

Adição de etanol como coadjuvante no processo de inativação de micro-organismos de ostras em dióxido de carbono supercrítico (scCO₂)

D. Soares¹, L. A. Lerin¹, A. P. T Zimann¹, A. R. Monteiro¹, J. V. OLIVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: douglas_soares@outlook.com

RESUMO – O CO₂ supercrítico tem sido apontado como alternativa para a inativação de micro-organismos em alimentos. Porém, o tempo de processo é considerado longo. Para reduzir o tempo uma alternativa é o uso de coadjuvantes como o etanol, que possui efeito bactericida. Nesse sentido, o presente estudo avaliou a influência da adição de diferentes concentrações de etanol no processo de inativação de micro-organismos de ostras em meio supercrítico. As condições operacionais estudadas foram tempo de processo de 120 min., a temperatura de 33°C ciclo de pressão de 80 – 200 – 80 bar, razão massa/massa ostras/scCO₂ de 1:08 e taxa de pressurização/despressurização de 100 bar.mim⁻¹. As concentrações de etanol testadas foram 0,1%; 0,25%; 0,5% e 1%. A condição experimental em que 0,5% de etanol foi adicionado apresentou uma redução de 4,10 Log (redução total) na contagem de aeróbios mesófilos, enquanto o controle (0% de etanol) apresentou redução de 1,23 Log dos 4,09 Logs iniciais.

1. INTRODUÇÃO

Ostras (*Crassostrea gigas*) são moluscos bivalves, que obtêm seu alimento através da filtração da água onde são cultivadas. A microbiota presente nas ostras costuma refletir as condições do ambiente de cultivo, podendo ser influenciada pela qualidade, temperatura e salinidade da água de cultivo. Esses fatores, aliados à tradição de consumir a ostra crua, tornam a ostra uma potencial ameaça à saúde pública.

Desta forma, a utilização de processos não térmicos, como a utilização do dióxido de carbono supercrítico, surge como alternativa aos métodos convencionais, buscando garantir a qualidade microbiológica das ostras, aumentando sua vida útil e preservando suas características físicas e sensoriais desejadas.

Bi *et al.* (2011) avaliaram o efeito do tratamento com CO₂ pressurizado na inativação da microbiota naturalmente presente em cenouras frescas fatiadas. Para condições experimentais de 50 bar, 20°C e tempo de 20 minutos foram obtidas reduções de 1,86 Log para a contagem de aeróbios e 1,25 Log na contagem de bolores e leveduras.

Liao *et al.* (2007) estudaram o processo de inativação de *E. coli* inoculado em suco de maçã não clarificado utilizando CO₂ pressurizado. As condições utilizadas foram 200 bar e 37°C e 300 bar a 42°C e verificou-se que a inativação da *E. coli* aumentou significativamente com o aumento do tempo de processo.

Matos e colaboradores (Patente 2013 NBR1020140041729) estudou a utilização de dióxido de carbono supercrítico na inativação de Aeróbios Mesófilos, *Vibriosp.* e *Vibrioparahaemolyticus* presentes em ostras, obtendo uma redução de 95,04% na contagem de *V. parahaemolyticus*.

O etanol possui conhecido efeito bactericida. Furukawa e Hayakawa (2000) estudaram os efeitos do etanol sobre a inativação de esporos de *Bacillusstearotherophilus* IFO 12550 em um tratamento com calor e pressão moderadamente altos. Setlow et al. (2002) relataram que a combinação de etanol e de calor teve efeitos de inativação leves sobre esporos bacterianos.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da adição de etanol no processo de inativação de micro-organismos em ostras associada à adição do CO₂ supercrítico.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 Preparação das Amostras

As ostras foram adquiridas de uma empresa local e transportadas em sacolas isotérmicas até o LATESC – UFSC. Posteriormente as ostras foram lavadas em água corrente e escovadas para a retirada de sujidades presentes na concha. Seguido da abertura das mesmas com faca específica e a retirada da parte cárnea do molusco, que posteriormente foi ao líquido intervalvar em um béquer previamente higienizado e sanitizado.

Para cada experimento foi utilizado uma dúzia de ostras. Após a abertura de todas as ostras, o conteúdo do béquer foi processado em um liquidificador por 3 minutos, também previamente higienizado e sanitizado. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 10 mL da amostra homogeneizada, usando seringas descartáveis e armazenadas sob refrigeração (7°C) até a inserção na célula de alta pressão.

2.2 Aparato Experimental

Os experimentos foram realizados em uma célula de alta pressão com visualização através de janela de safira, baseado no método estático sintético. O diagrama esquemático do aparato experimental pode ser visualizado na figura 1 e é formado basicamente pela célula de alta pressão, construída em aço inox 316, com volume máximo em torno de 27 mL, encamisada para manutenção das condições experimentais (temperatura). A pressão do sistema foi monitorada por um transdutor de pressão absoluta (Smar LD 301), acoplado a um programador portátil (Smar, HT 201) e uma bomba de seringa (ISCO 260D). A célula possui um pistão móvel, de montagem manual, que tem a função de controlar a pressão interna da célula e, sem permitir a troca de fluidos entre a parte anterior e posterior ao mesmo.

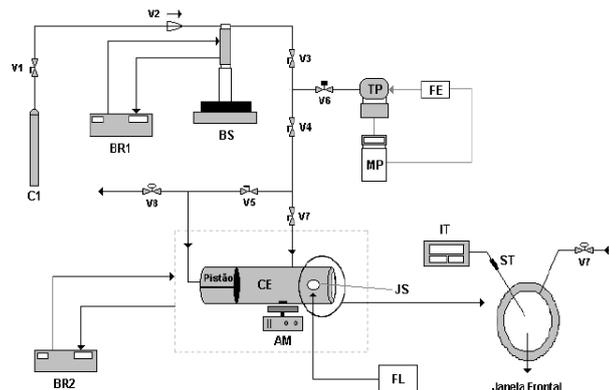


Figura 1 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

2.3 Procedimento Experimental

Foi injetado 10 gramas de amostra de ostra processada no interior da célula, com ajuda de uma seringa estéril. Em seguida foi adicionado à célula etanol (etanol absoluto PA.) nas concentrações de 0,1% - 0,25% - 0,5% - 1% (massa/massa).

Posteriormente a célula foi conectada na unidade experimental, e a mesma programada para iniciar o ciclo de pressurização e despressurização.

Os experimentos seguiram as condições estudadas por Soares *et al.* (2013) e Matos *et al.* (2013) com 2 horas de duração, temperatura igual a 33°C, 1 ciclo de pressurização/despressurização, razão massa/massa entre ostra processada e CO₂ de 1:08 e taxa de despressurização de 100 bat.mim⁻¹.

Imediatamente após o término de cada experimento, realizou-se a análise microbiológica de Aeróbios mesófilos totais, *Vibriosp. e V. parahaemolyticus*.

2.4 Análises Microbiológicas Pós-Experimentos

Contagem total de aeróbios mesófilos totais: Ao término de cada experimento retirou-se uma alíquota de 3 mL de amostra da célula, na capela de fluxo laminar e realizou-se a diluição da mesma em água peptonada 0,1% para posterior plaqueamento em meio Ágar Luria Bertani (Ágar LB, composição: tripton 10,0 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, ágar 20g/L) estéril.

As placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C. Após esse período realizou-se a contagem dos micro-organismos Aeróbios Mesófilos de cada placa, expressos em UFC/mL (A.P.H.A., 2001).

Contagem de *Vibriosp.* e de *Vibrioparahaemolyticus*: 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 salina 3% e posterior plaqueamento em meio seletivo ágar TCBS (ágar tiosulfato-citrato-sais de bile-sacarose) estéril. As placas foram incubadas por 24 horas,

à temperatura de 37°C, para contagem de *Vibriosp.* e *V. parahaemolyticus*, expressos em UFC/mL.

De acordo com a ficha técnica do fabricante dos meios (Himedia), as colônias com coloração verdes azuladas referem-se ao *V. parahaemolyticus*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de aeróbios mesófilos, de *Vibriosp.* e de *V. parahaemolyticus* empregando dióxido de carbono supercrítico com adição de alíquotas de etanol estão representados, respectivamente, na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3. Os experimentos seguiram as condições estudadas por Soares et al. (2013) e Matos et al. (2013) com temperatura igual a 33°C, 1 ciclo de pressurização/despressurização, razão massa/massa entre ostra processada e CO₂ de 1:08 e taxa de depressurização de 100 bat.mim⁻¹.

Observa-se na Tabela 1, que a adição de etanol teve efeito positivo sobre contagem de aeróbios mesófilos (UFC/mL), sendo que as alíquotas de 0,5 e 1% apresentaram inativação total dos micro-organismos tendo como ponto de partida 94,13% de inativação do experimento sem adição de etanol.

Kalil *et al.* (1994) classifica o álcool etílico com um bactericida rápido, que eliminando também o bacilo da tuberculose, os fungos e os vírus, não agindo, porém, contra os esporos bacterianos. Sua concentração ótima dá-se entre 60 e 90% por volume e, sua atividade diminuiu muito com concentração abaixo de 50%. Suas propriedades são atribuídas ao fato de causarem desnaturação das proteínas quando na presença de água e também ação bacteriostática pela inibição da produção de metabólitos essenciais para a divisão celular rápida.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios microbiológicos para a contagem de Aeróbios mesófilos em ostras in natura e ostras submetidas ao processo de inativação de micro-organismos através da ação do CO₂ supercrítico (33°C, 1 ciclo de pressurização/despressurização, razão massa/massa entre ostra processada e CO₂ de 1:08 e taxa de depressurização de 100 bat.mim⁻¹)

% etanol	N ₀	N	log N ₀	log N	log N/N ₀	N - N ₀ (%)
0	12302	724	4,09	2,86	-1,23	94,13
0,1	21067	700	4,32	2,85	-1,48	96,67
0,25	127500	5950	5,11	3,77	-1,33	95,33
0,5	12600	0	4,10	0	-4,10	100
1	3500	0	3,54	0	-3,54	100

Pode-se observar também nas Tabelas 2 e 3, que adição de 0,5% e 1% de etanol massa/massa aos experimentos apresentou inativação total de *Vibriosp* e *Vibrioparahaemoliticus*.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios microbiológicos para a contagem de *Vibriosp.* em ostras in natura e ostras submetidas ao processo de inativação de micro-organismos através da ação do CO₂ supercrítico (33°C, 1 ciclo de pressurização/despressurização, razão massa/massa entre ostra processada e CO₂ de 1:08 e taxa de depressurização de 100 bat.mim⁻¹)

% etanol	N ₀	N	Log N ₀	Log N	Log N/N ₀	Redução (%)
0	14454	66	4,16	1,82	-2,33	99,54
0,1	2143	20	3,33	1,30	-2,03	99,06
0,25	2377	685	3,38	2,84	-0,54	71,82
0,5	9650	0	3,98	0	-3,98	100
1	2540	0	3,40	0	-3,40	100

Tabela 3 – Resultados dos ensaios microbiológicos para a contagem de *Vibrioparaahaemolíticus* em ostras in natura e ostras submetidas ao processo de inativação de micro-organismos através da ação do CO₂ supercrítico (33°C, 1 ciclo de pressurização/despressurização, razão massa/massa entre ostra processada e CO₂ de 1:08 e taxa de depressurização de 100 bat.mim⁻¹)

% etanol	N ₀	N	Log N ₀	Log N	Log N/N ₀	Redução (%)
0	1000	50	3,00	1,69	-1,30	95,04
0,1	30	20	1,48	1,30	-0,18	33,33
0,25	413	40	2,62	1,60	-1,01	90,31
0,5	160	0	2,20	0	-2,20	100
1	540	0	2,73	0	-2,73	100

Park *et al.* (2012) compararam a eficiência da adição de etanol na inativação de esporos de *Alternaria brassicicola* (KACC 40036) através da ação de scCO₂. Partindo de uma suspensão inicial de esporos de 1x10⁷ UFC/mL, os autores observaram que a adição de etanol (16%) ao sistema reduziu pela metade, de 90 para 45 minutos o tempo necessário para a inativação completa dos esporos fúngicos.

Park *etal.*^b (2013) testou a eficácia da adição de etanol ao dióxido de carbono supercrítico na inativação de esporos de *Bacillus cereus* em biofilmes, cultivados em aço inoxidável. Nos experimentos sem etanol não houve sucesso, utilizando pressões entre 10 e 30 MPa, temperatura entre 35 e 60 ° C e tempo entre 10 e 120 min. Quando 10 mL de etanol foram adicionados como um co-solvente com scCO₂, após 90 minutos a 10Mpa o biofilme foi completamente inativado.

Chianget *al.* (2006) observou que a população viável de *V. parahaemolyticus* aumentou acentuadamente em TSB-NaCl 3%, sem etanol, a partir de uma população inicial de 6,0 log ufc/mL a 9,0 log de UFC/mL em 250 minutos. Observou também, que a adição de 2% de etanol não apresentou efeito inibidor no crescimento do micro-organismo. Por outro lado, a presença de etanol em TSB-3,0% de NaCl, resultou numa inibição parcial ou efeito bactericida sobre *V. parahaemolyticus*, dependendo da concentração de etanol utilizada. O

etanol, a uma dosagem de 8,0% exerceu um efeito bactericida sobre o microrganismo de teste. Enquanto em 5%, o etanol causou inibição parcial do crescimento e redução da taxa de crescimento do micro-organismo.

4 CONCLUSÕES

A adição de etanol, nas concentrações estudadas, mostrou efeito positivo no processo de inativação de micro-organismos de ostras através da ação de dióxido de carbono supercrítico.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, ao CNPq e a Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

6 REFERENCIAS

- A.P.H.A. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a. ed. Baltimore: Maryland: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF), 2001.
- BI, X.; WU, J.; ZHANG, Y.; XU, Z. & LIAO, X. High pressure carbon dioxide treatment for fresh-cut carrot slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 12, n. 3, p. 298-304, 2011.
- CHIANG, M-L., HO, W-L., CHOU, C-C. Response of *Vibrio parahaemolyticus* to ethanol shock. *Food Microbiology*, v. 23, p. 461-467, 2006.
- FURUKAWA, S., HAYAKAWA, I. Investigation of desirable hydrostatic pressure required to sterilize *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 spores and its sterilization properties in glucose, sodium chloride and ethanol solutions. *Food Research International*, v. 33, p. 901-905, 2000.
- KALIL, E. M., COSTA, A. J. F. Desinfecção e esterilização. *ACTA ORTOP BRAS - OUT/DEZ*, v. 4, 1994.
- 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, p. 126-131, 2007.
- MATOS, K. H. O. Inativação microbiana em ostras (*Crassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

- PARK, H. S., CHOI, H. J., KIM, K. H. Inactivation of *Alternariabrassicicola* spores by supercritical carbon dioxide with ethanol entrainer. *Journal of Microbiological Methods* v. 88, p. 185–187, 2012.
- PARK, H. S., CHOI, H. J., KIM, M-D., KIM, K. H. Addition of ethanol to supercritical carbon dioxide enhances the inactivation of bacterial spores in the biofilm of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 166, p. 207–212, 2013.
- SETLOW, B., LOSHON, C.A., GENEST, P.C., COWAN, A.E., SETLOW, C., SETLOW, P. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, v.92, p. 362–375, 2002.
- 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, p. 514-518, 2013.