S.; CIOLA, L. Supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O pasteurization of peach and kiwi juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, n.8, p. 1619–1625, 2010.
- SFILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A. Microbial inactivation by high pressure. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 55-63, 2002.
- TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International** v. 39, n.1, p. 98–105, 2006.
- TIRONI, V. A.; TOMÁS, M. C.; AÑÓN, M. C. Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 263–272, 2010.
- 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.

TSUJI, M.; SATO, Y.; KOMIYAMA, Y. Inactivation of microorganisms and enzymes in juices by supercritical carbon dioxide method with continuous flow system. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 52, n.11, p. 528–531, 2005.

VALLANDRO, M. J. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Sashimis a Base de Salmão, Preparados Em Restaurantes Especializados em Culinária Japonesa na Cidade de Porto Alegre - RS. 2010, 69 f. **Dissertação (mestrado)** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2010.

VALVERDE, M. T.; MARÍN-INESTA, F.; CALVO, L. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 421–428, 2010.

VEIGA, A.; LOPES, A.; CARRILHO, E.; SILVA, L.; DIAS, M.B.; SEABRA, M.J.; BORGES, M.; FERNANDES, P.; NUNES, S.; FERREIRA, S. Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. **Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - ASAE**. Lisboa, 330p, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, C. M.; CARVALHO, F. C. T.; SOUZA, D. B. R.; MENEZES, F. G. R.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P. Salmonella e Staphylococcus coagulase positiva em sushi e sashimi preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. **Boletim Técnico Científico - CEPENE**, Tamandaré, v. 15, n. 1, p. 9–14, 2007.

WEI, C.I.; BALABAN, M.O.; FERNANDO, S.Y.; PELOW, A.J. Bacterial effect of high pressure CO<sub>2</sub> treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 3, p. 189–193, 1991.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M.; HAAS, S.; SOEIRO, M.L.T.; RAMOS, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44–48, 2010.

WILLIAMS, J. R.; CLIFFORD, A. A. Introduction to Supercritical Fluids and Their Applications, **Supercritical Fluid Methods and Protocols**, v. 13, p. 1–16, 2000.

WILMA, T.; OLIVEIRA, N. Evaluation of the hygienic and sanitary conditions in the preparation of sushi and sashimi a commercial establishment. **Revista Semiárido de Visu**, v. 2, n. 87, p. 194–201, 2012.

WOODALL, A. A., LEE, S. W.; WEESIE, R. J.; JACKSON, M. J.; BRITTON, G. Oxidation of carotenoids by free radicals:relationship between carotenoid structure and reactivity. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1336, p. 33–42, 1997.

YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H. G.; BALABAN, M.O.; WELT, B. A.; RALAT, M.; MARUICE, R.; MARSHALL, M. R. Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 828–835, 2009.

YORDANOV, D. G.; ANGELOVA G.V. High Pressure Processing For Foods Preserving. **Biotechnology & Biotechnology**, 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.

ZHAO, W., YANG, R., ZHANG, H.Q. Recent advances in the action of pulsed electric fields on enzymes and food component proteins. **Trends Food Sci.Technol.** v.27, p.83–96, 2012.

ZHU, S. ; RAMASWAMY, H.S.; SIMPSON, B.K. Effect of high-pressure versus conventional thawing on color, drip loss and texture of Atlantic salmon frozen by different methods, **LWT - Food Science and Technology**, V. 37, n. 3, p. 291–299, 2004.