

Katherine Helena Oliveira de Matos

**INATIVAÇÃO MICROBIANA EM OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*) EMPREGANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Co-Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis  
2013

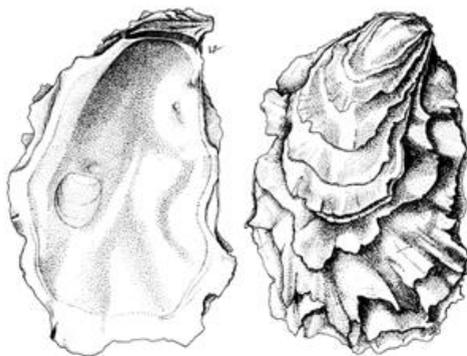
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 OSTRAS

Os moluscos bivalves, pertencentes à família Ostreidae, gênero *Crassostrea*, conhecidos popularmente como ostras, fazem parte do filo Mollusca e à classe Bivalva (BARNES, 1977).

No Brasil, a espécie mais conhecida e cultivada é a ostra japonesa, a *Crassostrea gigas* Thunberg 1793 (Figura 3), especialmente, nas regiões Sudeste e Sul, devido ao investimento em tecnologias e a produção regular de sementes em laboratório. Porém, essa espécie não se adapta para o cultivo em regiões estuarinas quentes. Nestas regiões, grande parte das ostras vem da extração de estoques naturais e os cultivos são desenvolvidos de forma artesanal, com sementes provenientes da coleta no ambiente. Em Santa Catarina, a ostreicultura foi iniciada em 1987, a partir de sementes da ostra *Crassostrea gigas*, produzidas no Chile (TURECK, 2010).

Figura 3 – Ostras (*Crassostrea gigas*)



FONTE: FAO (2005)

As ostras possuem uma estrutura física composta por um corpo macio, protegido externamente por uma concha, que apresenta duas valvas: a valva superior ou direita, que é plana; e a valva inferior ou esquerda, que é levemente côncava ou abaulada (Figura 3). A junção entre as duas valvas é feita com auxílio do músculo adutor e também por meio de um ligamento situado na região posterior. Esta concha é constituída principalmente por carbonato de cálcio, que é retirado diretamente da água do mar com auxílio de células especializadas localizadas no manto. O manto é a camada de tecido que recobre as partes moles de ambos os lados do corpo, com exceção do músculo adutor. Além de conter as células responsáveis pela formação da concha, o manto também apresenta funções sensoriais. O corpo, parte mole do organismo, é constituído além do manto, pelas brânquias, palpos labiais, coração (pericárdio), massa visceral (órgãos do aparelho digestivo, reprodutor e excretor) e pelo músculo adutor. As brânquias apresentam a função de realizar as trocas gasosas (respiração) e a captura do alimento. Devido à grande superfície branquial que se encontra constantemente úmida, as ostras podem resistir a longos períodos fora da água (BARNES, 1977).

Esta classe apresenta, como uma importante característica estrutural, o grande desenvolvimento das brânquias, que são responsáveis pela respiração e filtração do alimento (BARNES, 1977). Devido ao hábito alimentar baseado na filtração de material orgânico em suspensão na água, as ostras podem assimilar, além do fitoplâncton, seu principal alimento, outras substâncias eventualmente presentes na água, como por exemplo, pesticidas, metais pesados e micro-organismos. Sendo que, as bactérias patogênicas, que estejam eventualmente presentes na água de cultivo, após serem filtradas, poderão permanecer viáveis no trato digestivo das ostras (MORAES *et al.*, 2000).

De uma maneira geral, as ostras possuem elevado valor nutritivo e podem ser consideradas fontes de proteínas de alto valor biológico e lipídeos benéficos à saúde incluindo o ômega-3. Pelo seu valor nutritivo, as ostras podem fazer parte de uma dieta saudável desde que seja adequada a quantidade e a forma de preparo (TURECK, 2010).

A característica de filtração das ostras influencia na sua composição nutricional. Além disso, fatores como: a espécie, sexo, tamanho, temperatura, local de cultivo, tipo de alimentação e estação do ano também interferem no seu valor nutricional. A Tabela 1 exemplifica a característica nutricional de ostras em duas estações do ano.

Tabela 1 – Composição centesimal e valor calórico de ostras *Crassostrea gigas* coletadas em Florianópolis.

Período da coleta	Parâmetros					
	Umidade (g%)	Proteína (g%)	Lípídeo (g%)	Carboidrato (g%)	Cinza (g%)	Calorias (kcal/100g)
Fevereiro	85,21	6,37	1,54	5,28	1,60	60,46
Outubro	77,29	9,51	2,67	8,90	1,63	97,67

FONTE: PARISENTI (2006).

Estudo realizado por Tramonte, Parisenti e Faccin (2005) com ostras *C. gigas* e *C. rhizophorae* mostrou que as ostras coletadas na primavera apresentam maior quantidade de lipídeos que as coletadas no verão. Comparando as duas espécies, as ostras *C. gigas* apresentaram maior teor de lipídios.

### 2.1.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

De um modo geral, as características microbiológicas de moluscos, variam de acordo com as localizações geográficas dos cultivos, diferentes habitats, método de produção, práticas de manejo, condições ambientais e procedimentos pós-coleta. O estado microbiológico de ostras após a coleta está diretamente relacionado à qualidade microbiológica da água, que é influenciada, também pela temperatura e salinidade da água, distância entre o local de cultivo e áreas poluídas com material fecal (próximas à costa, descarga de esgoto, etc) ou à ocorrência de bactérias naturalmente presentes na água (FELDHUSEN, 2000). Por isso, a qualidade sanitária das águas de cultivo de moluscos é aspecto imprescindível para a obtenção de um produto seguro.

Os perigos potenciais relacionados a doenças transmitidas por alimentos de origem marinha variam de acordo com diferentes fatores e incluem: infecções por trematódeos, florações de algas marinhas tóxicas, doenças associadas a bactérias patogênicas e vírus, resíduos de medicamentos de uso veterinário, contaminação por agrotóxicos e metais pesados (FELDHUSEN, 2000). De forma geral, as bactérias que podem ocorrer em produtos marinhos são:

- a) Bactérias que ocorrem naturalmente no ambiente marinho: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*.

- b) Bactérias presentes como resultado da contaminação fecal humana e de animais de sangue quente, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogênica, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.
- c) Bactérias introduzidas durante manuseio pós-captura/pós-coleta ou processamento: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*.

Dentre os micro-organismos patogênicos, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas* spp. têm sido frequentemente identificados em moluscos, sendo que *V. parahaemolyticus* tem sido apontado como a maior causa de surtos de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves no mundo (TEPLITSKI, WRIGHT & LORCA, 2009).

O principal grupo de micro-organismos utilizados como indicadores de contaminação são as bactérias, e dentre elas destaca-se a *E. coli* e a *Salmonella* sp., como indicadores de contaminação do ambiente de cultivo e o *S. aureus*, como indicador de contaminação pós-manipulação humana (FELDHUSEN, 2000). Pelo fato da *E. coli* ser habitat natural do intestino do homem e de animais de sangue quente, sendo eliminada em grande quantidade nas fezes, a sua presença está relacionada principalmente à contaminação fecal da água do local de cultivo. O nível de contaminação por *E. coli*, comumente observadas nas ostras de cultivo, indicam o nível de contaminação do momento da coleta e são influenciadas por diferentes fatores, como chuvas e o posicionamento do cultivo. É importante destacar que bactérias relacionadas a Doenças Transmitidas por Alimentos em humanos, como a *E. coli*, podem manter-se viáveis mesmo após a ingestão pelas ostras, o que justifica altas contagens bacterianas em moluscos mesmo quando as contagens na água do mar não indicam restrições para coleta e consumo dos organismos (Nguyen & Graham, 1980 e Pommepuy et al. (1996) apud FARIAS, 2008).

Além dos patogênicos, podem ser encontrados nos moluscos bivalves micro-organismos deteriorantes, que provocam alterações sensoriais, diminuindo a vida útil do produto. A grande quantidade de carboidratos em moluscos (em ostras cerca de 5,6%) é o que diferencia a sua deterioração de outros frutos do mar (peixes, camarões, lulas). Dentre as bactérias que causam deterioração em ostras, os seguintes gêneros já foram isolados: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*. No início e no

desenvolvimento da deterioração predominam as *Pseudomonas* e a *Acinetobacter-Moraxella* spp., enquanto nos estágios mais avançados da deterioração são dominantes os *Enterococcus*, os *Lactobacillus* e as leveduras (JAY, 2005).

*Pseudomonas* sp. e *Shewanella putrefaciens* podem ser consideradas as principais bactérias responsáveis pela deterioração de frutos do mar em geral refrigerados. Estes micro-organismos, conhecidos como psicrotróficos, conseguem se desenvolver a baixas temperaturas (entre 0°C a 7°C). Neste grupo, estão *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio* (Gram-negativos) e *Enterococcus*, *Bacillus* e *Clostridium* (Gram-positivos). Além dos psicrotróficos, também fazem parte da microbiota deteriorante os micro-organismos psicrófilos, que são capazes de se desenvolverem entre 0°C e 20°C, com uma faixa de temperatura ótima de crescimento entre 10°C e 15°C. Neste grupo, está inserido a *Flavobacterium* (JAY, 2005).

#### 2.1.1.1 *Vibrio* sp.

O gênero *Vibrio* pertence à família Vibrionaceae e consiste em, pelo menos, 28 espécies, sendo que algumas são consideradas patogênicas para o homem, destacando-se: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* (SENAI, 2000; JAY, 2005).

O *Vibrio parahaemolyticus* ocorre naturalmente em águas oceânicas e costeiras. Na maioria das áreas, *V. parahaemolyticus* é mais numeroso no ambiente durante os meses mais quentes; assim, a maioria dos surtos ocorre nesse período. Os sintomas mais comuns de doença provocada por *V. parahaemolyticus* são: diarreia, dores abdominais, náusea, vômito e enxaqueca. Febre e calafrios não são frequentes. O período de incubação varia de 2 a 48 horas, e em média 12 horas. Os sintomas podem persistir por 2 a 10 dias; no entanto, costuma desaparecer em 3 a 4 dias (SENAI, 2000). Acredita-se que a dose infectiva mínima seja de aproximadamente  $10^5$  células (JAY, 2005; CHOI *et al.*, 2009). A doença tem sido associada ao consumo de ostras, caranguejos, camarão, lagosta e peixe crus. No entanto, a contaminação cruzada pode propiciar que outros alimentos se tornem veículos (SENAI, 2000; JAY, 2005).

O *V. parahaemolyticus* pode crescer na presença de 1 a 8% de NaCl, com um crescimento ótimo na faixa de 2 a 4%. Ele não sobrevive em água destilada. Não cresce a 4°C, mas seu crescimento foi

demonstrado entre 5°C e 9°C, pH 7,2 a 7,3 e 3% de NaCl, ou a pH 7,6 e 7% de NaCl. A temperatura máxima de crescimento é de 44°C, com uma temperatura ótima entre 30°C e 35°C (SENAI, 2000). A Tabela 2 compara os parâmetros de crescimento de três espécies patogênicas de *Vibrio*.

Tabela 2 - Parâmetros que limitam a multiplicação de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

Parâmetro	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Temperatura mínima	ND	5°C	8°C
Temperatura máxima	45°C	44°C	43°C
pH mínimo	5,0	4,5	5,0
pH máximo	9,6	11	10
Atividade de água mínima	0,97	0,94	0,98
% máximo de NaCl	6	10	6-5

ND = não disponível

FONTE: PRICE (1997); ICMSF (1996) apud SENAI (2000).

A identificação de *V. parahaemolyticus* como um agente da gastroenterite de origem alimentar foi realizada primeiramente por Fujino, em 1951.

### 2.1.2 Surto relacionados ao consumo

As ostras apresentam um tempo de vida útil relativamente curto e variável em função de suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH neutro e pelo fato de abrigarem bactérias. Além disso, há a presença de enzimas autolíticas, responsáveis pelo aparecimento de odores e sabores desagradáveis no produto, contribuindo para sua rápida deterioração (JAY, 2005). A característica fisiológica de filtração da água e o hábito de consumo de ostras cruas ou levemente cozidas, contribuem para o surgimento de inúmeros casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) envolvendo este produto.

As DTAs são um dos problemas de saúde pública mais frequentes do mundo contemporâneo, sendo que aquelas de origem aquática

seguem as mesmas características epidemiológicas de outros produtos alimentícios (LENOCH, 2004):

1. Ingestão como primeira rota de exposição;
2. Uma grande variedade de etiologias (bactérias, vírus, parasitas e toxinas);
3. Expressiva falta de notificação de casos e;
4. Aparente aumento da incidência na população humana.

Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), estima que, cerca de 45 mil doenças causadas por *V. parahaemolyticus* ocorrem a cada ano, no país, e que cerca de 86% delas são de origem alimentar. A probabilidade de infecção é maior durante os meses mais quentes do ano. O CDC ainda calcula que, apenas um em cada 20 casos envolvendo *V. parahaemolyticus* é relatado, e é provável que a hospitalização e morte sejam raras entre os casos não notificados (FDA, 2012).

No Brasil, somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e dados sobre a ocorrência de surtos de DTA, os agentes etiológicos mais comuns, os alimentos mais frequentemente implicados, a população de maior risco e os fatores contribuintes. Por outro lado, a maioria dos casos de DTA não é notificada, pois muitos agentes etiológicos das DTA causam sintomas brandos e a vítima não procura auxílio médico (LIMA DOS SANTOS, 2010a). Os dados estatísticos sobre as DTAs veiculadas por pescado e derivados, no Brasil, indicando número de surtos, casos, óbitos, agentes etiológicos e veículo (tipo de pescado) associado às ocorrências, estão apresentados na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Embora as bactérias sejam indicadas como as principais causas de DTAs no Brasil, e da bibliografia apresentar inúmeras descrições da presença de bactérias patogênicas para o homem em pescado e derivados, em diferentes produtos e regiões do país, o estudo realizado por Lima dos Santos (2010a) demonstrou que existem raras indicações de surtos causados por *Vibrio* associados ao consumo de pescado (Tabela 3). Do total de casos relacionados ao *V. parahaemolyticus*, quase metade envolveu o consumo de moluscos (Tabela 4).

Tabela 3 - DTAs veiculadas por pescado no Brasil: agentes etiológicos, surtos, casos e óbitos – 1983 a 2010.

<b>Etiologia</b>	<b>Surtos</b>	<b>Casos</b>	<b>Óbitos</b>
<b>Bactérias</b>			
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	15	0
<i>C. botulinum</i>	-	1	0
<b>Parasitas</b>			
<i>Clonorchis sinenses</i>	1	15	0
<i>Ascocotyle (Phagicola)</i>	2	20	0
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	10	82	0
<b>Biotoxinas</b>			
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	1	150	0
Tedrotoxina (TXT)	7	28	3
Toxina de polvo	-	1	0
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>312</b>	<b>3</b>

FONTE: LIMA DOS SANTOS (2010b).

Tabela 4 - Casos de DTA veiculadas por pescado e derivados no Brasil: Agentes etiológicos e veículo – peixes, crustáceos e moluscos - 1983 – 2010.

<b>Etiologia</b>	<b>Peixes</b>	<b>Crustáceos</b>	<b>Moluscos</b>	<b>Total</b>
<b>Bactérias</b>				
<i>V. parahaemolyticus</i>	4	4	7	15
<i>C. botulinum</i>	1	0	0	1
<b>Parasitas</b>				
<i>Clonorchis sinenses</i>	15	0	0	15
<i>Ascocotyle</i> sp. ( <i>Phagicola</i> )	20	0	0	20
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	82	0	0	82
<b>Biotoxina</b>				
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	0	0	150	150
Tedrotoxina (TXT)	28	0	0	28
Toxina de polvo	0	0	1	1
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>4</b>	<b>158</b>	<b>312</b>

FONTE: Lima dos Santos (2010b).

### 2.1.3 Controle higiênico sanitário

No intuito de assegurar a saúde do consumidor, é essencial a adoção de medidas de controle higiênico-sanitárias na produção de ostras, principalmente, por meio de monitoramento bacteriológico das ostras e da água de cultivo. Inclusive, vários países possuem legislações específicas para o controle sanitário de moluscos.

O *Codex Alimentarius* lançou, em 1978, o Código Internacional de Práticas de Higiene Recomendado para Mariscos Moluscoídeos, que sinaliza a importância da implementação de Programas como Boas Práticas de Fabricação e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, na produção e comercialização de ostras.

A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods* - ICMSF) estabeleceu requisitos microbiológicos para moluscos vivos, destinados ao consumo humano, sendo necessária a realização de análises microbiológicas de *E. coli*, *Salmonella* sp. e *V. parahaemolyticus* (ICMSF, 1996).

Nos Estados Unidos, após um surto envolvendo ostras, a *Food and Drug Administration* (FDA) criou o Programa Nacional de Sanitização de Moluscos (*National Shellfish Sanitation Program* - NSSP), que pode ser considerado um guia para o controle do crescimento, processamento e transporte de moluscos. Esta legislação considera limites para os seguintes micro-organismos: *E. coli* enterotoxigênica, *Salmonella* sp., *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *S. aureus*. Os critérios utilizados para o controle de áreas de extração/cultivo/depuração de moluscos bivalves, baseado em densidade bacteriológica, são divididos em categorias: aprovado, condicionalmente aprovado, condicionalmente restrito, restrito e proibido. A categoria "aprovado" define as áreas limpas de crescimento de moluscos, portanto, de onde os bivalves podem ser colhidos. Por outro lado, moluscos cultivados em áreas que não cumprem com os critérios de satisfação, ou que não apresentem classificação devido à falta de levantamentos sanitários, não podem ser colhidos para consumo humano e, neste caso, recebem a denominação de "restrito". Em alguns casos, a restrição de coleta pode ser condicionada a intervalos curtos de tempo, em função de uma poluição, por exemplo. Assim, essas áreas são classificadas como "condicionalmente aprovada" ou "condicionalmente restrita".

O NSSP estabelece critérios desde o momento da coleta dos moluscos até o seu consumo. Isto é, há regras para coleta de amostras,

armazenamento, depuração, processamento, metodologias laboratoriais de análise e distribuição. É importante destacar que este programa também estabelece critérios para a validação de um processo a ser utilizado após a coleta das ostras (*Post-harvest processing* - PHP) para redução de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Quando há interesse na utilização de um novo processo (PHP), é necessário comprovar que este processo é capaz de atingir 3,52 reduções decimais e que a contagem final seja menor que 30NMP/g para *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (FDA, 2009).

Outros países possuem programas para controle higiênico-sanitário de moluscos semelhantes ao dos Estados Unidos, como por exemplo, na Austrália (*Australian Shellfish quality assurance program*), Canadá (*Canadian Shellfish Sanitation Program*), Nova Zelândia (*Marlborough Shellfish Quality Programme*), entre outros, e a União Europeia.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou, em 1997, a Portaria n°451, que estabelecia os critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Nesta Portaria, os critérios e os limites para moluscos *in natura*, resfriados ou congelados eram: *Salmonella* (ausência em 25g), Coliformes fecais ( $10^2$ UFC/g), *S. aureus* ( $10^3$ /g) e *V. parahaemolyticus* ( $5 \times 10^3$ /g). No entanto, em 2001, a ANVISA revogou esta Portaria. Alguns alimentos tiveram seus critérios e limites alterados, assim como alimentos que não possuíam padrões microbiológicos na Portaria n°451/1997, foram incluídos na RDC n°12/2001, que é a legislação atual para padrões microbiológicos em alimentos.

A RDC n°12/2001 estabelece que a carne de moluscos bivalves *in natura*, resfriada ou congelada, está apta para o consumo humano quando no produto, a *Salmonella* sp. estiver ausente em 25 g e a contagem em unidade formadora de colônias (UFC), de *Staphylococcus* coagulase positivo não ultrapassar o limite de  $10^3$  NMP/g. O limite máximo permitido de *Vibrio parahaemolyticus*, é apenas estabelecido para pratos prontos a base de pescados, em cozinhas, restaurantes e similares, sendo o limite de  $10^3$ /g. Ou seja, a atual legislação libera o consumo de bivalves *in natura* que atendam aos limites microbiológicos estabelecidos, somente se não consumidos crus (Tabela 5). No entanto, considerando que moluscos, são tradicionalmente, consumidos crus ou levemente cozidos, podem representar alto risco e, de uma forma geral, estão associados a intoxicações alimentares.

O Brasil permaneceu muito tempo sem a implantação de um programa específico para o monitoramento sanitário de moluscos.

Por isso, considerando a necessidade de estabelecer requisitos de inspeção industrial e sanitária dos estabelecimentos de processamento de moluscos bivalves, como medida de prevenção de efeitos nocivos à saúde do consumidor, e com a finalidade de garantir padrões mínimos de qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em maio de 2012, instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). O PNCMB abrange as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte de moluscos bivalves destinados ao consumo humano (BRASIL, 2012). É importante destacar que, para a definição de retirada de moluscos bivalves, a Instrução Normativa nº7 considera apenas limites da bactéria *E. coli* e limites de biotoxinas produzidas por microalgas. Outras bactérias patogênicas, como por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, não são abordadas nesta legislação.

Tabela 5 – Padrões microbiológicos para moluscos, de acordo com a RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Grupo de Alimentos	Micro-organismo	Tolerância para Amostra representativa		
		m	M	
Pescados e produtos de pesca	Moluscos bivalves <i>in natura</i> , resfriados ou congelados, não consumido cru.	Estaf. Coag. positiva/g <i>Salmonella</i> sp./25g	5x10 <sup>2</sup> Aus.	10 <sup>3</sup> -
	Moluscos bivalves, cozidos, temperados e não, industrializados resfriados ou congelados.	Coliformes a 45°C/g Estaf.coag.positiva/g <i>Salmonella</i> sp./25g	10 10 <sup>2</sup> Aus.	5x10 10 <sup>3</sup> -
	Moluscos secos e ou salgados.	Coliformes a 45°C/g Estaf.coag.positiva/g	10 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> 5x10 <sup>2</sup>
	Semi conservas de moluscos mantidas sob refrigeração (marinados, anchovados ou temperados).	<i>Salmonella</i> sp./25g	Aus.	-
	Pescado defumado, moluscos e crustáceos, refrigerados ou congelados.	Coliformes a 45°C/g Estaf.coag.positiva/g	10 10 <sup>2</sup> Aus.	10 <sup>2</sup> 5x10 <sup>2</sup> -
	Produtos derivados de pescado (surimi e similares), refrigerados ou congelados.	<i>Salmonella</i> sp./25g		
	Pratos prontos para o consumo (Alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares)	Coliformes a 45°C/g Estaf.coag.positiva/g <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (específico para produtos à base de pescados) <i>Salmonella</i> sp./25g	10 10 <sup>2</sup> 10 <sup>2</sup> Aus.	10 <sup>2</sup> 5x10 <sup>3</sup> 5x10 <sup>3</sup> -

**m:** é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

**M:** é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

Aus. = ausência.

## 2.2 PROCESSAMENTO NÃO TÉRMICO DE ALIMENTOS

O processamento não térmico de alimentos tem recebido destaque nos últimos anos e diferentes tecnologias emergentes estão em estudo para avaliar o seu potencial como uma alternativa aos tratamentos térmicos convencionais. Tradicionalmente, a grande maioria dos alimentos é processada utilizando temperaturas entre 60° e 100°C por um determinado tempo. Porém, os processos térmicos, em função da enorme quantidade de energia transferida para o alimento, podem provocar alterações indesejáveis nas características sensoriais, nutricionais e físicas do alimento (DAMAR, 2006).

A utilização de processos não térmicos minimiza as alterações indesejáveis no alimento, uma vez que utilizam temperaturas inferiores aquelas usadas nos tratamentos térmicos. Dentre as tecnologias não térmicas emergentes estão: alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado, irradiação, campo magnético oscilatório, luz pulsante e alta pressão com dióxido de carbono. Cada tecnologia tem uma aplicação específica: algumas são mais interessantes para o processamento de líquidos e outras se destinam ao tratamento de alimentos sólidos. Em cada caso, é necessário avaliar o potencial da tecnologia no processamento do produto, visando minimizar alterações na qualidade nutricional, físico-química e sensorial.

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, processados por alta pressão hidrostática e especiarias irradiadas. 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.

### 2.2.1 Dióxido de carbono à alta pressão

Nas últimas duas décadas, o uso de dióxido de carbono à alta pressão tem sido proposto como uma técnica alternativa à utilização de processos de pasteurização de alimentos. Fraser, em 1951, foi o primeiro

a demonstrar o potencial do dióxido de carbono pressurizado para a inativação de bactérias.

Esta técnica utiliza o dióxido de carbono sob condição de pressão, sendo que, a maioria dos processos descritos na literatura, utilizam pressão inferior a 350 bar. Como se trata de um processamento não térmico, o alimento é preservado dos efeitos adversos do calor e assim, mantém a qualidade física, nutricional e sensorial do produto fresco/*in natura*.

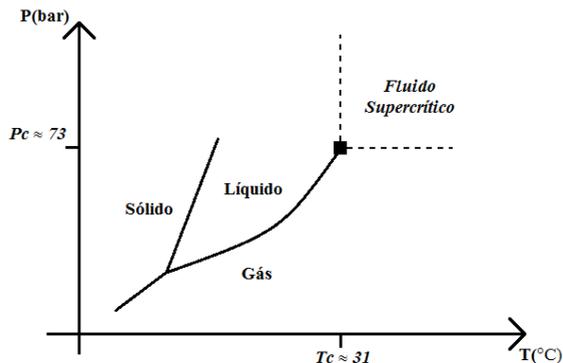
Neste processo, o alimento permanece em contato com o dióxido de carbono pressurizado, em condição sub ou supercrítico, por um determinado tempo. O processamento pode ocorrer em batelada, semi-batelada ou em processo contínuo. Informações adicionais sobre os fluidos supercríticos, sistemas de processamento e os mecanismos de inativação serão discutidos a seguir.

#### 2.2.1.1 Fluidos supercríticos

Os fluidos supercríticos (FSC) são referenciados como um estado da matéria em que a substância, nas proximidades do ponto crítico, apresenta propriedades intermediárias entre a de um gás e de um líquido e também se refere ao fato de uma substância se encontrar em uma condição de temperatura e pressão acima dos seus valores críticos. A temperatura crítica de uma substância é definida como a temperatura acima da qual uma substância pura não pode ser liquefeita, independente da pressão aplicada. Por conseguinte, a pressão crítica é definida como a pressão de vapor do gás na temperatura crítica. No ponto crítico, as fases líquida e vapor tornam-se idênticas, isto é, só uma fase existe (REID, PRAUSNITZ & POLING, 1988; SANDLER, 1989), conforme ilustrado na Figura 4.

Uma substância no estado de fluido supercrítico, próximo ao ponto crítico, não se caracteriza termodinamicamente nem como um gás, nem como um líquido e descrita como uma fase intermediária aos dois extremos, pois se assemelha tanto a um gás, em vista de sua baixa viscosidade e alta difusividade, como a um líquido, em vista de sua alta densidade (REID, PRAUSNITZ & POLING, 1988). A Tabela 6 apresenta uma comparação entre os valores de densidade, viscosidade e difusividade de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Figura 4 - Diagrama de pressão e temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição da região supercrítica para o  $\text{CO}_2$ .  $P_c$ : pressão crítica e  $T_c$ : temperatura crítica.



Dentre os fluidos supercríticos, o dióxido de carbono tem ganhado destaque por apresentar propriedades críticas moderadas (Tabela 7), quando comparado a outros fluidos, que permitem o processamento a temperaturas próximas ao ambiente e sob pressões relativamente amenas (80 a 200 bar). Além disso, o  $\text{CO}_2$  possui outras vantagens: é atóxico, não é inflamável, pode ser facilmente obtido com elevado grau de pureza, apresenta baixo custo, quando comparado a outros gases, e é considerado inerte do ponto de vista químico. Assim, o  $\text{CO}_2$  pode ser amplamente utilizado pela indústria de alimentos, com a utilização de temperaturas próximas a ambiente, evitando as alterações térmicas nos produtos. Ressalte-se ainda que o valor da solubilidade do  $\text{CO}_2$  em água é relativamente superior aos exibidos pelos demais fluidos apresentados na Tabela 7, o que garante melhor interação com produtos majoritariamente compostos por água, como é o caso da ostra, conferindo portanto, maior potencial para o mesmo atuar como agente bactericida, objetivo central deste trabalho de pesquisa. Inicialmente, os fluidos supercríticos eram utilizados nos processos de extração/separação e, mais recentemente, tem sido proposta a sua utilização para inativar micro-organismos em alimentos (ALMEIDA FILHO, 2003).

Tabela 6 - Propriedades típicas de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosidade (Pa.s)	Coefficiente de Difusão (m <sup>2</sup> /s)
Gás	1	1,0 < 10 <sup>-5</sup>	(0,1-1,0) < 10 <sup>-5</sup>
FSC	100-800	(0,5-1,0) < 10 <sup>-4</sup>	(0,1-1,0) < 10 <sup>-7</sup>
Líquido	1000	(0,5-1,0) < 10 <sup>-3</sup>	1,0 < 10 <sup>-9</sup>

FONTE: SANDLER (1989).

Tabela 7 - Condições críticas para diferentes fluidos

Gás	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (bar)	Solubilidade em água à 25°C e 1 atm (mol/mol)
Dióxido de carbono	30,98	73,75	6,15 x 10 <sup>-4</sup>
Argônio	-122,28	48,98	2,519 x 10 <sup>-5</sup>
Nitrogênio	-146,94	33,9	1,183 x 10 <sup>-5</sup>
Óxido nitroso	36,42	72,55	4,376 x 10 <sup>-4</sup>

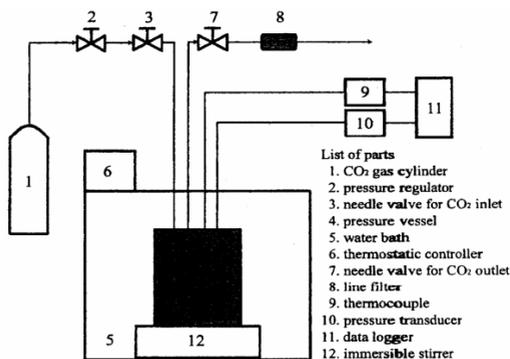
FONTE: REID, PRAUSNITZ & POLING (1988).

### 2.2.1.2 Sistemas a alta pressão para inativação de micro-organismos

Damar e Balaban (2006) descrevem que sistemas do tipo batelada, semi-contínuo e contínuo, para o processo envolvendo dióxido de carbono pressurizado já estão disponíveis. Num sistema por batelada, o dióxido de carbono e o alimento a ser tratado estão em estado estacionário em um recipiente hermético durante o tratamento. Já o sistema semi-contínuo possibilita o fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> por meio do recipiente, sendo que o sistema contínuo permite ambos os fluxos (CO<sub>2</sub> e alimento) através do sistema.

Um sistema batelada típico apresenta um cilindro de gás de dióxido de carbono, um regulador de pressão, um vaso de pressão, um banho para resfriamento ou aquecimento e uma válvula de alívio de CO<sub>2</sub> (Figura 5). A amostra é colocada no vaso de pressão (ou célula) e a temperatura é ajustada, de acordo com a especificação desejada. Em seguida, o CO<sub>2</sub> é injetado no recipiente até a saturação da amostra, na temperatura e pressão desejadas. A amostra permanece no vaso por um determinado tempo e depois a válvula de descarga é aberta para a liberação do CO<sub>2</sub>. É possível incluir um agitador para reduzir o tempo para a saturação da amostra com o CO<sub>2</sub>.

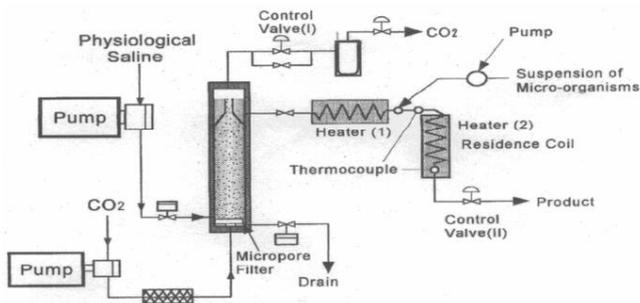
Figura 5 - Exemplo de unidade com sistema batelada



FONTA: HONG & PYUN (1999).

No sistema semi-contínuo de micro bolhas (Figura 6), o CO<sub>2</sub> líquido e uma solução salina são bombeados para o vaso de pressão. O CO<sub>2</sub> líquido muda para fase gasosa por meio de um evaporador, que é disperso na solução salina através de um filtro, com tamanho de poros igual a 10 $\mu$ m. As micro-bolhas de CO<sub>2</sub> sobem enquanto são dissolvidas na solução. Em seguida, a solução saturada com CO<sub>2</sub> é aquecida até a temperatura desejada e a amostra é bombeada para o contato com o CO<sub>2</sub> (SHIMODA *et al.*, 2001).

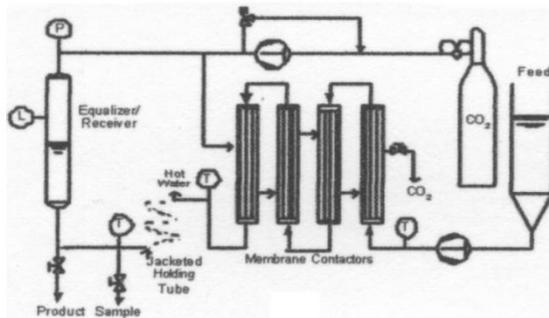
Figura 6 – Exemplo de unidade com sistema semi-contínuo.



FONTA: SHIMODA *et al.* (1998).

A Figura 7 ilustra um sistema contínuo constituído de membrana para contato entre  $\text{CO}_2$  e produto desenvolvido por Sims e Estigarribia, 2002 apud (DAMAR & BALABAN, 2006). Esta unidade é composta por membranas tubulares ocas em série. Uma bomba de  $\text{CO}_2$  é utilizada para pressurizar o sistema; e o alimento é bombeado continuamente com uma bomba para líquidos de alta performance (HPLC). Este arranjo é eficiente na saturação do líquido com o  $\text{CO}_2$ , pois possibilita uma maior área de contato. Na membrana de contato, o  $\text{CO}_2$  não é misturado com o líquido. Ocorre o processo de difusão instantaneamente do  $\text{CO}_2$  no líquido até níveis de saturação. O  $\text{CO}_2$  é reciclado e reutilizado no processo.

Figura 7 – Exemplo de unidade com sistema contínuo (a).

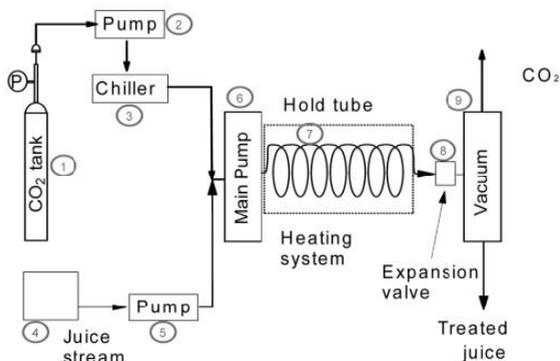


FONTE: Sims & Estigarribia (2002) apud Damar e Balaban (2006).

Há dois diferentes sistemas de processamento com  $\text{CO}_2$  de alta densidade para aplicação industrial, desenvolvidos pelos fabricantes Air Liquid Co. (Countryside, Ill., USA) e Praxair Co. (Chicago, Ill., USA). Ambos os sistemas disponíveis operam em fluxo contínuo.

No sistema desenvolvido pela Praxair (Figura 8), o  $\text{CO}_2$  e o produto são bombeados e misturados antes de passarem pela bomba de alta pressão, que elevará a pressão do sistema até o valor desejado para o processo. A temperatura é controlada e o tempo de processo é ajustado com a taxa de fluxo do produto escoado pela serpentina. No final do processo, há uma válvula de descarga para a liberação do  $\text{CO}_2$  da mistura. É possível retirar o  $\text{CO}_2$  residual do alimento utilizando um tanque a vácuo.

Figura 8 – Exemplo de unidade com sistema contínuo (b).



FONTE: Damar e Balaban (2006).

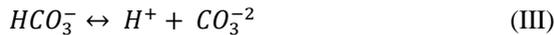
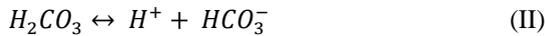
### 2.2.1.3 Mecanismos de ação bactericida do dióxido de carbono

A inibição do crescimento microbiano por meio do CO<sub>2</sub> tem sido avaliada há alguns anos. No entanto, ainda não está completamente elucidada a maneira que ocorre a inativação dos micro-organismos. Garcia-Gonzalez *et al.* (2007) reuniram diversos trabalhos da literatura para melhor compreensão do mecanismo de inativação microbiana por meio do tratamento com dióxido de carbono pressurizado, incluindo Lin, Yang e Chen (1992b), Lin, Cao e Chen (1994), Hong e Pyun (1999). Devido à extensa lista de publicações, a seguir serão descritos apenas os principais aspectos da hipótese do mecanismo. Assim, maiores detalhes e referências citadas podem ser obtidas em Garcia-Gonzalez *et al.* (2007).

#### (1) Solubilização do CO<sub>2</sub> pressurizado na fase líquida externa:

Em alimentos ou caldos com quantidade de água elevada, o CO<sub>2</sub>, presente no *headspace*, pode se dissolver na água para formar ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que posteriormente se dissocia para formar bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) e íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) (equações I a III). Consequentemente, a água em contato com o CO<sub>2</sub> pressurizado normalmente é acidificada, em função da formação e dissociação do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, que libera íons H<sup>+</sup>. Esta reação diminui o pH extracelular, que por sua vez, pode inibir o crescimento microbiano e também pode diminuir a resistência microbiana à inativação em função

do aumento do consumo de energia para manter a homeostase do pH pela força motriz do próton. No entanto, a redução do pH não é suficiente para designar o efeito letal do  $\text{CO}_2$ , pois o seu efeito inibitório é maior do que outros ácidos utilizados para reduzir o pH de meios, como por exemplo, ácidos clorídricos e fosfóricos. Esses ácidos não conseguem entrar nas células microbianas com a mesma facilidade que o  $\text{CO}_2$ . A diminuição do pH contribui para o aumento da permeabilidade da membrana, que facilita a penetração do  $\text{CO}_2$  na membrana celular (etapa 2).



(2) *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. O montante de  $\text{CO}_2$  acumulado na fase lipídica da membrana pode provocar um transtorno tanto estrutural como funcional na membrana celular, devido a uma perda na cadeia lipídica, o que pode aumentar a fluidez e, portanto, a permeabilidade da membrana.

(3) *Diminuição do pH intracelular:*

Devido ao aumento da permeabilidade da membrana, o dióxido de carbono pressurizado pode penetrar facilmente por meio 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 da homeostase do pH, a fim de manter o pH do citoplasma constante (o que é essencial para viabilidade celular ideal e a atividade celular). Ou seja, as células microbianas, quando expostas ao  $\text{CO}_2$  pressurizado não são capazes de manter a homeostase do pH citoplasmático favorável.

(4) *Inativação de enzimas-chave / inibição do metabolismo celular em função da diminuição do pH:*

Embora muitos aspectos da estrutura e função celular sejam afetados pelo pH, a atividade catalítica das enzimas é especialmente sensível. As enzimas, que compõem a maioria das proteínas no citosol, têm atividade máxima no pH ótimo. Portanto, a atividade enzimática diminui drasticamente em ambos lados (abaixo ou acima) do pH ótimo. Dessa forma, a redução do pH citosólico pode causar a inibição e/ou inativação de enzimas essenciais para a regulação dos processos metabólicos celulares.

(5) *Efeito inibitório das moléculas de  $CO_2$  e  $HCO_3^-$  no metabolismo:*

A regulação de uma via metabólica pode ocorrer em vários níveis. A taxa de reação enzimática não é uma função somente do pH, mas também das concentrações intracelulares do substrato, produto e cofator, que são os elementos fundamentais na regulação da atividade enzimática. A concentração de ácido carbônico ( $HCO_3^-$ ) parece ser fundamental para a regulação da atividade enzimática com algumas enzimas sendo estimuladas e outras inibidas por este ânion.

(6) *Transtorno do equilíbrio intracelular de eletrólitos:*

Danos letais ao sistema biológico das células podem ser produzidos quando uma pressão é aplicada e quando se acumula o dióxido de carbono no interior do citoplasma das células bacterianas. Este fato pode converter o  $HCO_3^-$  para  $CO_3^{2-}$ , o que poderia precipitar eletrólitos inorgânicos intracelulares (como por exemplo,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) a partir de células e membranas celulares. Estes eletrólitos inorgânicos, além de serem reguladores importantes de um grande número de outras atividades celulares, ajudam a manter as relações osmóticas entre as células e os meios que as rodeiam. Consequentemente, essa alteração pode ter efeitos prejudiciais sobre o volume das células.

(7) *Remoção de componentes vitais das células e da membrana celular:*

O  $CO_2$  acumulado pode remover constituintes vitais das células ou das membranas celulares, devido ao seu poder de solvatação relativamente alto. Neste mecanismo, sob pressão, o  $CO_2$  primeiramente penetra nas células para construir a densidade de um nível crítico no interior das células, depois, remove componentes intracelulares (como fosfolípidios e compostos hidrofóbicos) para perturbar ou alterar a

estrutura das membranas e/ou o equilíbrio do sistema biológico, promovendo assim a sua inativação.

É importante ressaltar que as etapas acima descritas (1 a 7) não acontecem consecutivamente. Pelo contrário, ocorrem simultaneamente de uma forma complexa e inter-relacionada (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2007).

#### 2.2.1.4 Fatores que afetam a inativação de micro-organismos

Diferentes fatores afetam a inativação de micro-organismos por meio do processo com dióxido de carbono pressurizado. Dentre os principais, destacam-se: a temperatura, a pressão, a taxa de despressurização, número de ciclos de pressurização, tempo de processo, razão entre CO<sub>2</sub> e produto, população inicial de micro-organismos, fase do crescimento microbiano e o meio. Zhang *et al.* (2006) e Garcia-Gonzalez *et al.* (2007) compilaram diferentes trabalhos da literatura que abordam os fatores que afetam a inativação microbiana incluindo (KAMIHIRA, TANIGUSHI & KOBAYASHI, 1987; LIN, YANG & CHEN, 1992b; LIN, CAO & CHEN, 1994; BALLESTRA, SILVA & CUQ, 1996; ERKMEN, 1997, 2000c; DILLOW *et al.*, 1999; HONG & PYUN, 1999). Devido à extensa lista de publicações, a seguir serão descritos apenas os principais aspectos dos fatores que afetam a inativação microbiana, por isso, maiores detalhes e referências citadas podem ser obtidas em Zhang *et al.* (2006) e Garcia-Gonzalez *et al.* (2007).

##### (a) Efeito da pressão:

De uma forma geral, a inativação microbiana é aumentada com o acréscimo da pressão de CO<sub>2</sub>. Sendo assim, ao utilizar pressão mais elevada, será necessário um menor tempo de processo para atingir o mesmo nível de inativação microbiana. Sobretudo, a pressão controla a taxa de solubilização do CO<sub>2</sub> e a sua solubilidade no meio. Portanto, a utilização de maiores valores de pressão no processo favorece a solubilização do CO<sub>2</sub>, que facilita a acidificação do meio externo e o contato do CO<sub>2</sub> com as células. Adicionalmente, o poder de solvatação do dióxido de carbono é aumentado com a elevação da pressão, o que facilita a remoção de constituintes essenciais das células e da membrana celular. Porém, o efeito da pressão é limitado até a saturação da solubilidade do dióxido de carbono no meio (LIN, YANG & CHEN, 1993; LIN, CAO & CHEN, 1994; HONG & PYUN, 1999).

(b) *Efeito da temperatura:*

A temperatura também influencia a inativação microbiana. De uma forma geral, a taxa de inativação aumenta com a elevação da temperatura. Maiores temperaturas estimulam a difusividade do dióxido de carbono e também podem aumentar a fluidez da membrana celular, facilitando assim, a penetração do CO<sub>2</sub>. Porém, o tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado não deve ser realizado com temperaturas muito acima da temperatura crítica do CO<sub>2</sub> porque nesta região, a densidade do CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente sua capacidade de solubilização, diminui com o aumento da temperatura. De um lado, a temperatura favorece a penetração do CO<sub>2</sub>; por outro, pode inibir a solubilidade do CO<sub>2</sub>. Temperaturas muito elevadas também devem ser evitadas para não prejudicar a qualidade nutricional e sensorial do alimento (LIN, YANG & CHEN, 1992a, 1993; LIN, CAO & CHEN, 1994; HONG & PYUN, 1999; GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2007).

(c) *Efeito do estado físico do CO<sub>2</sub>:*

O processo com dióxido de carbono pressurizado pode ser realizado em duas condições: subcrítica (líquido ou gás) ou no estado supercrítico, dependendo da temperatura e da pressão do CO<sub>2</sub>. No ponto crítico ou nas suas proximidades, o CO<sub>2</sub> apresenta características intermediárias entre um líquido e um gás, que possibilita uma maior inativação microbiana, quando comparado ao CO<sub>2</sub> no estado subcrítico. Resultados obtidos por Gunes, Blum e Hotchkiss (2005), Dillow *et al.*(1999), Hata, Kumagai e Nakamura (1996), Lin, Yang e Chen (1992b) e Kamihira, Tanigushi e Kobayashi (1987) indicam que a utilização do dióxido de carbono no estado supercrítico favorece a inativação microbiana quando comparada com a obtida utilizando CO<sub>2</sub> no estado subcrítico. No entanto, Enomoto *et al.*(1997) encontraram melhores resultados na inativação de esporos de *B. megaterium* utilizando o dióxido de carbono na condição subcrítica.

(d) *Efeito da agitação:*

A agitação pode aumentar a solubilização do CO<sub>2</sub> e o seu contato com as células microbianas, facilitando a penetração do dióxido de carbono e, conseqüentemente, favorecendo a inativação (DILLOW *et al.*, 1999; LIN, CAO & CHEN 1994; LIN, YANG & CHEN (1992b, 1993). Porém, não há estudos que indiquem a velocidade adequada para favorecer a inativação microbiana.

(e) *Efeito do conteúdo de água:*

A inativação microbiana depende fortemente do conteúdo de água ( $a_w$ ) do meio em que as células estão suspensas durante o tratamento com o dióxido de carbono pressurizado. Células vegetativas presentes em meio com baixo conteúdo de água apresentam menor grau de inativação, sendo que a resistência à inativação aumenta com a diminuição da atividade de água. Provavelmente a inativação microbiana é maior quando a água está presente no meio, devido ao aumento na solubilidade do  $\text{CO}_2$  e, portanto, aumenta a formação e dissociação de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , que libera mais íons  $\text{H}^+$  que, por fim, diminui o pH do meio suspenso (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2007).

(f) *Suscetibilidade de diferentes micro-organismos:*

Quando comparadas com as bactérias Gram-negativas, as Gram-positivas possuem a parede celular com composição e espessura diferenciada. Essas características proporcionam às bactérias Gram-positivas maior resistência ao processamento com dióxido de carbono, particularmente na etapa 2, do mecanismo de inativação (seção 2.2.1.3) (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2007).

(g) *Efeito da concentração inicial de bactérias:*

A população inicial de bactérias afeta a eficiência do processo de inativação utilizando dióxido de carbono pressurizado. Nas mesmas condições, quando a população inicial de bactérias é menor, obtém-se maior inativação. Com isso, nos casos em que a concentração inicial de micro-organismos é elevada, é necessário aumentar o tempo de processo para obter o mesmo nível de inativação, conforme resultados obtidos por Erkmen (2000a, c, d). Uma elevada concentração inicial parece exercer um efeito de proteção nas células microbianas, que estarão menos expostas ao efeito do  $\text{CO}_2$  pressurizado. Por outro lado, quando a carga microbiana inicial é menor, as células ficarão mais expostas ao  $\text{CO}_2$  durante o processo e, portanto, mais sensíveis a inativação (TAHIRI *et al.*, 2006).

(h) *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 com  $\text{CO}_2$  pressurizado. 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). Lin, Cao e Chen (1994) sugerem que a resistência à inativação de células vegetativas suspensas em um meio complexo está possivelmente 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

(i) *Efeito do estágio do crescimento de bactérias:*

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. Hong e Pyun (1999) sugerem que a maior resistência de micro-organismos na 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.

(j) *Efeito da combinação de processos:*

Alguns estudos foram realizados combinando o processo com CO<sub>2</sub> pressurizado e outros tratamentos (PARK, LEE & PARK, 2002; SPILIMBERGO *et al.*, 2003; FROEHLICH, VILLAVINCENCIO & VANETTI, 2009; PATARO *et al.*, 2010), como por exemplo, alta pressão hidrostática, irradiação, etc. Esta abordagem, oriunda da Teoria dos Obstáculos, pode favorecer o efeito letal sobre do processamento não térmico bem como pode diminuir a severidade dos processos para a obtenção de um determinado grau de inativação.

## **2.2.2 Aplicações de dióxido de carbono à alta pressão para inativação de micro-organismos**

### **2.2.2.1 Inativação de micro-organismos em meio de cultura**

O dióxido de carbono pressurizado tem sido utilizado em 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. Alguns trabalhos envolvendo a inativação de esporos também foram realizados. Perrut (2012) reuniu as principais publicações sobre este assunto, destacando os gêneros já estudados:

*Alicyclobacillus*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Legionella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Salmonella* e *Streptococcus*.

Destaca-se a publicação de dois trabalhos Silva *et al.* (2013) e Soares *et al.* (2013), após a revisão de Perrut (2012), que discutem o efeito de fatores como a pressão, o número de ciclos de pressurização e despressurização, razão entre a massa de CO<sub>2</sub> e o inóculo, e a taxa de despressurização, na inativação de *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Silva *et al.* (2013) observaram que o número de ciclos de pressurização e despressurização e a pressão têm efeito positivo significativo na inativação de *E. coli*. A inativação desta bactéria seguiu uma cinética de primeira ordem, sendo que a taxa de inativação aumentou com a elevação da pressão de 80 a 160 bar. Os autores obtiveram o valor de D (tempo de redução decimal) entre 1,03 a 5,35 minutos.

Erkmen e Karaman (2001) observaram que a inativação de *E. coli* segue uma cinética de primeira ordem. A constante de inativação e o tempo de redução decimal variaram de 0,0848 para 0,4717 min<sup>-1</sup> e 4,90 para 27,46 min, respectivamente,

Por outro lado, Soares *et al.* (2013), ao avaliar a inativação de *L. monocytogenes*, encontrou valor de D superiores, entre 12,66 a 17,85 minutos. Em geral, as bactérias Gram-positivas, como a *Listeria*, são mais resistentes à pressão quando comparadas com as Gram-negativas, como a *E. coli*.

Meujo *et al.* (2010) avaliaram a inativação de *Vibrio fisheri* em meio de cultura e obtiveram a redução de sete ciclos logarítmicos, na condição de processamento a 100 bar, 37°C e 30 minutos.

### 2.2.2.2 Inativação de micro-organismos em alimentos

O processo utilizando dióxido de carbono pressurizado tem sido aplicado, na sua maioria, em alimentos líquidos, particularmente, em suco de frutas. Até o momento, não há registro de alimentos comerciais, processados com a tecnologia de CO<sub>2</sub> pressurizado. A seguir, faz-se uma revisão dos principais estudos publicados, envolvendo alimentos processados com CO<sub>2</sub> pressurizado.

Arreola *et al.*(1991) analisaram o efeito do tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico na redução de micro-organismos aeróbios em suco de laranja. O produto foi tratado com CO<sub>2</sub> supercrítico em diferentes temperaturas (35 até 60°C) e pressões (83 até 331 bar). A condição de 35°C, 330 bar e 1 hora de processo, possibilitou a redução de 2 ciclos logarítmicos. Nesta mesma condição de pressão, porém com o aumento da temperatura para 45°C e para 60°C, a redução de 2 ciclos logarítmicos ocorreu em 45 e 15 minutos de processo, respectivamente. Os valores de D para micro-organismos aeróbios em suco tratado com CO<sub>2</sub> supercrítico a 331 bar nas temperaturas de 35, 45 e 60°C foram de 28, 22,6 e 12,7 minutos respectivamente. Os valores de Z obtidos foram: 180°C, 167°C e 72°C para 83, 207 e 331 bar respectivamente.

Erkmen (1997) estudou o efeito do processo com CO<sub>2</sub> pressurizado na redução de Aeróbios Mesófilos e *S. aureus* em leite integral e desnatado. A eliminação da carga inicial de Aeróbios Mesófilos (aproximadamente 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> UFC/mL) e *S. aureus* (10<sup>8</sup> UFC/mL) foi possível com o tratamento a 146 bar por 5 horas em leite integral e com o tratamento a 90 bar por 2 horas em leite desnatado. Em ambos os casos, a temperatura utilizada foi de 25°C.

Park, Lee e Park (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. Os autores também avaliaram o efeito combinado de CO<sub>2</sub> pressurizado e o tratamento à 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.

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 (2006) avaliou 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, 34,5 MPa por 6

minutos. O autor concluiu que é possível obter um produto (água de coco) com uma vida útil superior a nove semanas (armazenado a 4°C), apresentando características sensoriais próximas ao do produto *in natura*.

Liao *et al.* (2007) avaliaram a inativação de *E. coli* inoculado em suco de maçã não clarificado utilizando CO<sub>2</sub> pressurizado. Nas condições de 200 bar e 37°C ou de 300 bar e 42°C, a inativação da *E. coli* aumentou significativamente com o aumento do tempo de processo. O aumento da temperatura ou do tempo de processo proporcionou um efeito significativo na redução deste micro-organismo, sendo que a máxima redução (7,66 log UFC) foi obtida no tratamento a 450 bar, 52°C por 30 minutos. O número inicial de micro-organismos (N<sub>0</sub>) também influenciou o processo de inativação. No tratamento a 200 bar e 37°C, por exemplo, o maior grau de inativação aconteceu quando a contagem inicial foi igual a 10<sup>5</sup> UFC/mL do que 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Dehghani *et al.* (2009) avaliaram o efeito do tratamento com dióxido de carbono pressurizado na inativação de Aeróbios Mesófilos e fungos em *ginseng* em pó. O tratamento nas condições de 60°C, 100 bar e 15 horas de processamento possibilitou a redução de 2,67 ciclos logarítmicos na contagem de Aeróbios Mesófilos. No entanto, ao adicionar pequena quantidade de uma mistura de água, etanol e peróxido de hidrogênio, possibilitou a completa inativação de fungos e 4 reduções na contagem de Aeróbios Mesófilos com 6 horas de processo. A completa inativação dos micro-organismos Aeróbios Mesófilos e fungos foi obtida com 2 horas de processo, a 30°C, 170 bar e 0,1mL de cada aditivo (água, peróxido de hidrogênio e etanol) por grama de *ginseng*.

Amostras de pimenta-do-reino em pó inoculadas com, aproximadamente, 10<sup>6</sup> UFC/g 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 o qual, por sua vez, age sobre o micro-organismo, eliminando-o (FROEHLICH, VILLAVINCENCIO & VANETTI, 2009). A temperatura influencia a inativação dos esporos no processamento com CO<sub>2</sub> supercrítico. Temperaturas maiores (na faixa de 50 a 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).

Suco de maçã, inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*, foi submetido ao tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico, na temperatura de 36°C, nas pressões de 100 e 200 bar e em diferentes tempos de processamento (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 minutos). Os resultados experimentais indicaram a eficácia do método proposto, sendo que a inativação foi maior com o aumento do tempo de processo e com o aumento da pressão. Na condição de 50 minutos e 200 bar, por exemplo, foram obtidas 4,54 reduções logarítmicas de *Saccharomyces cerevisiae*, em suco de maçã (SPILIMBERGO, MANTOAN & DALSER, 2007).

Froehlich, Villavincencio e Vanetti (2009) também avaliaram o efeito combinado do CO<sub>2</sub> supercrítico e da irradiação sobre os esporos de *B. cereus*, em pimenta-do-reino. A aplicação prévia de CO<sub>2</sub> supercrítico (350 bar, 40°C por 30, 45 e 60 minutos) não potencializou o efeito da irradiação sobre os esporos de *B. cereus*, com doses de 2,3 e 4kGy.

Ovo líquido foi submetido ao tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado para avaliar a inativação da microbiota naturalmente presente no produto. Dentre as variáveis estudadas, a temperatura, a razão volumétrica e a agitação apresentaram efeito significativo na inativação da microbiota presente no ovo líquido. A melhor condição de processo foi de 130 bar, 45°C, 50% razão volumétrica e 400 min<sup>-1</sup> de agitação, por 10 min. O processo com CO<sub>2</sub> pressurizado possibilitou o aumento da vida útil do produto para cinco semanas, com armazenamento a 4°C, cujo prazo é o mesmo do ovo líquido pasteurizado (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2009).

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*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *E. coli* O157:H7, as condições: 100, 120 e 140 bar, 40 e 45°C, por 20, 30 e 40 minutos. O tratamento foi mais efetivo na destruição dos micro-organismos patogênicos nas amostras de molhos quando comparados com o produto suíno marinado. A 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 na contagem de micro-organismos aeróbios 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, 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).

Meujo *et al.* (2010), ao estudarem o efeito do CO<sub>2</sub> supercrítico na inativação microbiana de ostras inteiras, obtiveram duas reduções logarítmicas e três reduções logarítmicas na Contagem de 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 tratados a 100 bar e 37°C durante 30 minutos. A análise sensorial indicou que não houve diferença significativa na aparência, odor e na textura das ostras *in natura* e ostras tratadas. E ainda, os autores avaliaram a inativação de *Vibrio fisheri* e obtiveram a redução de sete ciclos logarítmicos, na condição de processamento a 100 bar, 37°C e 30 minutos. Cabe destacar que os experimentos foram realizados em um equipamento disponível comercialmente, destinado à extração supercrítica (SFT-150 SFE System, Estados Unidos).

O tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado foi utilizado para avaliar a inativação de micro-organismos naturalmente presentes em paprika. Foram testadas diferentes condições de umidade inicial do produto (< 35%), pressão (60 a 300 bar), temperatura (< 95°C) e tempo de processo (10 a 150 minutos). A inativação completa não foi obtida em função da presença de esporos muito resistentes no produto. Os parâmetros que mais influenciaram na inativação foram a umidade inicial do produto e a temperatura, possivelmente devido às contribuições para a ativação e germinação dos esporos, possibilitando, na sequência, a atuação do CO<sub>2</sub> pressurizado. Os autores destacam que o conteúdo de água pode também desempenhar um papel-chave na redução do pH externo, o que parece atuar sinergicamente com o CO<sub>2</sub>. No entanto, a umidade inicial e a temperatura devem ser mantidas, respectivamente, abaixo de 25 - 30% e

85 - 90°C, para evitar alterações na qualidade da paprika. Os autores sugeriram a utilização de pressão em um nível relativamente baixo (60 – 100 bar) porque a ação hidrostática não melhorou a transferência do CO<sub>2</sub> nem contribuiu para quaisquer ações esporicidas do CO<sub>2</sub> (CALVO & TORRES, 2010).

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 0,385 gCO<sub>2</sub>/gsuco, por 15 minutos, permitiram a obtenção de um produto com prazo de validade de 20 dias, armazenado em refrigeração. As propriedades nutricionais e antioxidantes do produto foram praticamente inalteradas durante esse período.

Cidra de maçã, contaminada com *E. coli* K12, foi submetida ao tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico, nas seguintes condições de processo: concentração de CO<sub>2</sub> de 0 – 10% (g CO<sub>2</sub>/100g produto), temperatura de 34, 38 e 42°C, pressão igual a 76 bar e uma vazão de CO<sub>2</sub> de 1L/min. A condição de 0,8% CO<sub>2</sub> e 42°C proporcionou a redução de 7,31 ciclos logarítmicos de *E. coli* K12. Análise de microscopia eletrônica indicou que as células da bactéria foram danificadas. O crescimento de *E. coli* K12 na cidra não foi observado em 4 semanas de armazenamento a 4, 8 e 20°C. No entanto, a microbiota natural presente na cidra multiplicou-se durante a estocagem a 8 e 20°C. Desta forma, os autores recomendam que o produto processado seja armazenado sob refrigeração, com vistas ao aumento da sua vida útil (YUK, GEVEKE & ZHANG, 2010).

Valverde, Marín-Iniesta e Calvo (2010) utilizaram peras *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 a 300 bar), temperaturas (25 a 55°C) e tempos de exposição (10 a 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.

Bi *et al.* (2011) avaliaram o efeito do tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado na inativação da microbiota naturalmente presente em cenouras frescas fatiadas. Na condição 50 bar, 20°C por 20min, foram obtidas significantes reduções da microbiota (1,86 para a contagem de

aeróbios e 1,25 na contagem de bolores e leveduras), ao mesmo tempo em que a firmeza do produto foi mantida, após o processamento.

O efeito do ultrassom sobre a cinética de inativação de *E. Coli* por meio do CO<sub>2</sub> supercrítico em diferentes pressões (100, 225, 290 e 350 bar, 36 ° C), temperaturas (31°C, 36°C e 41°C, 225 bar) e variando a composição do meio (caldo LB, suco de maçã e suco de laranja) foi estudada. Ao utilizar apenas o tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico, a taxa de inativação aumentou progressivamente com o aumento da pressão ou da temperatura. E ainda, a composição do meio influenciou a taxa de inativação da *E. coli*, sendo que nos sucos (maçã e laranja) o tempo para a redução de 1 ciclo logarítmico foi de 25 minutos enquanto no meio LB foi de 22 minutos. Quando foram utilizados CO<sub>2</sub> supercrítico e o ultrassom, o tempo médio necessário para obter a redução de 8 ciclos logarítmicos foi reduzido em 95%, demonstrando um efeito sinérgico entre estes dois processos. E ainda, ao inserir o ultrassom, a inativação da *E. coli* foi similar, independente do meio testado (ORTUÑO *et al.*, 2012a).

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 ou 52°C por 5, 10, 15, 20, 25 ou 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. 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 do micro-organismos, nas condições de processo a 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.

Esporos de *Penicillium oxalicum*, fungo patogênico, inoculados em grãos de trigo, foram submetidos ao tratamento com CO<sub>2</sub> pressurizado, em diferentes condições de temperatura, tempo de processo e quantidade de água como co-solvente. Dentre estas variáveis, a adição de água proporcionou o maior efeito na inativação dos esporos

de *P. oxalicum*. Os autores compararam a inativação de esporos secos e em suspensão, na condição de processo de 200 bar, 35°C e 2 horas de processo. Para os esporos em suspensão foi obtida a redução de 7 ciclos logarítmicos; em contrapartida, apenas a redução de um ciclo logarítmico foi obtida para esporos secos. A melhor condição de processo obtida neste estudo foi de 44°C, 233µL de água e 11 minutos, resultando na inativação de 6,41 ciclos logarítmicos (PARK *et al.*, 2012).

Ji *et al.* (2012) estudaram a inativação microbiológica de *Litopenaeus vannamei* (camarão) com dióxido de carbono pressurizado, por meio de um equipamento comercial de extração supercrítica (Nantong Huaan Supercritical Extraction Co. Ltd., China). As amostras foram submetidas a diferentes condições de temperatura (35°C, 45°C e 55°C), pressão (50, 150 e 250 bar) e tempo (5, 35 e 65 minutos). Os resultados mostraram que o efeito de inativação foi maior com o aumento do tempo, da pressão e da temperatura, porém o tempo de processo e temperatura foram as variáveis com maior efeito na inativação microbiológica de camarão. Os parâmetros de processo (temperatura, tempo e pressão) foram otimizados por meio de um *software* (Neural platform of software JMP) e a condição 55°C, 150 bar e 26 minutos proporcionou uma redução de 3,5 ciclos logarítmicos (redução alvo) na contagem de bactérias Aeróbias Mesófilas. Nesta condição, o camarão apresentou aparência de cozido, contudo, de acordo com os autores, esta alteração é desejável para os consumidores chineses que têm hábito de consumo do produto com esta característica.

Ferrentino, Balzan e Spilimbergo (2013) investigaram o efeito do tratamento com dióxido de carbono supercrítico na inativação da carga microbiológica naturalmente presente em cubos de presunto cozido. A melhor condição de processo foi escolhida, por meio da utilização da metodologia de superfície de resposta e de um planejamento composto central. A análise de superfície de resposta indicou que 120 bar, 50°C, 5 min foi a condição ótima para obter cerca de 3,0, 1,6 e 2,5 reduções logarítmicas para micro-organismos Aeróbios Mesófilos, bactérias psicrófilas e bactérias ácido-láticas, respectivamente. Bolores leveduras também foram inativados a níveis não detectáveis. Os autores avaliaram o crescimento microbiano por um período de 30 dias de armazenamento do produto processado na melhor condição. O estudo mostrou que o processo diminuiu o crescimento microbiano assegurando um teor em produtos tratados comparáveis para o inicial nas amostras frescas após 30 dias de armazenamento. No que diz respeito às análises qualitativas, a cor das

amostras processadas foi levemente alterada, porém o pH e a textura permaneceram inalteradas.

## 2.3 MODELOS MATEMÁTICOS QUE DESCREVEM A INATIVAÇÃO MICROBIANA

A microbiologia preditiva baseia-se na hipótese de que o efeito de características intrínsecas (pH, atividade de água, etc) ou extrínsecas (temperatura, pressão, etc) pode ser predito por meio de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos micro-organismos (NAKASHIMA, ANDRÉ & FRANCO, 2000).

Os modelos matemáticos que formam a microbiologia preditiva podem ser classificados em modelos primários e secundários. Os modelos primários descrevem mudanças no número de micro-organismos, ou outras respostas microbianas, em função do tempo. Os modelos secundários descrevem como as respostas dos parâmetros dos modelos primários variam em função de outros parâmetros, como temperatura, atmosfera que envolve o alimento, acidez, atividade de água, teor de sal, entre outros (WHITING & BUCHANAN, 1993).

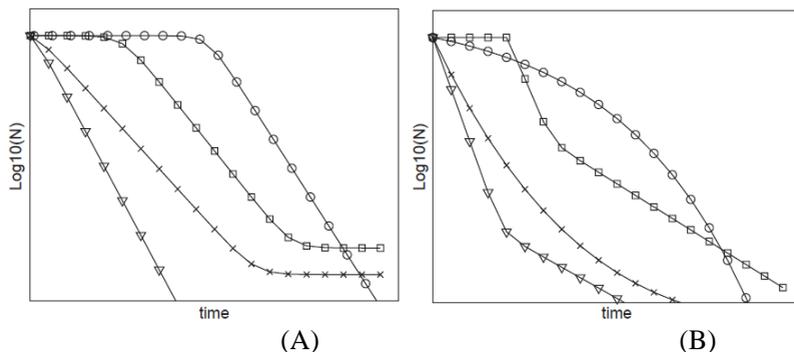
Por muito tempo, a inativação microbiana foi descrita como um modelo cinético de primeira ordem ou modelo de Bigelow (1).

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -kt \quad (1)$$

Onde  $N(t)$  é a população de micro-organismos (UFC/mL) no instante  $t$  (tempo),  $N_0$  é a população inicial do micro-organismo (UFC/mL), e  $k$  é o inverso do valor  $D$  (tempo para reduzir a população de micro-organismos em um ciclo logarítmico).

Neste caso, assume-se que todos os micro-organismos são idênticos e que, quando expostos a uma condição adversa, a destruição ocorre de forma exponencial. Entretanto, hoje, considera-se que a inativação de vários micro-organismos não acontece dessa forma. Por isso, modelos de inativação microbiana não-lineares têm sido apresentados na literatura e são usados para descrever a cinética de inativação de diferentes micro-organismos, com comportamento variado (PELEG & COLE, 1998; PELEG, 2003; GEERAERD, VALDRAMIDIS & IMPE, 2005), conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Exemplos de curvas de inativação comumente encontradas na literatura. A - log-linear ( $\nabla$ ); log-linear + cauda (x); sigmoidal ( $\square$ ); ombro + log-linear ( $\circ$ ). B - bifásica ( $\nabla$ ); côncava (x); ombro + bifásica ( $\square$ ); convexa ( $\circ$ ).



FONTE: Geeraerd, Valdramidis e Impe (2005).

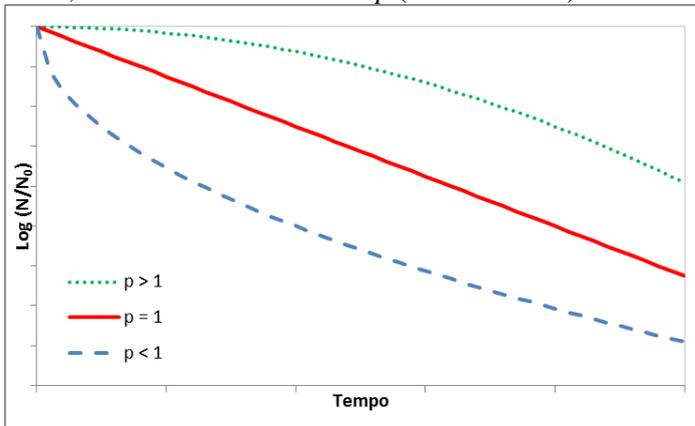
Ao longo dos anos, diferentes modelos primários têm sido propostos para descrever curvas de sobreviventes não lineares, entre eles: Gompertz-modificado, log-logístico (COLE *et al.*, 1993), Baranyi (BARANYI & ROBERTS, 1994) e Weibull (PELEG & COLE, 1998). Dentre eles, o clássico modelo de Weibull, descrito por Mafart *et al.* (2002) (2), tem sido comumente utilizado para descrever a inativação de micro-organismos, em função da sua simplicidade matemática e grande flexibilidade. Este modelo assume que as células microbianas de uma população apresentam diferentes resistências e a curva de sobreviventes é a função distribuição acumulada do efeito dos agentes letais (CHEN & HOOVER, 2004)

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\Delta}\right)^p \quad (2)$$

Onde  $N(t)$  é a população de micro-organismos (UFC/mL) no instante  $t$  (tempo),  $N_0$  é a população inicial do micro-organismo (UFC/mL),  $p$  é o fator de forma, e  $\Delta$  ( $\text{h}^{-1}$ ) é o fator de localização, sendo que os parâmetros ajustáveis são  $p$  e  $\Delta$ .

No modelo de Weibull, a direção da concavidade ( $p$ ) da curva de sobreviventes representa as diferentes vias de inativação dos micro-organismos, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Exemplo de curvas de sobreviventes descritas pelo modelo de Weibull, com diferentes valores de  $p$  (fator de forma).



Quando  $p > 1$ , as curvas apresentam concavidades voltadas para baixo, indicando que o tempo para inativar um mesmo número de micro-organismos diminui progressivamente. Quando  $p < 1$ , as curvas apresentam concavidades voltadas para cima, sugerindo que o número de micro-organismos diminui rapidamente, porém, à medida que o processo de destruição ocorre, uma cauda é formada, indicando que a população residual é altamente resistente (ARAGAO *et al.*, 2007). Quando  $p = 1$ , então, a curva de sobreviventes é linear, considerada como cinética de primeira ordem.

A utilização de modelos preditivos para descrever o comportamento da inativação de micro-organismos por meio do tratamento com dióxido de carbono pressurizado, ainda tem sido pouco explorada. A maioria das publicações sobre este assunto apresentam os pontos experimentais da cinética de inativação (LIN, CAO & CHEN, 1994; DILLOW *et al.*, 1999; DEHGHANI *et al.*, 2009; GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2009; JUNG, CHOI & RHEE, 2009; MEUJO *et al.*, 2010; CHECINSKA *et al.*, 2011; ORTUÑO *et al.*, 2012a), sendo que alguns poucos trabalhos propõem o ajuste de um modelo preditivo para descrever os dados experimentais de inativação.

Dentre os trabalhos que discutem o ajuste de modelos matemáticos, a maioria deles propõe que a cinética de inativação de micro-organismos por meio de tratamento de dióxido de carbono segue uma cinética de primeira ordem (BALLESTRA, SILVA & CUQ, 1996; HATA, KUMAGAI & NAKAMURA, 1996; ERKMEN, 2001a, 2002;

ERKMEN & KARAMAN, 2001; SHIMODA *et al.*, 2001; DEGHANI *et al.*, 2009; CALVO & TORRES, 2010; LI *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013).

Todavia, a utilização de modelos não lineares também tem sido proposta. Erkmen (2000b) utilizou diferentes modelos sigmoidais (Whiting and Buchanan modificado, Schnute, Richards, Stannard, Whiting e Buchanan, Gompertz e logístico) para descrever a inativação de *L. monocytogenes* por meio do dióxido de carbono supercrítico. Em todos os casos, com exceção do modelo logístico, os valores de  $R^2$  foram superiores a 0,98, indicando um bom ajuste dos modelos aos dados experimentais.

O modelo de Gompertz modificado foi utilizado por Erkmen (2001b) para descrever o comportamento da inativação de *E. coli* por meio do dióxido de carbono pressurizado.

O modelo de Weibull, descrito por Peleg e Cole (1998), foi utilizado para ajustar dados experimentais de inativação de *E. coli* publicados na literatura (PELEG, 2002). Ferrentino *et al.* (2008) também aplicaram o modelo de Weibull para descrever a cinética de inativação de micro-organismos aeróbios presentes em suco de maçã.

Liao *et al.* (2008) utilizaram o modelo proposto por Xiong *et al.* (1999) para descrever a inativação de *E. coli* presente em suco de maçã por meio de dióxido de carbono supercrítico. A curva de inativação apresentou característica sigmoidal, com presença de ombro e cauda.

Ortuño *et al.* (2012b) testaram os modelos de Fermi, Gompertz e Weibull para descrever a inativação de *E. coli* e *S. cerevisiae*, em diferentes estágios de crescimento, por meio de dióxido de carbono supercrítico. O modelo de Gompertz foi o que melhor descreveu a inativação da *S. cerevisiae* nas diferentes fases do crescimento. No caso da *E. coli*, o modelo de Weibull apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais.

A qualidade do ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais é avaliada por meio de parâmetros estatísticos, sendo que os mais comumente utilizados são o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o erro médio quadrático (MSE).

O coeficiente de determinação indica a confiabilidade de um modelo e descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. O  $R^2$  varia entre 0 e 1, assim, quanto mais próximo de 1, melhor é a predição do modelo.

O índice MSE, calculado conforme (3), é uma medida da variabilidade residual, ou seja, descreve o quanto os valores preditos

estão próximos dos valores observados. Quanto mais próximo de zero é este índice, melhor é o ajuste do modelo.

$$MSE = \sum \frac{(valor_{observado} - valor_{predito})^2}{n} \quad (3)$$

Onde  $n$  é o número de graus de liberdade (o número de pontos experimentais menos o número de parâmetros do modelo).

## 2.4 PATENTES

Foi realizada uma pesquisa preliminar nas duas principais bases de dados de patentes: USPTO e WIPO. Não foi encontrado nenhum registro de depósito de patente envolvendo o tratamento de alimentos com dióxido de carbono supercrítico, empregando a mesma técnica proposta neste trabalho.

García-Gonzales et al. (2007) relacionaram as patentes depositadas cujo objetivo é a inativação microbiana (Tabela 8). Existem também algumas outras patentes que, embora estejam relacionadas com conceito de pasteurização / esterilização com dióxido de carbono à alta pressão para inativação microbiana, apresentam o processo em combinação com outras técnicas (como por exemplo, uso de filtro de esterilização, descompressão explosiva, etc.) (Tabela 9), em certo grau, diferentes da técnica proposta neste trabalho. Cabe ressaltar que, atualmente, grande valor tem sido atribuído não somente ao processo em si, mas principalmente ao sistema envolvido. Isto é, a invenção não tem sido valorizada apenas pela técnica (processo envolvido) proposta, como também, pelo sistema (arranjo de equipamentos, aparato experimental) empregado. Assim, pode-se afirmar que, até o presente momento, não foram encontrados registros de propriedade intelectual similar, em sistema e processo, ao proposto nesta tese.

Tabela 8 – Patentes relevantes envolvendo dióxido de carbono à alta pressão para pasteurização/esterilização

<b>Depositante</b>	<b>Número</b>	<b>Observações</b>	<b>País</b>
Franz Juchem GmbH	DE 3734025 A1	Método para aumentar a vida útil de produtos líquidos (ovo líquido e produtos lácteos)	Alemanha
University of Florida	US 5.393.547	Método para inativação de	Estados

	WO 90/02799	enzimas	Unidos
Franz Juchem GmbH	EP 0 488 012 B1	Método para redução de germes em produtos semi-prontos em produtos com farinha de trigo	Alemanha
Shimadzu Corporation and Nippon Tansan Company, Ltd	US 5.520.943	Diferentes métodos e aparato para inativação de enzimas e micro-organismos em líquidos, ou para desodorização materiais líquidos usando microbolhas de CO <sub>2</sub> em batelada ou em processo contínuo	Japão
	US 5.667.835		
	US 5.704.276		
	US 5.869.123		
	EP 0786 513 B1		
	US 6.616.849 B1		
University of Florida Research Foundation	US 6.723.365 B2	Método contínuo e aparato para redução de atividade microbiana e/ou enzimática em líquidos	Estados Unidos
	US 2004/0131739 A1	Método de batelada para esterilização de materiais médicos, particularmente polímeros para implementação e entrega de medicamentos	Estados Unidos
Massachusetts Institute of Technology	US 6,149,864 WO 99/066960	Método contínuo e aparato para redução de atividade microbiana e/ou enzimática em líquidos	Estados Unidos
Praxair Technology, Inc.	US 2002/0122860	Método contínuo e aparato para redução de atividade microbiana e/ou enzimática em líquidos	Estados Unidos
	EP 0 979 657 A1 WO 03/03816 A1		
Porocrit, LLC	US 6.331.272 B1	Método contínuo e aparato para preservação de líquidos	Estados Unidos
	WO 00/41805		
Kyushu TLO Company, Ltd.	WO 2004/045316 A1	Método contínuo e aparato para inativação de enzimas, redução microbiana e remoção de CO <sub>2</sub> dissolvido no líquido para minimizar a perda de componentes	Japão

---

		aromáticos	
Kyushu TLO Company, Ltd	WO 2004/000434 A1	Método contínuo para separar o gás de CO <sub>2</sub> dissolvido do líquido em tratamento eficientemente	Japão
Safe-Fresh Technologies, LLC	WO 03/101210 A1	Método para descontaminação pressurizada de carne usando ácido carbônico	Estados Unidos
LBG Invest and Consulting nv	WO 2004/039180 A1	Método de batelada para inativação microbiana contaminante em líquido com alto teor de gordura e/ou alimentos protéicos ou ração animal	Bélgica
University of Florida	US 2004/0234661 A1 WO 2005/034655 A1	Método contínuo e aparato para redução de atividade microbiana e/ou enzimática em cervejas e vinhos	Estados Unidos
-	US 2005/0084581 A1	Método e aparato (sem necessidade de grandes vasos de pressão) para inativação de enzimas e micro- organismos em líquidos	-
NovaSterilis Inc.	US 2005/0025667	Método e aparato para atingir redução microbiana de 6D em biomateriais usando CO <sub>2</sub> pressurizado contendo produtos químicos	Estados Unidos

---

FONTE: GARCÍA-GONZALES *et al.* (2007), p. 23.

Tabela 9 – Patentes relacionadas ao conceito de pasteurização/esterilização com dióxido de carbono pressurizado

<b>Depositante</b>	<b>Número</b>	<b>Observações</b>	<b>País</b>
Swift and Company	US 3.483.005	Método de irradiação com CO <sub>2</sub> pressurizado para esterilizar carnes	Estados Unidos
Bayer Aktiengesellschaft	US 4.263.253 EP 0 008 454 B1	Processo para tratamento de sólidos estéreis em que o sólido é dissolvido num gás supercrítico e então transportado por um filtro estéril para reter bactérias e germes	Alemanha
Aphios Cooperation	US 5.380.826	Método e aparato para destruição supercrítica de células microbianas e extração de componentes intra-celulares	Estados Unidos
Société des Produits Nestlé SA	EP 0 674 845 B1	Método para inativação de enzimas e micro-organismos em alimentos contendo tratamento térmico dessas enzimas ou micro-organismos em um meio aquoso sob CO <sub>2</sub> ou N <sub>2</sub> O pressurizado, e na presença de um agente redutor selecionado de compostos sulfurados ativos	Suíça
Raytheon Company	US 5.996.155 WO 00/04932	Processo para limpeza, desinfecção e esterilização de materiais usando uma combinação de CO <sub>2</sub> pressurizado, radiação UV e esterilizantes	Estados Unidos
Kabushiki Kaisha SR Kaihatsu	US 2004/0120852 A1	Método e aparato para esterilização de instrumentos médicos	Japão

---

US 2002/0127317 A1	Processo para inibir ou reduzir o crescimento bacteriano com a adição de CO <sub>2</sub> e inativação térmica da bactéria no líquido
--------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

---

FONTE: GARCÍA-GONZALES *et al.* (2007), p. 24.

## 2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

O Brasil, especialmente a região da Grande Florianópolis, destaca-se na produção de ostras, em particular, por apresentar condição oceanográfica favorável ao cultivo, como a existência de baías e enseadas. Por outro lado, as ostras podem representar um risco à saúde pública, pelo fato da água de cultivo ser *habitat* natural ou contaminada por espécies patogênicas de micro-organismos. Considerando que as ostras são geralmente consumidas *in natura*, isto é, sem cozimento prévio, é essencial para o crescimento e ganho do mercado externo desta importante atividade econômica, o desenvolvimento de processos que garantam a segurança do produto para os consumidores de ostras.

A utilização de tratamentos térmicos é uma possibilidade para assegurar a qualidade higiênico-sanitária de ostras. 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. Por isso, a utilização de processos não térmicos surge como uma alternativa para assegurar 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*), tipicamente entre 500 e 1000 MPa, 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. Isto é, 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 feito considerando que a composição do produto influenciará a eficácia do tratamento. Dessa 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 natural arraste 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 arraste de elementos essenciais aos alimentos, implicando em ganho significativo de processo e melhoria importante da qualidade do produto final. Além disso, o sistema utilizado neste trabalho permite um controle da taxa de pressurização e despressurização, da quantidade de dióxido de carbono a ser adicionado e a utilização de ciclos de pressurização e despressurização. Neste sentido, o presente trabalho, em que pese sua inserção acadêmica no que concerne ao ineditismo esperado a uma tese de doutorado, pode significar ainda uma inovação tecnológica pela proposição de um novo sistema e processo de inativação de micro-organismos presentes em ostras e, possivelmente aplicável a outros produtos denominados “frutos do mar”, justificando assim a execução da presente tese.