

## Área: Engenharia de Alimentos

# INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

**Juliana de Mello Silva, Douglas Soares\*, Marcio Antonio Mazutti, José Vladimir de Oliveira**

*Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Regional Integrada do alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim – RS, Brazil*

*\*E-mail: douglastaxa@hotmail.com*

### RESUMO

A utilização de métodos inovadores de estabilização microbiológica em alimentos como alternativa ao método térmico tem se mostrado promissora para a obtenção do melhor compromisso entre segurança e qualidade. O processo a alta pressão consiste em uma tecnologia inovadora de processamento de alimentos com utilização de pressões elevadas, que possui vantagens em relação às tecnologias térmicas convencionais, mantendo as características sensoriais do alimento bem próximas do original e garantindo um alimento seguro do ponto de vista microbiológico, por prolongado período de vida útil. Este trabalho é focado no uso de dióxido de carbono supercrítico para a inativação de *Escherichia coli* patogênica. Foi utilizada a metodologia de planejamento experimental para avaliar os efeitos da pressão (80-280 bar), a taxa de despressurização (10-110 bar.min<sup>-1</sup>) e de ciclos de pressão (1-5 ciclos) na inativação utilizando o método estático sintético. O número de ciclos de pressão e a pressão mostraram influência significativa na inativação de *E. coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico, indicando que o aumento do número de ciclos de pressão e a pressão do sistema melhoram a eficiência da inativação. A inativação microbiana seguiu uma cinética de primeira ordem, onde as taxas aumentaram com o aumento da pressão de 80-160 bar. Os tempos de redução decimal (D) variaram de 1,03 a 5,35 minutos. A dependência da pressão de *Escherichia coli* na taxa de inativação pode ser descrita pelo valor z, o qual 113,64. Os resultados aqui apresentados são úteis no desenvolvimento de um processo de uma esterilização efetiva dos alimentos em escala piloto/industrial.

**Palavras-chave:** inativação, *Escherichia coli*, dióxido de carbono

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as novas tecnologias para preservação de alimentos, encontra-se o processamento por alta pressão (high pressure processing). Esta tecnologia consiste em submeter alimentos a altas pressões, com o objetivo de inibir microrganismos patogênicos e inativar enzimas, enquanto deixa intactas moléculas pequenas, como a maioria das vitaminas e os compostos voláteis, que conferem sabor aos alimentos. Assim, a tecnologia de alta pressão tem a vantagem de causar a degradação mínima do sabor e de nutrientes quando comparada à pasteurização térmica tradicional (GOULD, 2001).

Alta pressão de dióxido de carbono (HPCD) é uma tecnologia de preservação de alimentos não-térmica, que reduz o número de microorganismos presentes em alimentos líquidos por várias ordens de magnitude. No tratamento HPCD, o alimento entra em contato com CO<sub>2</sub> pressurizado por um determinado período de tempo em um lote, em lotes semi-contínua ou aparelhos. O CO<sub>2</sub> pressurizado tem a capacidade de difundir através dos sólidos e dissolver materiais, resultando em uma ação bactericida.

A utilização do CO<sub>2</sub> como agente esterilizante tem vários benefícios potenciais como, uma vez que não é inflamável, não-tóxico, inerte na maioria das situações que ele não reage com polímeros, apresenta temperatura crítica baixa (31,1°C), que é apenas ligeiramente acima da temperatura ambiente, assim, degradações térmicas não são um problema quando um processo é operado em torno da temperatura crítica, o CO<sub>2</sub> supercrítico tem estado de baixa viscosidade e tensão superficial zero, assim podem penetrar rapidamente em estruturas complexas e materiais porosos. Finalmente, o CO<sub>2</sub> é barato e facilmente disponível, o que torna a esterilização com CO<sub>2</sub> economicamente viável (ZHANG et al., 2006).

A presença de *Escherichia coli* em alimentos como carne, peixe e leite é um indicador de contaminação fecal, causando surtos de diarreia, gastroenterite e síndrome urêmica hemolítica (KARAMAN E ERMEN, 2001).

Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho é avaliar os efeitos da pressão (80-280 bar), a taxa de despressurização (10-110 bar.min<sup>-1</sup>) e de ciclos de pressão (1-5 ciclos) na inativação de *Escherichia coli* por dióxido de carbono supercrítico usando o método estático sintético, também foi investigada a influência da pressão sobre a cinética de inativação.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Preparação do inóculo

O microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922 foi obtido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Regional Integrada. O inóculo inicial foi preparado pela transferência da cultura estoque de *E. coli* em um tubo de ensaio com 10 mL com meio líquido Luria Bentami (LB) sob condições assépticas, sendo incubado a 37°C por um período de 24h. Na seqüência, foi realizado um repique em um erlenmeyer com 100 mL de meio LB líquido esterilizado, acrescentando-se 2 mL do inóculo inicial de *E. coli*, e posteriormente, incubando o mesmo a 37°C durante 24h. As culturas utilizadas em todos os experimentos foram armazenadas a 4°C, por um período máximo de 7 dias, garantindo assim que as células bacterianas estivessem vivas. O número final de *E. coli*, em geral, variou em torno de  $10^7$  a  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

#### 2.1.2 Descrição do Aparato Experimental

As medidas experimentais de inativação de microrganismos a altas pressões realizadas neste trabalho foram conduzidas em uma célula de volume variável com visualização, baseado no método estático sintético. A unidade experimental encontra-se a disponível no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI – Campus de Erechim. A Figura 1 apresenta o diagrama esquemático da unidade experimental que foi usado neste estudo.

#### 2.1.3 Determinação dos dados de inativação de microrganismos a altas pressões

O procedimento experimental adotado para inativação de microrganismos a altas pressões, utilizando o aparato experimental descrito no item 2.1.2, iniciou-se com o carregamento do cilindro da bomba com o solvente (dióxido de carbono) proveniente do cilindro de estocagem.

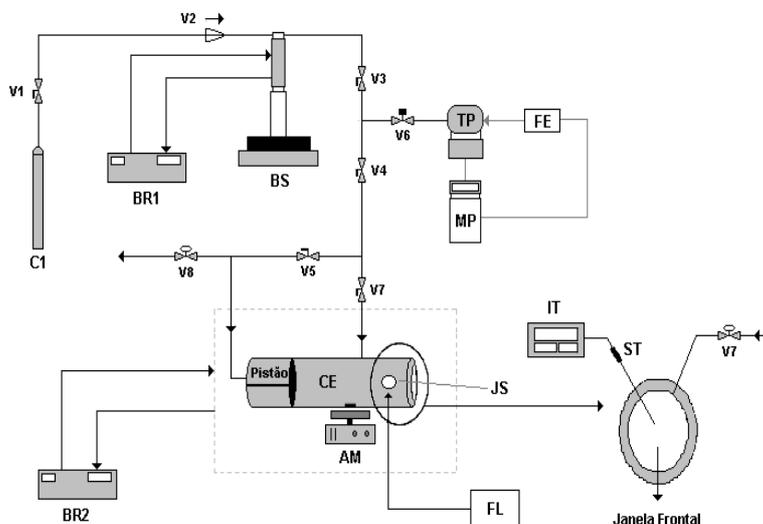


Figura 1 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado, onde C1 corresponde ao reservatório do solvente, BR ao banho de recirculação, BS à bomba de alta pressão, CE à célula de equilíbrio de volume variável, JS à janela de safira, BR2 ao sistema de aquecimento da célula, TP ao transdutor de pressão, MP ao medidor de pressão, AM ao agitador, FL à fonte de luz e ST ao termopar.

Posteriormente, foi ajustada a temperatura do banho de recirculação (BR1), em torno de 5°C, para manter a temperatura no cilindro da bomba constante e a pressão mantida em torno de 100 bar. As válvulas V3 e V4 foram então abertas e a pressão será elevada através da bomba, pressurizando toda a linha. Enquanto o fluxo do solvente estabiliza, foi realizada a montagem da célula de equilíbrio. Para isto, foram obedecidos passos cuidadosos para a montagem e fechamento da mesma.

Na metodologia sintética estática empregada, utilizou-se amostra (5 g) retirada da solução estoque conforme item 2.1.1, com o auxílio de uma seringa estéril de 5 mL dentro de uma câmara de fluxo, e posteriormente injetada na válvula do termopar com a célula fechada.

Após essa etapa, as linhas que contêm as válvulas V5 e V7 foram conectadas na célula e preenchidas com o solvente a baixa pressão e depois evacuadas, para remover o ar remanescente.

A temperatura e pressão do solvente na bomba serão mantidas constantes durante a carga e a massa de solvente adicionada será computada com base em sua densidade. Desta forma, a célula será carregada com composição global conhecida. Uma vez que o sistema

encontra-se estabilizado (fluxo da bomba estável em  $\pm 0,01$  ml/min – em torno de 30 minutos), a válvula V7 será aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, até que o volume da câmara da bomba atinja o valor pré-estabelecido para fornecer a composição desejada dentro da célula. Durante o processo de carga do solvente, nenhuma pressão será aplicada no fundo do pistão, para permitir que o experimento comece com a célula em seu volume máximo. Após a alimentação, a pressão do sistema será então reduzida (definindo-se um valor baixo na bomba de 40 a 50 bar) e, com a válvula V7 fechada, a válvula de esfera V5 será aberta para permitir que o solvente entre em contato com o fundo do pistão. O sistema de aquecimento será então acionado.

O sistema de aquecimento empregado neste trabalho foi constituído de banho de recirculação (BR2). A temperatura da solução no interior da célula será então captada pelo termopar (ST) dentro da célula e monitorada pelo indicador de temperatura (IT). Mantendo-se a temperatura constante, inicia-se a depressurização lenta do sistema através da diminuição gradativa da pressão pela bomba.

Durante todos os experimentos foi mantida uma relação constante entre massa de CO<sub>2</sub> e massa de meio líquido contendo as células de *E. coli*, onde foi empregado 7 g de CO<sub>2</sub> e 5 g de meio líquido. A temperatura foi mantida constante em 36°C.

A pressão do sistema foi aumentada da pressão crítica do CO<sub>2</sub> até a pressão estabelecida no planejamento de experimento à uma taxa de pressurização de 100 bar/min. Neste ponto o sistema foi mantido por um determinado período de tempo, sendo depressurizada até a pressão crítica do CO<sub>2</sub> de acordo com a taxa de depressurização definida no planejamento experimental. Este procedimento foi repetido n vezes, em função do número de ciclos estabelecidos. Após os experimentos, foi realizada a contagem microbiana

#### 2.1.4 Determinação da cinética de inativação do microrganismo *Escherichia coli*

Foram determinadas as reduções de contagens de células viáveis devido à morte por pressurização para o microrganismo alvo, *Escherichia coli*, às pressões de trabalho de 80, 100, 120, 140 e 160 bar, na temperatura fixada em 36 °C para todos experimentos, em diferentes intervalos de tempos, variando de 2,5 a 120 min. As contagens microbianas foram realizadas por plaqueamento em meio estéril LB sólido e o resultado expresso em UFC/mL, sendo realizadas antes e depois do tratamento. Foram preparadas contagens de inóculos da

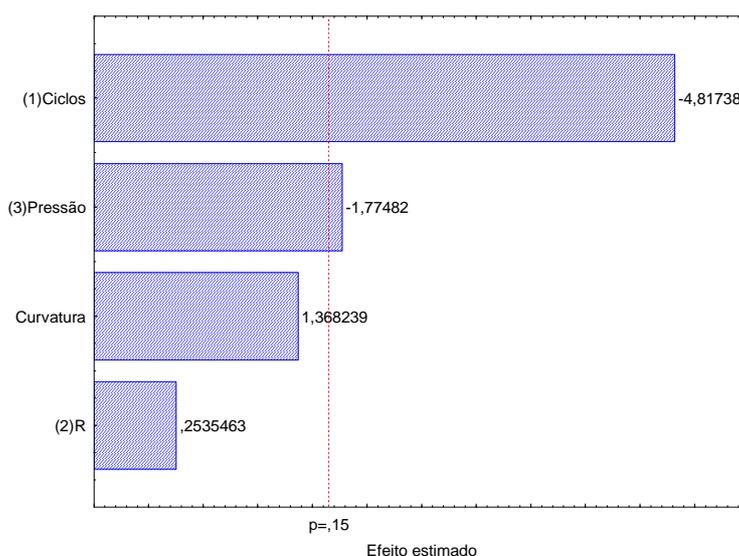
ordem de 108 UFC/mL e foram adicionados na diluição de 1% (v/v). As contagens foram realizadas em triplicata para confirmação das tendências do processo..

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

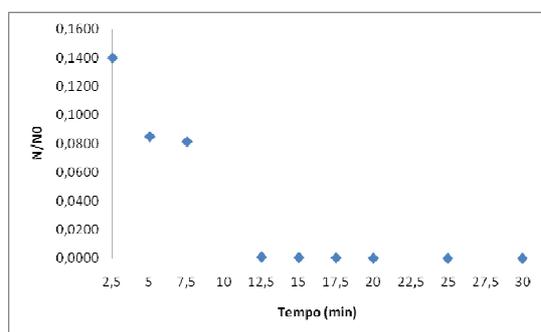
### 2.2.1 Avaliação da inativação de *Escherichia coli* usando CO<sub>2</sub> supercrítico

A primeira etapa do trabalho consistiu no levantamento das variáveis importantes que deveriam ser estudadas durante o processo de inativação, sendo que as escolhidas foram: o número de ciclos de pressurização/despressurização, a taxa de depressurização e a pressão do sistema. Para avaliar o efeito destas variáveis sobre a contagem final de *Escherichia coli* foi realizado um primeiro delineamento completo central (DCC). Entre as três variáveis independentes, o número de ciclos e a taxa de depressurização (R) foram as que apresentaram efeito significativo sobre a inativação microbiana. A pressão não exerceu influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada.

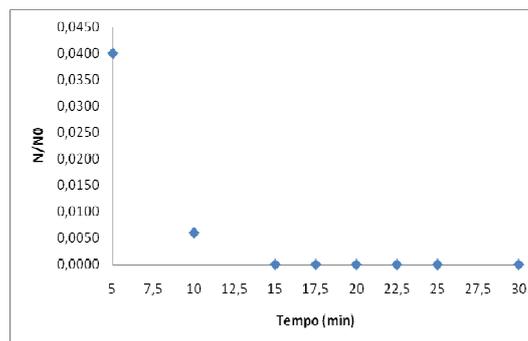
No segundo DCC, a pressão e o número de ciclos apresentaram efeito significativo sobre a inativação microbiana. A taxa de depressurização (R) e a curvatura não exerceram influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada.



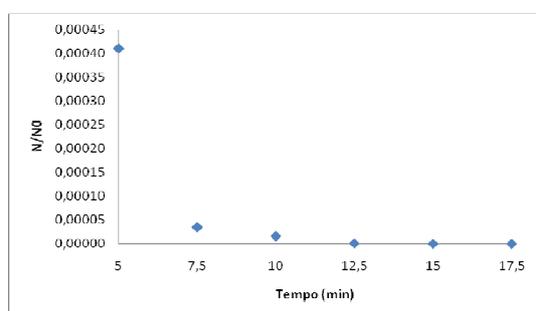
**Figura 2** - Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis independentes do segundo DCC na inativação de *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico.



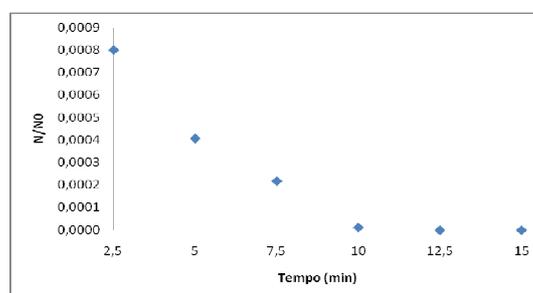
a)



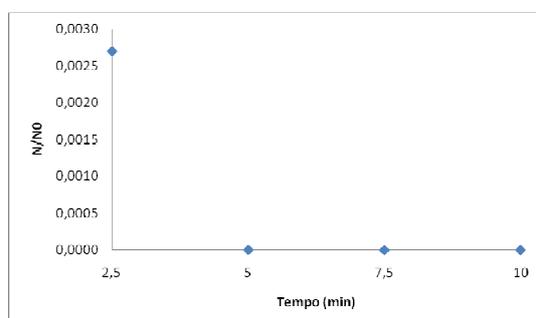
b)



c)



d)



e)

**Figura 3 (a – e)** - Avaliação cinética da inativação de *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico: a) 80 bar, b) 100 bar, c) 120 bar, d) 140 bar, e) 160 bar. A contagem normalizada no tempo zero (N/N<sub>0</sub>) foi omitida das figuras para facilitar a visualização dos resultados.

### 2.2.2 Avaliação cinética da inativação da *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico

Para avaliar o efeito da pressão na inativação da *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico foram realizados experimentos nas pressões de 80, 100, 120, 140 e 160 bar, sendo observada a cinética de inativação. De uma maneira geral, ocorreu uma redução acentuada da contagem

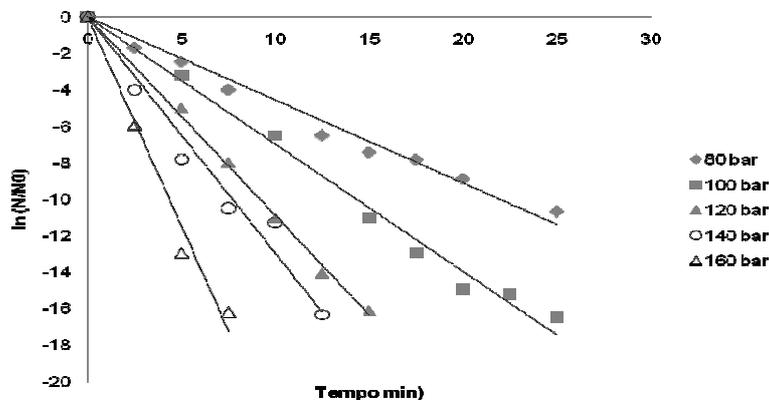
microbiana nos primeiros 2,5 minutos de processo, indicando que a bactéria é susceptível a inativação com CO<sub>2</sub> supercrítico

Para avaliar o efeito da pressão sobre a inativação da *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico, foi considerada que a inativação segue uma cinética de primeira ordem. Assim, se N é o número de microrganismos, sua variação com o tempo é expressa pelas eq (1) e (2), onde N e N<sub>0</sub> são o número de microrganismos presentes nos tempos t e t=0, respectivamente, e k é a constante de inativação.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad (1)$$

$$\frac{N}{N_0} = \exp(-k \cdot t) \quad (2)$$

Assim, traçando-se um gráfico de ln(N/N<sub>0</sub>) versus o tempo, obtém-se uma reta, cujo coeficiente angular corresponde a constante de inativação, como podemos observar na figura 4.



**Figura 4** – Determinação da constante de inativação de *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico

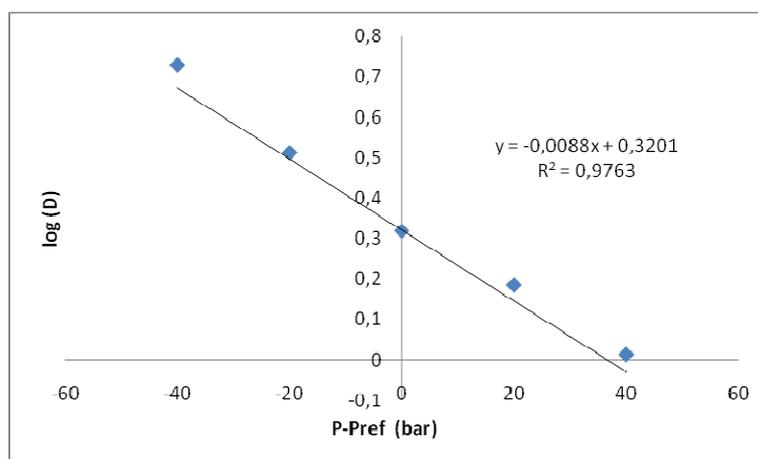
Nos cálculos envolvendo o tratamento térmico e/ou tratamento com fluídos pressurizados de alimentos é empregado o conceito de tempo de redução decimal (D) que pode ser definido como o tempo requerido para reduzir 90% o número de microrganismos inicial.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos com relação à constante de inativação e ao tempo de redução decimal.

**Tabela 1** - Efeito da pressão do sistema na constante de inativação e no tempo de redução decimal obtidos na inativação de *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Pressão (bar)	k (min <sup>-1</sup> )	D (min)
80	0,4301	5,3536
100	0,7077	3,2536
120	1,1041	2,0855
140	1,1909	1,9335
160	2,2287	1,0331

Outro parâmetro empregado com frequência em inativação de microrganismos é o parâmetro z; onde P e Pref são a pressão do sistema e a pressão de referência (bar), respectivamente, D e Dref são o tempo de redução decimal nas pressões P e Pref, respectivamente. Dessa forma, o parâmetro z foi determinado por linearização, conforme ilustrado na Figura 5. O valor de z obtido neste trabalho foi de 113,64, o que indica que para ocorrer a redução de 90% no tempo de redução decimal é preciso promover um acréscimo de 113,64 bar na pressão do sistema.



**Figura 5** - Determinação da constante z para a inativação de *Escherichia coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico.

### 3 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a inativação de *E. coli* utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico. A metodologia de planejamento experimental foi usada como ferramenta para determinar os efeitos de ciclos de pressão, taxa de despressurização e pressão sobre a inativação do microrganismo. O número de ciclos de pressão e a pressão mostraram uma influência significativa na inativação de *E. coli* com CO<sub>2</sub> supercrítico, indicando que o aumento do número de ciclos de pressão e a pressão do sistema melhoram a eficiência da inativação. A inativação microbiana seguiu cinética de primeira ordem de reação, onde as taxas aumentaram com o aumento da pressão de 80-160 bar. Os tempos de redução decimal (D) variou de 1,03 a 5,35 minutos. A dependência da taxa de inativação de *E. coli* com a pressão pode ser descrita pelo valor *z*, o qual foi encontrado como sendo 113,64;

Os resultados aqui apresentados são úteis visando a esterilização eficaz e não-térmica de alimentos em escala industrial/piloto.

### REFERÊNCIAS

- GOULD, G W. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*. v 33, p 51-64, 1996.
- JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*, 6 Ed. Porto Alegre: E. Artmed, 2005.
- KARAMAN, H.; ERKMEN O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. *Food Microbiology*, v 18, p 11-16, 2001.
- KIM, S. R.; RHEE, M. S.; KIM, B. C.; KIM, K. H. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and generic *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, v 118, p 52-61, 2007.
- YORDANOV, D. G.; ANGELOVA G.V. High Pressure Processing For Foods Preserving. *Biotechnol. & Biotechnol*, v 24, n 3 p 1940 - 1945, 2010.
- ZHANG, J.; DAVIS, T.A.; MATTHEWS, M.A.; DREWS, M.J.; LABERGE, M.; AN, Y.H. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*. v.38, p.354-372, 2006.