

UTILIZAÇÃO DE ETANOL COMO COADJUVANTE NO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DE OSTRAS ATRAVÉS DA AÇÃO 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

douglas_soares@outlook.com; anapaulazimann@hotmail.com; alcilene.fritz@ufsc.br

RESUMO – O processamento com CO₂ supercrítico pode ser utilizado para a inativação microbiológica em alimentos, contudo o tempo de processo ainda é considerado longo. A utilização de etanol como coadjuvante de processo apresenta-se como alternativa para a redução, devido ao seu conhecido efeito bactericida. O presente estudo avaliou a influência de diferentes concentrações de etanol no processo de inativação de micro-organismos de ostras em meio supercrítico. Foram estudadas condições de tempo de processo de 120 min., temperatura de 33°C, ciclo de pressão de 80 – 200 - 80bar, razão massa/massa ostras/scCO₂ de 1:08 e taxa de pressurização/despressurização de 100 bar.min⁻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 1,30 Log dos 4,09 Logs iniciais.

1. INTRODUÇÃO

As ostras (*Crassostrea gigas*) são moluscos bivalves que se alimentam através da filtração da água em que vivem. Assim as condições do ambiente onde são cultivadas interferem diretamente na sua qualidade, além de fatores como temperatura e salinidade da água de cultivo.

Assim, a utilização de processos não térmicos, como a utilização do dióxido de carbono supercrítico, aparece como opção às tecnologias convencionais, buscando garantir a qualidade microbiológica das ostras, aumentando sua vida útil e preservando as características físicas e sensoriais desejadas.

Bi *et al.* (2011) avaliaram o efeito do tratamento com CO₂ supercrítico na inativação dos micro-organismos naturalmente presentes em cenouras frescas fatiadas, nas condições experimentais de 50 bar, 20°C e tempo de 20 minutos. As reduções foram de 1,86 Log para a contagem de aeróbios e 1,25 Log para a contagem de bolores e leveduras.

Liao *et al.* (2007) estudaram a utilização de CO₂ pressurizado no processo de inativação de *E. coli* inoculada em suco de maçã não clarificado. As condições utilizadas foram 200bar e

37°C e 300bar a 42°C onde verificou-se que o aumento do tempo de processo aumenta a inativação.

Matos e colaboradores (Patente 2013 NBR1020140041729) estudaram a inativação de Aeróbios Mesófilos, *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* presentes em ostras, através do processamento com CO₂ supercrítico, atingindo redução de 95,04% na contagem de *V. parahaemolyticus*.

Furukawa e Hayakawa (2000) estudaram os efeitos do etanol sobre a inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 em um tratamento com calor e pressão moderadamente altos. Setlow *et al.* (2002) relatou que a combinação de etanol e de calor tem leves efeitos de inativação sobre os esporos bacterianos.

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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

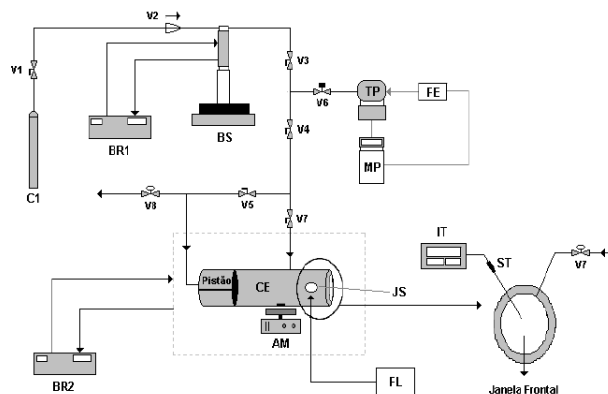
2.1. Preparo das Amostras

As ostras foram adquiridas em uma empresa local e transportadas em sacolas isotérmicas até o Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) – UFSC. Posteriormente, as ostras foram lavadas em água corrente e escovadas para a retirada de sujidades presentes na concha. As mesmas foram abertas com faca específica para retirada da parte cárnea do molusco e do líquido intervalvar, armazenando-os em um béquer previamente higienizado. Para cada experimento foi utilizado uma dúzia de ostras. Após a abertura de todas as ostras, o conteúdo do béquer foi processado em um processador por 3 minutos. Em seguida, utilizando seringas descartáveis foram retiradas alíquotas de 10 mL da amostra 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 da janela de safira, baseado no método estático sintético. O diagrama esquemático do aparato experimental conforme mostra a Figura 1, é formado basicamente pela célula de alta pressão, construída em aço inox 316, com volume máximo 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

Foram injetados 10 gramas da amostra de ostras processadas no interior da célula, com ajuda de uma seringa esteril. Em seguida foi adicionado etanol (etanol absoluto PA.) nas concentrações de 0,1% - 0,25% - 0,5% - 1% (massa/massa). Em seguida, a célula foi conectada na unidade experimental e 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 bar.mim⁻¹.

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

2.4 Análises Microbiológicas Pós-Experimentos

Ao término de cada experimento, em capela de fluxo laminar, retirou-se uma alíquota de 3 mL de amostra da célula e realizou-se a diluição da mesma em água peptonada 0,1%. Em seguida realizou-se plaqueamento em meio Ágar Luria Bertani (Ágar LB, composição: triptona 10,0 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, ágar 20g/L) esteril. 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).

Para a contagem de *Vibrio sp.* e de *Vibrio parahaemolyticus*, imediatamente após o término de cada experimento, também retirou-se uma alíquota de 3 mL de amostra da célula, em capela de fluxo laminar. Realizou-se a diluição em água peptonada salina 3% e plaqueamento em meio seletivo ágar TCBS (ágar tiosulfato-citrato-sais de bile-sacarose) esteril. As placas foram incubadas por 24 horas, à temperatura de 37°C, para contagem de *Vibrio sp.* 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

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, o resultado do planejamento pode ser encontrado na Tabela 1. 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 bar.mim⁻¹.

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

A adição de 0,5% e 1% de etanol massa/massa aos experimentos apresentou a inativação total de *Vibrio sp* e *Vibrio parahaemoliticus*, o resultado do planejamento pode ser encontrado na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios microbiológicos para a contagem de *Vibrio sp.* 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	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 *Vibrio parahaemoliticus* 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	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

Kalil *et al.* (1994) classifica o álcool etílico como bactericida rápido, o qual elimina o bacilo da tuberculose, os fungos e os vírus, não agindo, porém, contra os esporos bacterianos. Sua concentração ótima é entre 60 e 90% por volume. 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.

Park *et al.* (2012) compararam a eficiência da adição de etanol na inativação de esporos de *Alternaria brassicicola* (KACC 40036) pela 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 *et al.* (2013, b) testou a eficácia da adição de etanol ao dióxido de carbono supercrítico na inativação dos esporos de *Bacillus cereus* em biofilmes, cultivados em aço inoxidável. Utilizando pressões entre 10 e 30 MPa, temperatura entre 35 e 60 ° C e tempo entre 10 e 120 min em experimentos sem etanol, não houve sucesso. Quando 10 mL de etanol foram adicionados como um co-solvente com scCO₂, após 90 minutos a 10Mpa o biofilme foi completamente inativado.

Chiang *et al.* (2006) observou que a população viável de *V. parahaemolyticus* aumentou acentuadamente em TSB-NaCl 3,0%, 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 2,0% 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 5,0%, o etanol causou inibição parcial do crescimento e redução da taxa de crescimento do micro-organismo.

4. CONCLUSÃO

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

5. REFERÊNCIAS

- 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 *Alternaria brassicicola* spores by supercritical carbon dioxide with ethanol entrainer. *J. 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.