



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

**APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> PARA AUMENTO DA VIDA ÚTIL DE  
MEXILHÃO *Perna perna* (L) e *Mytilus edulis*: PROCESSO DE  
PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO SOB  
ATMOSFERA MODIFICADA ATIVA**

**MARIELI DE LIMA**

*Engenheira de Alimentos  
M.Sc. Engenharia de Alimentos*

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Alcilene Rodrigues Monteiro  
Co-orientador: Dr. Lindomar Alberto Lerin**

**Florianópolis, Março de 2014.**



**MARIELI DE LIMA**

**APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> PARA AUMENTO DA VIDA ÚTIL DE  
MEXILHÃO *Perna perna* (L) e *Mytillus edulis*: PROCESSO DE  
PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO SOB  
ATMOSFERA MODIFICADA ATIVA**

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  
Co-orientador: Dr. Lindomar Alberto Lerin

**Florianópolis  
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Lima, Marieli  
APLICAÇÃO DO CO2 PARA AUMENTO DA VIDA ÚTIL DE MEXILHÃO  
Perna perna (L) e Mytilus edulis: PROCESSO DE PRÉ-  
SOLUBILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO SOB ATMOSFERA MODIFICADA  
ATIVA / Marieli de Lima ; orientadora, Alcilene Rodrigues  
Monteiro ; coorientador, Lindomar Alberto Lerin. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
277 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Processamento de  
mexilhão. 3. Atmosfera modificada ativa. 4. Pré-  
solubilização de CO2 (SGS). 5. Alta pressão hidrostática  
(APH). I. Rodrigues Monteiro , Alcilene. II. Lerin,  
Lindomar Alberto. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. IV. Título.

**Folha de assinaturas.**



***“Forçosamente vence sempre o entusiasta ao apático. Não é a força braçal, nem a virtude das armas, e sim a força da alma que alcança a vitória.”***

***(J. G. Fichte)***





## AGRADECIMENTOS

E se passaram quatro anos até aqui...de uma caminhada em busca não somente de um título profissional, mas sobretudo de novas descobertas dentro da pesquisa desenvolvida, de amor à ciência, amor ao desconhecido, amor pelos acertos e pelos erros...e nada teria valido a pena sem a colaboração técnica, científica, moral, demonstrações de carinho, amizade e amor das pessoas que estiveram comigo durante esse período da minha vida...Por isso, humildemente deixo os mais profundos agradecimentos!!

À Deus, por ser minha fortaleza nos momentos de fraqueza, a minha esperança nos momentos difíceis e a minha certeza de dias melhores. Por tudo.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do doutorado nessa instituição.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante todo o doutorado e também pela bolsa dentro do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE para a realização do estágio doutoral.

A *Norwegian Institute of Food, Fishery and Aquaculture* (NOFIMA), da cidade de Stavanger, Noruega, que me oportunizou realizar o estágio doutoral durante o período de 6 meses.

À Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alcilene Rodrigues Monteiro, pela orientação e pela confiança depositada em mim para a realização desta tese.

Ao Dr. Lindomar Alberto Lerin, pela co-orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança no nosso grupo de pesquisa, pelas gargalhadas e palavras de incentivo, e especialmente, pelo grande amigo que ganhei.

Aos pesquisadores Dr. Morten Sivertsvik e Dr. Bjørn Tore Rotabakk, do Instituto Nofima, que se propuseram a me orientar durante o estágio doutoral e me auxiliaram com relação à minha ida à Noruega, adaptação e principalmente na condução da parte experimental.

À empresa Cavallo Marinho S.A, fornecedora dos mexilhões para os experimentos do Capítulo 2 desta tese.

Às bolsistas do projeto FINEP/SEBRAE Carolina Siga e Franciele Leitempergher, e também à bolsista de Iniciação Científica Maria Carolina Mello, pelo auxílio com os experimentos referentes ao Capítulo 2 da tese.

Ao Prof. Dr. J. Vladimir de Oliveira, pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas no estudo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> no aparato

experimental, no Capítulo 3 da tese.

À toda a equipe técnica do Instituto Nofima pelo auxílio na execução dos experimentos, sanar dúvidas e interpretar os resultados experimentais.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa Lenilton Soares e Juliano Tosati, pela amizade e por todas as contribuições dadas até aqui, incluindo a modelagem matemática e pelos momentos de trocas de ideias e discussão do trabalho, e às bolsistas de Iniciação Científica Natália Buratto e Gabriela Zanghelini por toda a dedicação durante os experimentos.

Aos meus pais, Sérgio e Maria Ignez, pelo amor incondicional, pelo carinho, por estarem presentes mesmo na distância, e, sobretudo, pelos grandes incentivadores que são, e por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã Bárbara, que mesmo à distância, esteve sempre presente, com palavras de incentivo e carinho.

À minha tia Zaira, pelo grande carinho e pela torcida em todos os momentos.

Ao meu namorado, por todo o apoio e paciência nos momentos difíceis.

Aos demais membros da minha família pelo incentivo.

Aos meus amigos que conviveram comigo nesse período, Larissa Kochenborger, Marcelo Lino Kuhn, Brunno Rocha Levonne e toda a “trupe do vôlei” pela companhia, pelo apoio e pelos bons momentos vividos. Aos amigos que fiz na Noruega, Manuel e Natasha (meus segundos pais noruegueses), Natália, Leena, Lene, Laila, Karin e Baris.

A todos os membros do Laboratório PROFI, pela parceria, pela boa convivência em laboratório e pelas contribuições.

Aos amigos da pós-graduação, em especial Katia Rezzadori e Marta Zotarelli.

Aos membros da banca examinadora, Professores Carlos Prentice, Cleide Werneck, J. Vladimir de Oliveira, João B. Laurindo e Katherine H. O. Matos por sua colaboração na avaliação do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Marieli de Lima*

## RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi a utilização de diferentes técnicas para aumentar a vida útil do mexilhão cozido e resfriado, envolvendo a aplicação do CO<sub>2</sub>. Na primeira etapa, foi proposto um processo alternativo para os mexilhões, utilizando um sistema integrado de cozimento e resfriamento à vácuo, comparado ao método de cozimento e resfriamento tradicional, submerso em água, seguido do acondicionamento sob atmosfera modificada contendo 50% de CO<sub>2</sub> e 50% de N<sub>2</sub>. A vida útil do produto foi avaliada através das propriedades físico-químicas e da embalagem, além da contagem microbiológica durante 25 dias a 3 °C. As amostras acondicionadas sob atmosfera modificada e submetidas ao processo alternativo de cozimento apresentaram propriedades físico-químicas inalteradas e contagem microbiana dentro dos padrões permitidos pela legislação para moluscos. A combinação dos dois processos mostrou-se efetivo contra exsudação da água do produto para a embalagem durante o período analisado. Na segunda etapa do trabalho, utilizou-se um aparato experimental para determinação da solubilidade do CO<sub>2</sub> em mexilhão. Um planejamento experimental 2<sup>3</sup> com três pontos centrais foi montado para avaliar a influência da pressão, da temperatura e da relação gás/produto no processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub>. A solubilidade do CO<sub>2</sub> na fase aquosa do produto foi obtida pela equação do gás ideal e por Equações de Estado. Foi observado maior influência da pressão e da relação gás/produto no processo de solubilização do CO<sub>2</sub> no produto. O modelo matemático baseado na não idealidade mostrou bom ajuste aos dados experimentais. Os mexilhões apresentaram alta porosidade devido às redes de capilares presentes em sua estrutura, que foram capazes de reter a água no interior da carne. Na terceira etapa, foi estudado o efeito da pré-solubilização do CO<sub>2</sub> (*soluble gas solubilization* – SGS) como pré-tratamento seguido do acondicionamento em atmosfera modificada (SGS+AM), em atmosfera modificada (AM) e em ar (AR) na vida útil de mexilhões cozidos armazenados a 3°C por 25 dias. Houve decréscimo do pH para todas as amostras (SGS + AM, AR e AM) enquanto o conteúdo de água (%), CRA e firmeza (N.g<sup>-1</sup>) não mudaram significativamente com o tempo de armazenamento e com os tratamentos de envase. A presença do CO<sub>2</sub> promoveu redução do pH e do conteúdo de água, aumento na firmeza, enquanto a CRA não foi influenciada. Nas embalagens com AM, o CO<sub>2</sub> reduziu até o equilíbrio (51,6 – 33,7 %), e mostraram colapso no

filme de recobrimento na parte superior das bandejas, enquanto que as embalagens com SGS permaneceram constantes (72,5 %), provavelmente devido ao aumento da quantidade de CO<sub>2</sub> na embalagem oriundo do CO<sub>2</sub> dissolvido durante o tratamento SGS no produto. SGS + AM reduziram a contagem total de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, comparados aos tratamentos com ar e AM. A aplicação do SGS resultou em um efeito bacteriostático no produto aumentando a vida útil (19 dias) comparado com o envase com ar (5 dias) e AM (11 dias). Na quarta etapa, foram avaliados os efeitos do tratamento SGS seguidos pela alta pressão hidrostática (APH) na qualidade e na vida útil dos mexilhões cozidos, comparando com o produto envasado com vácuo (VAC) e o processo APH, armazenado a 3 °C durante 23 dias. O processo a APH promoveu aumento no pH dos mexilhões, enquanto que o tratamento SGS + APH reduziram o pH, devido ao efeito do CO<sub>2</sub>. A CRA e a firmeza não foram influenciadas pelos tratamentos aplicados. As amostras tratadas por APH e SGS + APH tiveram maior exsudação do que os mexilhões embalados a vácuo. As contagens totais de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos permaneceram baixas para o tratamento SGS + APH (< 1 log UFC/g), enquanto APH alcançaram 3 log UFC/g em 20 dias e VAC alcançou 6 log UFC/g em 13 dias. Apenas SGS + APH foi capaz de prolongar a aparência e odor do produto como aceitável através do armazenamento (23 dias) em relação ao tratamento APH (13 dias) e vácuo (VAC) 7 dias. Todas as propostas de processos aplicados aos mexilhões cozidos foram capazes de aumentar a vida útil desses produtos.

**Palavras-chave:** mexilhão, resfriamento a vácuo, pré-solubilização de CO<sub>2</sub> (SGS), alta pressão hidrostática (APH), vida útil.

## ABSTRACT

The main objective of this work was the use of different techniques to increase the shelf life of cooked and cooled mussels involving the application of CO<sub>2</sub>. In the first step a study of the mussels' cooking alternative process using an integrated cooking and vacuum cooling and compared to the traditional method of cooking and cooling submerged in water was carried out, followed by packaging under modified atmosphere containing 50 % CO<sub>2</sub> and 50 % N<sub>2</sub>. The shelf-life of the product was assessed by physicochemical and packaging and microbiological count for 25 days at 3 °C. The samples packed under modified atmosphere and subjected to alternative cooking process showed unchanged physicochemical properties and microbial count within the standards allowed by law for mollusks. The combination of the two processes was effective against exudation of water from the product to the packaging during the analysis period. In the second stage, was used an experimental apparatus to determine the solubility of CO<sub>2</sub> in mussels. A 2<sup>3</sup> experimental design with three central points was performed to evaluate the influence of pressure, temperature and gas/product ratio in the CO<sub>2</sub> solubilization process. The solubility of CO<sub>2</sub> in the aqueous phase of the product was obtained by the ideal gas equation, and equation of state. At this stage the greatest influence on the pressure and gas/product ratio was observed in the solubility of CO<sub>2</sub> in the product process. The mathematical model based on non-ideality was fitted to experimental data. The mussels had a high porosity due to capillary networks present in its structure have been able to retain water within the meat. In the third step, was studied the solubilizing effect of CO<sub>2</sub> (soluble gas solubilization – SGS) as pre-treatment followed by packaging under modified atmosphere (SGS + MA), in modified atmosphere packaging only (MA) in the shelf life of cooked mussels stored at 3 °C for 25 days. There was a decrease in pH for all samples (SGS + MA, AIR and MA), while water content (%), WHC and firmness (g<sup>-1</sup>) did not change significantly with storage time and with packaging treatments. CO<sub>2</sub> presence promoted reduction in pH and water content, increased firmness, while the WHC was not influenced notably. In MA packaging CO<sub>2</sub> reduced until equilibrium (51.6 to 33.7 %) and showed higher cover deflation in the film, whereas the packaging SGS remained constant (72.5 %), probably by increasing the amount of CO<sub>2</sub> in the package due to the dissolved CO<sub>2</sub>

during SGS treatment. SGS + MA reduced the total count of mesophilic and psychrotrophic microorganisms, compared to treatments with air and MA. The application of SGS resulted in a bacteriostatic effect on increasing product shelf life (19 days) compared with the packaging with air (5 days) and MA (11 days). In the fourth step, the effects of treatment SGS followed by high hydrostatic pressure (HHP) on quality and shelf life of cooked mussels were evaluated by comparing with product packaged in vacuum (VAC), and the HHP process, stored at 3 °C for 23 days. The HHP process promoted an increase in pH of mussels, whereas treatment SGS + HHP reduced pH due to the CO<sub>2</sub> effect. WHC and firmness were not affected by the treatments applied. In the HHP treated samples and SGS + HHP, exudation had greater than the vacuum packed mussels. The total counts of mesophilic and psychrotrophic microorganisms remained low for the treatment SGS + HHP (< 1 log cfu/g) whereas HHP achieved 3 log CFU/g in 20 days and VAC reached 6 log CFU/g in 13 days. Only SGS + HHP treatments were able to prolong the appearance and odor of the product as acceptable by storage (23 days) compared to the HHP treatment (13 days) and vacuum (VAC) 7 days. All proposed procedures applied to cooked mussels were able to increase the shelf-life of these products.

**Keywords:** mussel, CO<sub>2</sub> pre-solubilization (SGS), hydrostatic high pressure (HHP), shelf-life.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Espécies de mexilhão com grande valor comercial (a) <i>Perna perna</i> e (b) <i>Mytilus edulis</i> . ....	10
Figura 1.2 - Anatomia externa e interna do mexilhão <i>Perna perna</i> . ....	12
Figura 1.3 - Anatomia do mexilhão <i>Mytilus edulis</i> . ....	13
Figura 1.4 - Mexilhão <i>Perna perna</i> macho (branco-leitoso) e mexilhão fêmea (vermelho-alaranjado). ....	14
Figura 1.5 - Mexilhão <i>Mytilus edulis</i> fêmea (vermelho-alaranjado) e mexilhão macho (branco-leitoso). ....	14
Figura 1.6 - Produção global de <i>Mytilus edulis</i> nos últimos 60 anos. ...	18
Figura 1.7 - Processamento genérico de mexilhões. ....	21
Figura 1.8 - Fenômenos de transferência de massa e as características dos seus coeficientes. ....	37
Figura 1.9 - Sistemas de envase para alimentos e comportamento relativo de substâncias ativas. ....	38
Figura 1.10 - Ilustração do tratamento SGS seguido de embalagem em atmosfera modificada. ....	56
Figura 1.11 - Processo de aquecimento adiabático do produto durante o processo de alta pressão hidrostática em alimentos. ....	60
Figura 1.12 - Distribuição dos equipamentos de alta pressão envolvidos com cada classe de alimentos processados. ....	62
Figura 2.1 - Fluxograma do procedimento adotado para processamento convencional de mexilhão <i>Perna perna</i> . ....	94
Figura 2.2 - Esquema do dispositivo experimental utilizado nos experimentos de cozimento e resfriamento a vácuo de mexilhões. ....	95
Figura 2.3 - Fluxograma do procedimento adotado para processamento alternativo de mexilhão <i>Perna perna</i> . ....	96
Figura 2.4 - Probe de imersão em aço inox utilizada para o teste de grau de enchimento das embalagens. ....	101

Figura 2.5 - Presença de exsudado e vapor de água na embalagem de mexilhão proveniente do processamento convencional durante o armazenamento a 3 °C durante 25 dias.....	110
Figura 2.6 - Análise visual das embalagens com mexilhão processado durante o armazenamento durante 25 dias.....	111
Figura 2.7 - Ausência de exsudado e de vapor de água na embalagem de mexilhão proveniente do processamento alternativo durante o armazenamento a 3 °C durante 25 dias.....	112
Figura 2.8 - Evolução da relação gás/produto das embalagens com mexilhão processado durante o armazenamento.....	119
Figura 2.9 - Taxa de absorção de CO <sub>2</sub> nos mexilhões durante 25 dias.....	121
Figura 2.10 Concentração de CO <sub>2</sub> dissolvido em mexilhões cozidos, a 3 °C durante 25 dias.....	122
Figura 3.1 - Aparato experimental adaptado para o tratamento SGS..	142
Figura 3.2 - Conjunto de equipamentos para a execução dos tratamentos de pré-solubilização.....	144
Figura 3.3 - Fluxograma para determinação da constante de Henry e da concentração de CO <sub>2</sub> para as condições experimentais testadas.....	149
Figura 3.4 - Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV) para o mexilhão macho (a) e mexilhão fêmea (b), com aumento de 50 x. ....	152
Figura 3.5 - Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV) para o mexilhão macho (a) e mexilhão fêmea (b), com aumento de 500 x. ..	153
Figura 3.6 - Constante de Henry do CO <sub>2</sub> em água destilada calculada a partir da equação de Peng-Robinson. T = 3°C, G/P = 3, a diferentes pressões.....	155
Figura 3.7 - Cinética de absorção do CO <sub>2</sub> em água (expressa em fração molar – X <sub>2</sub> ) conforme a variação de pressão do sistema para água pura, P=200 kPa, T = 3 °C, g/p= 2:1.....	157
Figura 3.8 Curva de contorno para a concentração de CO <sub>2</sub> dissolvido em mexilhões em função da pressão e relação gás/produto.....	160



Figura 3.9 Curva de contorno para a concentração de CO <sub>2</sub> dissolvido em função da pressão e temperatura. ....	161
Figura 3.10 Curva de contorno para a concentração de CO <sub>2</sub> dissolvido em função da relação gás/produto e temperatura. ....	161
Figura 3.11 Evolução da concentração de CO <sub>2</sub> dissolvido durante 24 h. ....	162
Figura 3.12 Evolução da taxa de absorção de CO <sub>2</sub> nos mexilhões dentro de 24 h. ....	163
Figura 4.1 - Fluxograma do procedimento adotado para o processamento e tratamentos de envase sob ar, atmosfera modificada e SGS combinado com atmosfera modificada para o mexilhão azul. ....	177
Figura 4.2 - Perfil de temperatura dos mexilhões durante o processo de cozimento. ....	185
Figura 4.3 - CO <sub>2</sub> no <i>headspace</i> das embalagens submetidas aos tratamentos com envase em AR, SGS + AM e AM durante o período de armazenamento. ....	188
Figura 4.4 - O <sub>2</sub> no <i>headspace</i> das embalagens submetidas aos tratamentos com envase em AR, SGS + AM e AM durante o período de armazenamento. ....	188
Figura 4.5 - Grau de enchimento (tempo inicial e final) entre as embalagens com AM (deflação tampa em (b) e inchaço em (d)) e do processo de SGS + AM (sem colapso durante o armazenamento (a) e (c). ....	190
Figura 4.6 - Contagem microbiológica para mesófilos em mexilhões cozidos. ....	194
Figura 4.7 - Contagem microbiológica para psicrotróficos em mexilhões cozidos. ....	194
Figura 5.1 - Fluxograma do procedimento adotado para o processamento e envase dos mexilhões. ....	213
Figura 5.2 - Equipamento utilizado para o processo a alta pressão hidrostática. ....	214
Figura 5.3 - Ação da APH na abertura de mexilhões crus e aparência visual do produto após o processo. ....	218

Figura 5.4 - Aspecto visual das embalagens com o mexilhão cozido após a APH.....	218
Figura 5.5 - Contagem de micro-organismos mesófilos nos mexilhões cozidos durante o armazenamento. ....	225
Figura 5.6 - Contagem de micro-organismos psicrotróficos nos mexilhões cozidos durante o armazenamento. ....	226

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Espécies de mexilhão mais comuns no Brasil.....	9
Tabela 1.2 - Composição centesimal da carne de mexilhão <i>Perna perna</i> cozido e resfriado. ....	24
Tabela 1.3 Padrões microbiológicos para moluscos, de acordo com a RDC n°12, de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). ....	31
Tabela 1.4 Constantes de Henry do CO <sub>2</sub> para alimentos que não respiram. ....	45
Tabela 1.5 - Vantagens particulares do processamento a alta pressão. .	59
Tabela 2.1 - Média do pH e da textura no processamento tradicional e alternativo de mexilhões durante os 25 dias de armazenamento a 3 °C. ....	105
Tabela 2.2 - Umidade e capacidade de retenção de água (CRA) no processamento tradicional e alternativo de mexilhões durante os 25 dias de armazenamento.....	109
Tabela 2.3 - Perda de água por exsudação em mexilhões <i>Perna perna</i> no processamento tradicional e no alternativo. ....	112
Tabela 2.4 - Mudança global da cor ( $\Delta E$ ) e parâmetro C* para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo.....	115
Tabela 2.5 - Ângulo <i>hue</i> (h) para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo. ....	116
Tabela 2.6 - Composição gasosa no <i>headspace</i> da embalagem contendo mexilhões processados até 24 horas para amostras condicionadas a 3 °C contendo 50% de CO <sub>2</sub> . ....	118
Tabela 2.7 - Composição gasosa (CO <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> ) medidas no <i>headspace</i> das embalagens de mexilhão acondicionado sob atmosfera modificada durante 25 dias de armazenamento a 3 °C.....	119
Tabela 2.8 – Contagem de aeróbios mesófilos e presença de <i>Vibrio</i> sp de mexilhões durante o processamento utilizando o método convencional e o método alternativo.....	124

Tabela 2.9 – Contagem de micro-organismos psicrófilos em mexilhões durante o processamento utilizando o método convencional e o método alternativo acondicionado com atmosfera modificada.....	127
Tabela 3.1 - Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento experimental 2 <sup>3</sup> para o estudo da solubilidade do CO <sub>2</sub> no conteúdo aquoso em mexilhão <i>Perna perna</i> .....	150
Tabela 3.2 - Dados de massa específica real e aparente para o mexilhão <i>Perna perna</i> cozido e processado pelo método convencional e alternativo. ....	152
Tabela 3.3 - Valores de médias e desvios padrão obtidos no teste de vedação do sistema em um período de 24h.....	154
Tabela 3.4 - Constantes de Henry para água obtida através dos dados experimentais e dos cálculos baseados na solubilidade para a validação do aparato experimental com água destilada. ....	156
Tabela 3.5 - CO <sub>2</sub> dissolvido obtido de acordo com a matriz experimental, com os valores codificados e reais de acordo com o planejamento experimental 2 <sup>3</sup> com 3 pontos centrais.....	158
Tabela 3.6 - ANOVA para validação do modelo matemático empírico que descreve a concentração de CO <sub>2</sub> no equilíbrio.....	158
Tabela 3.7 - Taxas de absorção do CO <sub>2</sub> durante as primeiras 24 h de processo. ....	164
Tabela 3.8 – Solubilidade do CO <sub>2</sub> no mexilhão <i>Perna perna</i> em diferentes pressões, relações gás/produto e temperaturas.....	165
Tabela 4.1 - Resistência térmica para os micro-organismos usados neste estudo, onde D representa o tempo de redução decimal, o Z é a mudança de temperatura requerida para aumentar a taxa microbiana em 10 vezes, de acordo com o obtido através da literatura. ....	179
Tabela 4.2 - Perfil de temperatura dos mexilhões durante o processo de cozimento.....	186
Tabela 4.3 - Efeito <sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e tratamentos de envase nas propriedades físico-químicas <sup>2</sup> (pH, conteúdo de água (%), Capacidade de Retenção de Água (CRA - %), e firmeza (N.g <sup>-1</sup> )......	192

Tabela 4.4 - Efeito <sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e tratamentos de envase nas contagens microbiológicas <sup>2</sup> (micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em mexilhões cozidos ( <i>Mytilus edulis</i> )). .....	196
Tabela 5.1 - Efeito <sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e tratamentos de envase nas propriedades físico-químicas <sup>2</sup> (pH, conteúdo de água (%), Capacidade de Retenção de Água (CRA - %), exsudação (%) e firmeza (N.g <sup>-1</sup> )). .....	221
Tabela 5.2 - Efeito <sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e dos tratamentos de envase nas contagens microbiológicas <sup>2</sup> (micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em mexilhões ( <i>Mytilus edulis</i> ) cozidos. ....	226
Tabela 5.3 - Observações nos mexilhões durante a abertura das embalagens nas análises de armazenamento. ....	228



## NOMENCLATURA

a	Volume molecular
AM	Atmosfera modificada
AR	Ar atmosférico
APH	Alta pressão hidrostática
b	Interações moleculares
B	Coefficiente de virial
Aw	Atividade de água
am	Atmosfera modificada
aq	Estado aquoso da espécie química
CRA	Capacidade de Retenção de Água
C	Concentração de CO <sub>2</sub> no produto (ppm)
C*	Parâmetro Chroma de cor
$C_{CO_2}^{t=\infty}$	Concentração de CO <sub>2</sub> no equilíbrio (ppm)
$C_{CO_2}^{pred}$	Concentração predita de CO <sub>2</sub> no equilíbrio
(ppm)	
$C_{CO_2}^{superfície}$	Concentração de CO <sub>2</sub> no equilíbrio na
superfície (ppm)	
$C_{CO_2}^i$	Concentração de CO <sub>2</sub> inicial ppm/ e ou fração
molar)	
$F_B$	Força de flutuação (N)
$F_c$	Força obtida experimentalmente (N)
$F_{grav}$	Força da gravidade (m.s <sup>-2</sup> )
$F_R$	Força resultante (N)
$F_S$	Força obtida na calibração (N)
GE	Grau de enchimento da embalagem (%)
g	Gás, aceleração da gravidade (m.s <sup>-2</sup> )
g/p	Razão volumétrica gás/produto (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )
H, H <sub>1</sub>	Constante de Henry (Pa ppm <sup>-1</sup> ) do CO <sub>2</sub>
dissolvido no produto	
$H_{CO_2,p}$	Constante de Henry do soluto i no solvente j (Pa
ppm <sup>-1</sup> )	
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )
$M_{CO_2}$	Massa molecular de CO <sub>2</sub> (g mol <sup>-1</sup> )
$m_a$	Massa do alimento (kg)
$m_p$	Massa do produto (kg)

$M_W$	Massa de água (g, kg)
$M_T$	Massa total do produto (g, kg)
$n$	Número de mols
$n_{CO_2}$	Número de mols de CO <sub>2</sub> na fase gasosa
$n_{CO_2}^L$	Número de mols de CO <sub>2</sub> dissolvida na parte líquida e aquosa do alimento
$n_{CO_2}^i$	Número de mols de CO <sub>2</sub> no início do processo
$n_{CO_2}^f$	Número de mols de CO <sub>2</sub> no final do processo
$n_{ar}$	Número de mols de ar
$p$	Pressão parcial (Pa, kPa, atm, bar)
$P_1^\circ$	Pressão de vapor do solvente puro
$p_{CO_2}$	Pressão externa parcial de CO <sub>2</sub>
$P_c$	Pressão crítica do CO <sub>2</sub>
$P_{CO_2}^{t=0}$	Pressão parcial de CO <sub>2</sub> inicial (Pa, kPa, atm, bar)
$P_{CO_2}^{t=\infty}$	Pressão parcial de CO <sub>2</sub> no equilíbrio (Pa, kPa, atm, bar)
$P_r$	Pressão reduzida (Pa, kPa, atm)
$P_t$	Pressão total (Pa, kPa, atm)
$P_{corrigida}$	Pressão corrigida (Pa, kPa, atm)
$P_{medida}$	Pressão medida (Pa, kPa, atm)
PPM	Partes por milhão (mg CO <sub>2</sub> /kg de produto)
$\widehat{\varphi}_1$	Coefficiente de fugacidade para o componente $i$
$\varphi^V$	Coefficiente de fugacidade na fase vapor para o componente $i$
$R$	Constante universal dos gases (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$r$	Raio (cm, m)
$r_0$	Raio inicial (cm, m)
$R_{CO_2,abs}$	Taxa de absorção de CO <sub>2</sub> (PPM h <sup>-1</sup> )
rpm	Rotações por minuto
S	Solubilidade (ppm)
SGS	<i>Soluble Gas Stabilization</i>
sv	Solvente e soluto
$T$	Temperatura (°C, K)
$T_c$	Temperatura crítica (°C, K)
$T_g$	Temperatura da fase gasosa (°C, K)



$T_p$	Temperatura do produto (°C, K)
$T_r$	Temperatura reduzida (°C, K)
$t$	Tempo (s, min, h)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
$V$	Volume (m <sup>3</sup> )
VAC	Vácuo
$V_c$	Volume crítico(m <sup>3</sup> )
$V_0$	Volume molar no ponto normal de ebulição
(cm <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	
$V_P$	Volume da embalagem (cm <sup>3</sup> , m <sup>3</sup> )
$V^G$	Volume do gás (cm <sup>3</sup> , m <sup>3</sup> )
$V_g$	Volume da fase gasosa (cm <sup>3</sup> , m <sup>3</sup> )
$V_r$	Volume reduzido (m <sup>3</sup> )
$V_T$	Volume total (m <sup>3</sup> )
$X_{BU}$	Umidade em base úmida (%)
$X_i$	Fração molar do componente $i$ na fase líquida
$X_2$	Concentração de CO <sub>2</sub> dissolvido em água, em
fração molar	
$X_w$	Fração de água no alimento
$Y_i$	Fração molar do componente $i$ na fase vapor
$\rho_a$	Massa específica aparente do produto (g cm <sup>-3</sup> ,
kg m <sup>-3</sup> )	
$\rho_f$	Massa específica do fluido (g cm <sup>-3</sup> , kg m <sup>-3</sup> )
$\rho_r$	Massa específica real do produto (g cm <sup>-3</sup> , kg m <sup>-3</sup> )
$\Delta E$	Mudança global de cor



## SUMÁRIO

<b>ESTRUTURA DO TRABALHO .....</b>	<b>xxix</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Mexilhão (<i>Perna perna</i> e <i>Mytilus edulis</i>) .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Morfologia do mexilhão <i>Perna perna</i> e <i>Mytilus edulis</i> .....	10
1.1.2 Cadeia produtiva e processamento do mexilhão <i>Perna perna</i> e <i>Mytilus edulis</i> .....	15
1.1.3 Características físico-químicas .....	22
<b>1.2 Conservação do mexilhão .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3 Grupos alvo de micro-organismos em mexilhões.....</b>	<b>28</b>
1.3.1 Contagem total de aeróbios mesófilos .....	32
1.3.2 Micro-organismos psicrotróficos e psicrófilos .....	32
1.3.3 <i>Vibrio</i> sp. ....	33
1.3.4 Bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S).....	35
<b>1.4 Acondicionamento sob atmosfera modificada .....</b>	<b>36</b>
1.4.1 Gases utilizados na atmosfera modificada.....	40
<b>1.5 Solubilidade do CO<sub>2</sub> em produtos que não respiram .....</b>	<b>41</b>
1.5.1 Parâmetros envolvidos na solubilidade do CO <sub>2</sub> em alimentos. ....	50
<b>1.6 Aplicação do processo de pré-solubilização de CO<sub>2</sub> (SGS) em produtos que não respiram.....</b>	<b>53</b>
<b>1.7 Alta pressão hidrostática em alimentos .....</b>	<b>57</b>
<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE DESTA TRABALHO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

**CAPÍTULO 2: PROCESSO ALTERNATIVO DE COCÇÃO E ENVASE SOB ATMOSFERA MODIFICADA PARA MEXILHÃO *Perna perna*. .....89**

**2 PROCESSO ALTERNATIVO DE COCÇÃO E ENVASE SOB ATMOSFERA MODIFICADA PARA MEXILHÃO *Perna perna*. 91**

<b>2.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>91</b>
2.1.1	Matéria prima .....	92
2.1.2	Processamento convencional.....	93
2.1.3	Processamento alternativo de mexilhões .....	94
2.1.4	Envase do mexilhão processado.....	96
2.1.5	Análises físico-químicas.....	97
2.1.6	Grau de enchimento e composição gasosa da embalagem .....	99
2.1.7	Análise estatística .....	103
2.1.8	Avaliação microbiológica.....	103
<b>2.2</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>104</b>
2.2.1	Características físico-químicas do produto processado.....	104
2.2.2	Composição gasosa nas embalagens com mexilhão.....	117
2.2.3	Avaliação microbiológica das amostras de mexilhão submetidas ao processamento convencional e alternativo. ....	123
<b>2.3</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>127</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>		<b>129</b>

**CAPÍTULO 3: APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> EM MEXILHÃO: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ABSORÇÃO DURANTE O PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO (SGS). .....137**

**3 APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> EM MEXILHÃO *Perna perna*: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ABSORÇÃO DURANTE O PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO (SGS). .....139**

<b>3.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>139</b>
<b>3.2</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>140</b>
3.2.1	Processamento dos mexilhões .....	140
3.2.2	Caracterização do mexilhão .....	141
3.2.3	Pré-solubilização do CO <sub>2</sub> em mexilhão <i>Perna perna</i> (método SGS – <i>Soluble Gas Stabilization</i> ) .....	142
3.2.4	Determinação do CO <sub>2</sub> absorvido no mexilhão .....	150

<b>3.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>151</b>
3.3.1	Caracterização da matéria-prima .....	151
3.3.2	Validação do aparato experimental .....	154
<b>3.4</b>	<b>Influência da pressão, da relação gás/produto e da temperatura na qualidade do CO<sub>2</sub> dissolvido em mexilhões .....</b>	<b>157</b>
<b>3.5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>166</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>167</b>

**CAPÍTULO 4: EFEITO DO PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) NA QUALIDADE DE MEXILHÕES AZUIS COZIDOS (*Mytilus edulis*)..... 172**

**4 EFEITO DO PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) NA QUALIDADE DE MEXILHÕES AZUIS COZIDOS (*Mytilus edulis*)..... 174**

<b>4.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>174</b>
<b>4.2</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>176</b>
4.2.1	Matéria-prima, processamento e amostragem .....	176
4.2.2	Perfil de temperatura durante o tratamento térmico .....	177
4.2.3	Envase.....	180
4.2.4	Análise das embalagens.....	181
4.2.5	Contagens microbiológicas.....	182
4.2.6	Análise estatística .....	183
<b>4.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>183</b>
4.3.1	Caracterização dos mexilhões crus e cozidos .....	183
4.3.2	Perda de água após o processamento.....	184
4.3.3	Perfil do tratamento térmico .....	184
4.3.4	Avaliação da composição gasosa dos mexilhões envasados durante o armazenamento sob atmosfera modificada e SGS. ....	187
4.3.5	Propriedades físico-químicas.....	190
4.3.6	Avaliação microbiológica.....	193
<b>4.4</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>197</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>199</b>

**CAPÍTULO 5: APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH) COMBINADA COM A PRÉ-**

<b>SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) EM MEXILHÕES AZUIS COZIDOS (<i>Mytilus edulis</i>) .....</b>	<b>207</b>
<b>5 APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH) COMBINADA COM A PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) EM MEXILHÕES AZUIS (<i>Mytilus edulis</i>) COZIDOS.....</b>	<b>209</b>
<b>5.1 Introdução.....</b>	<b>209</b>
<b>5.2 Material e métodos .....</b>	<b>211</b>
5.2.1 Testes preliminares.....	211
5.2.2 Material cru, processamento e amostragem .....	212
5.2.3 Análises físico-químicas.....	215
5.2.4 Contagens microbiológicas .....	216
5.2.5 Análise estatística .....	217
<b>5.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>217</b>
5.3.1 Testes preliminares.....	217
5.3.2 Caracterização do material cru .....	219
5.3.3 Avaliação do armazenamento dos mexilhões processados e envasados .....	220
5.3.4 Avaliação microbiológica.....	224
5.3.5 Observações no produto .....	227
<b>5.4 Conclusões.....</b>	<b>229</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>230</b>
<b>CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>237</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>239</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>241</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>243</b>

## ESTRUTURA DO TRABALHO

O trabalho foi estruturado da seguinte forma:

- Introdução.
- Capítulo 1 – *Revisão Bibliográfica*. Neste capítulo é apresentada a revisão sobre os diversos estudos sobre o assunto abordado na tese envolvendo a matéria-prima e os processos estudados.
- Capítulo 2 – *Processo alternativo de cocção e envase sob atmosfera modificada para mexilhão Perna perna*. Neste capítulo foi proposto um método alternativo de cocção para o mexilhão desconchado para evitar contaminação cruzada e reduzir a exsudação no interior das embalagens.
- Capítulo 3 – *Aplicação do CO<sub>2</sub> em mexilhão: avaliação do mecanismo de absorção durante o processo de pré-solubilização (SGS)*. Neste capítulo é apresentada a técnica de pré-solubilização em mexilhões bem como o mecanismo de atuação que envolve esse processo.
- Capítulo 4 – *Efeito da pré-solubilização do CO<sub>2</sub> na qualidade do mexilhão *Mytilus edulis* cozido*. Neste capítulo são apresentados a aplicação do processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> combinado com envase sob atmosfera modificada, comparando com o envase sob atmosfera modificada sem pré-solubilização e envase com ar, através de avaliação físico-química e microbiológica no armazenamento a 3 °C.
- Capítulo 5 – *Aplicação da alta pressão hidrostática combinada com o processo de pré-solubilização em mexilhão *Mytilus edulis* cozido*. Neste capítulo é apresentado um estudo a respeito da combinação do processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> com alta pressão hidrostática em mexilhões, comparando com o processo de alta pressão hidrostática sem a pré-solubilização e com o envase a vácuo.





## INTRODUÇÃO

A conservação dos alimentos depende de técnicas que possibilitem aumentar a vida útil dos alimentos, associada à manutenção das suas características sensoriais. O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é um gás que vem sendo estudado para utilização em alimentos, em especial em sistemas com atmosfera modificada, para aumentar a vida útil dos produtos. A atmosfera modificada consiste em introduzir uma mistura de gases no envase do alimento, sem posterior controle da atmosfera. Para que este método de conservação seja efetivo, é necessário que o alimento tenha uma qualidade bacteriológica adequada e controle rigoroso de temperatura, além da utilização de embalagens de baixa permeabilidade ao  $\text{CO}_2$  (LÓPEZ-VÁSQUEZ & VANACLOCHA, 2004; SOCCOL & OETTERER, 2003). A atmosfera modificada tem efeito em pescado por inibir as reações de oxidação e o crescimento bacteriano.

Os gases utilizados em atmosfera modificada são  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  e  $\text{N}_2$ . O nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) é um gás inerte e insípido, que apresenta baixa solubilidade em água e lipídios, o que o torna um gás de preenchimento, evitando o colapso das embalagens pela absorção de  $\text{CO}_2$ , e através da substituição do oxigênio da embalagem, inibindo crescimento microbiano e o ranço oxidativo em pescado. A presença de  $\text{O}_2$  em pequenas proporções favorece o crescimento de bactérias aeróbias e inibe o desenvolvimento de bactérias anaeróbias restritas (SCHIRMER & LANGSRUD, 2010; KERRY, O'GRADY & HOGAN, 2006; PATSIAS et al., 2006; SOCCOL & OETTERER, 2003).

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o gás com função mais importante em sistemas de atmosfera modificada, por seu efeito bacteriostático e não tóxico. As concentrações de  $\text{CO}_2$  interferem na respiração microbiana, através da sua dissolução nos alimentos, modificando o pH. O desempenho do  $\text{CO}_2$  como inibidor de crescimento microbiano é aumentado quando ocorre aumento da solubilidade do  $\text{CO}_2$ , provavelmente por ser aplicado na faixa de baixas temperaturas (SIMPSON, ACEVEDO & ALMONACID, 2009; SIVERTSVIK et al., 2002).

O alcance do aumento da vida útil vai depender da matéria-prima e também do conteúdo de gordura, a população microbiana inicial, a mistura de gás, a relação gás/volume do produto e da temperatura de armazenamento (SIVERTSVIK et al., 2002).

A eficiência da embalagem sob atmosfera modificada pode ser aumentada em produtos que não respiram, em especial os frutos do mar, adotando-se uma relação gás/produto (g/p) adequada, expressa em base mássica, para garantir a disponibilidade do CO<sub>2</sub> como bacteriostático e para evitar o colapso da embalagem. Para frutos do mar, recomenda-se uma relação g/p de 2:1 a 3:1 (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006). Porém, para a indústria, o volume ocupado pelas embalagens é um fator importante para sua comercialização e armazenamento, de forma que a adoção de relações g/p reduzidas soluciona o problema.

Sivertsvik et al. (2003) propuseram um método para reduzir o tamanho da embalagem necessária para o acondicionamento, que consiste na dissolução do CO<sub>2</sub> no produto antes do envase, utilizando como ferramenta a influência da temperatura (baseada no comportamento previsto pela Lei de Henry), sobre a quantidade de gás dissolvido no produto, onde sabe-se que a solubilidade do CO<sub>2</sub> aumenta a baixas temperaturas e com aumento da pressão total e parcial do gás, realizando uma dissolução prévia do CO<sub>2</sub> puro no alimento em uma quantidade suficiente, durante o período de 1-2 h (SIVERTSVIK et al., 2004). Esse método de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> é conhecido como SGS (*Soluble Gas Stabilization*), com potencial de impedir o colapso das embalagens, mesmo com baixas relações g/p em relação ao envase sob atmosfera modificada tradicional (ROTABAKK et al., 2008a, 2008b; SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; SIVERTSVIK et al., 2004).

O tratamento SGS tem apresentado resultados promissores em diversos alimentos, como peito de frango, camarão, queijo, bacalhau, entre outros (ROTABAKK et al., 2010, SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; JAKOBSEN & RISBO, 2009; SIVERTSVIK, 2007). Modelos matemáticos baseados em transferência de massa vêm sendo desenvolvidos para aplicação em projetos de otimização de processos em alimentos que não respiram, com objetivo de reduzir o tempo e o custo dos testes de laboratório (SIMPSON & CAREVIC, 2004).

Alguns estudos sugerem a combinação de técnicas sinérgicas de preservação para aumentar a inativação microbiana e aumentar a vida útil do produto. A combinação da alta pressão e tecnologias de envase ou alta pressão com tratamento térmico brando tem aplicações práticas na indústria de alimentos (MURCHIE et al., 2005; GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). A combinação do envase com atmosfera modificada usando gases pressurizados com processo a alta pressão sob baixas temperaturas já foi aplicado em pescado, como salmão (AMANATIDOU et al., 2000).

O processamento a alta pressão hidrostática (APH) é um processo não térmico que tem sido investigado como um método alternativo para a preservação de alimentos, capaz de inativar micro-organismos patogênicos e deteriorantes, bem como enzimas endógenas, sob pressões acima de 100 MPa, enquanto as propriedades sensoriais e nutricionais são mantidas, prolongando a vida útil dos alimentos. A aplicação dessa técnica em frutos do mar tem sido principalmente em ostras, abertura e desconhe, melhorando a segurança e a vida útil desse molusco. Esta técnica também tem sido aplicada em outros tipos de produtos já comercializados, como pescado, presunto cozido ou curado, produtos a base de frutas como guacamole, geleias de frutas e sucos prontos ao consumo (KOVÁČ et al., 2010; MURCHIE et al., 2005). Outras potenciais aplicações na indústria de frutos do mar são a remoção da carne da concha de crustáceos como a lagosta, caranguejo e camarão, além da produção de surimi e preparo de peixe defumado a frio (TERIO et al., 2010; AUBOURG et al., 2010).

O uso do processo SGS em alimentos antes do tratamento a alta pressão não é relatado pela literatura. Na combinação entre o SGS e o processo de alta pressão acontece a solubilização do CO<sub>2</sub> no mexilhão à pressão atmosférica e durante a aplicação de alta pressão, o CO<sub>2</sub> solubilizado deve ter sua ação intensificada pela influência da pressão elevada.

A utilização das técnicas que envolvem o CO<sub>2</sub>, como a atmosfera modificada e a pré-solubilização do CO<sub>2</sub>, combinados com diferentes processamentos como resfriamento a vácuo e o tratamento a alta pressão hidrostática, podem ser aplicadas para agregar valor a um importante produto oriundo da região litorânea de Santa Catarina, o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), que é um molusco bivalve, conhecido internacionalmente como “*brown mussel*”. O seu cultivo, denominado mitilicultura, é uma das modalidades mais produtivas que se conhece, pelo baixo custo de produção e a facilidade no manejo, além do apelo nutricional (DIAS et al., 2010). O litoral do Estado de Santa Catarina apresenta condições climáticas e ambientais adequadas para seu cultivo, o que resulta em uma atividade econômica em expansão, que se iniciou na década de 80 e ganhou destaque no cenário nacional, consolidando-se como maior produtor desse molusco no Brasil, com produção superior a 15.000 t/ano. Nesse sentido, há interesse em melhorar toda a cadeia de produção, desde o monitoramento da qualidade do ambiente marinho no cultivo até a conservação do produto final (MARQUES et al., 1998; RESGALLA JR et al., 2007; SÁENZ et al., 2010; SILVA et al., 2010).

O processamento de mexilhão no Brasil é recente e está em fase de desenvolvimento, de forma que apresenta limitações, como a vida útil reduzida e o risco microbiológico associado à comercialização do produto *in natura*, pelo hábito da população de consumir esse produto insuficientemente cozido, o que traz a necessidade de controle e aprimoramento de processos (CORDEIRO et al., 2007; WOOD, 1996).

O conteúdo elevado de água e a microbiota nativa presentes no mexilhão *Perna perna* tornam o produto altamente perecível necessitando de mecanismos que reduzam a carga microbiana natural, bem como evitar o desenvolvimento da microbiota que sobrevive ao tratamento térmico e aumento da vida útil do produto processado (LIMA et al., 2013). Uma alternativa para aumentar a vida útil de mexilhões é o uso de atmosfera modificada, com ênfase na utilização das propriedades bacteriostáticas do CO<sub>2</sub> e seu potencial em solubilizar no conteúdo aquoso e nos lipídios dos alimentos que não respiram.

A conservação de mexilhões *in natura* através do uso de atmosfera modificada combinada com a refrigeração do produto vem sendo estudada (PASTORIZA et al., 2004; GOULAS et al., 2005; CAGLAK et al., 2008). Porém, as informações são muito limitadas quando se trata da atuação do gás no produto cozido, bem como a utilização de vácuo e de alta pressão hidrostática (APH) como processos combinados com a aplicação de CO<sub>2</sub> em mexilhões. Os processos em estudo podem contribuir significativamente para melhorar a qualidade de mexilhões e consequentemente aumentar sua vida útil, abrindo possibilidades a novas formas de comercialização no mercado nacional e para exportação.

Diante do exposto, o objetivo da tese foi investigar a eficácia de diferentes processos no aumento da vida útil do mexilhões cozidos e desconchados.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral investigar a eficácia de diferentes processos, utilizando o CO<sub>2</sub> como meio, no aumento da vida útil do mexilhões cozidos e desconchados.

### Objetivos Específicos

- 1) Aplicar o sistema de cozimento e resfriamento à vácuo para o mexilhão *Perna perna* desconchado como alternativa ao processo convencional;
- 2) Aplicar dióxido de carbono em mexilhões a baixas pressões e temperaturas e determinar a solubilidade do gás no produto através do método manométrico em aparato experimental;
- 3) Estudar o processo de pré-solubilização (SGS) do CO<sub>2</sub> em mexilhão *Perna perna* e avaliar a influência da relação gás/produto, temperatura e pressão na solubilidade e na taxa de absorção do CO<sub>2</sub>;
- 4) Avaliar a influência do CO<sub>2</sub> nas características do mexilhão *Perna perna* através dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- 5) Aplicar o processo de pré-solubilização (SGS) do CO<sub>2</sub> nos mexilhões *Mytilus edulis* em escala ampliada seguido do envase sob atmosfera modificada e avaliar a vida útil do produto quando comparado as amostras acondicionadas em ar, durante o armazenamento.
- 6) Avaliar a aplicação do processo de pré-solubilização (SGS) combinado com processo a alta pressão hidrostática em mexilhões;
- 7) Verificar a influência da alta pressão na textura e características sensoriais do mexilhão com e sem aplicação da pré-solubilização de CO<sub>2</sub>;
- 8) Determinar a vida útil do produto pré solubilizado com CO<sub>2</sub> combinado com processo a alta pressão através das análises microbiológicas e físico-químicas associadas a composição gasosa no interior da embalagem, comparando com envase a vácuo e com tratamento a alta pressão.



**CAPÍTULO 1:  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**





# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Mexilhão (*Perna perna* e *Mytilus edulis*)

Os mexilhões são moluscos bivalves marinhos, classificados taxonomicamente como parte do filo *Mollusca*, classe *Bivalvia*, Subclasse *Pteriomorphia*, ordem *Mytiloidea* e família *Mytilidae* (MARQUES, 1998). Os gêneros mais comuns são o *Mytilus*, *Perna* e *Mytella*. Esses tipos de moluscos vivem fixos aos costões rochosos, na região de variação de marés e início do infralitoral (FERREIRA & MAGALHÃES, 1997). No Brasil, a espécie predominante é a do mexilhão *Perna perna*, conhecido como “*brown mussel*” e é considerado, do ponto de vista comercial, uma das espécies mais importantes (TAVARES et al., 1998).

A ocorrência do mexilhão na costa brasileira se estende do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. O mexilhão da espécie *Perna perna* é dióico e de água marinha (TAVARES et al., 1998). A Tabela 1.1 apresenta as espécies brasileiras de mexilhão mais comuns:

Tabela 1.1 - Espécies de mexilhão mais comuns no Brasil.

NOME	ESPÉCIE
mexilhão, marisco	<i>Perna perna</i>
sururu	<i>Mytella falcata</i> (=charruana)
mexilhão da Patagônia	<i>Mytilus edulis platensis</i>
mexilhão dos tolos	<i>Brachidontes solistianus</i>
mexilhão dos tolos	<i>Brachidontes darwinianus</i> (=exustus)

Fonte: Scalice (2003).

Outra espécie com grande valor comercial é o mexilhão azul (*Mytilus edulis*) sendo um bivalve de grande importância no setor de frutos do mar europeu. A produção do mexilhão na Europa é em torno de 700 a 800.000 t por ano, enquanto as fazendas marinhas norueguesas produzem em torno de 2000 t por ano em cultivos suspensos, com o potencial de expansão através dos anos. O cultivo do mexilhão azul está distribuído nas águas europeias, se estendendo desde o Mar Branco na Rússia até o sul, como a costa do Atlântico no sul da França. A espécie *Mytilus edulis* possui capacidade de suportar grandes variações de salinidade, dessecação, temperatura e tensão de oxigênio, o que facilita a sua distribuição nos ambientes marinhos. A aclimação da espécie é ampla, desde locais subtropicais aos habitats congelados com frequência.

A maioria dos mexilhões cultivados são produzidos em menos de 2 anos, embora possam viver até 18-24 anos (FAO, 2004). A Figura 1.1 apresenta o aspecto das espécies de mexilhão com maior valor comercial, *Perna perna* e *Mytilus edulis*, respectivamente.

Figura 1.1 - Espécies de mexilhão com grande valor comercial (a) *Perna perna* e (b) *Mytilus edulis*.



(a)

(b)

Fonte: Google, (2012).

Os mexilhões são susceptíveis a contaminações, por serem animais que filtram a água e se alimentam de matéria orgânica e inorgânica, que contém bactérias e vírus. Os mexilhões *in natura* têm uma contagem microbiana alta, o que exige um controle rígido durante o processamento e manipulação (OLIVEIRA et al., 2011; ROBERTSON, 2007; CROCI et al., 2002).

### 1.1.1 Morfologia do mexilhão *Perna perna* e *Mytilus edulis*

Os mexilhões cultivados com interesse econômico são provenientes de várias espécies, havendo semelhanças e diferenças entre as mesmas, documentadas por estudos baseados na multiplicidade de características do mexilhão, como a morfologia, fisiologia e genética (MOREIRA, 2008). O posicionamento do gênero *Perna* dentro da família *Mytilidae* é confuso, porém é representado por três espécies com distribuição geográfica: *P. canaliculus* (Gmelin, 1791) restrito a Nova Zelândia, *P. viridis* (Linné, 1758) do Indo-Pacífico, e *P. perna* que é amplamente distribuída ao longo das costas da África e da costa atlântica da América do Sul (NARCHI & BUENO, 1997). Essa complexidade

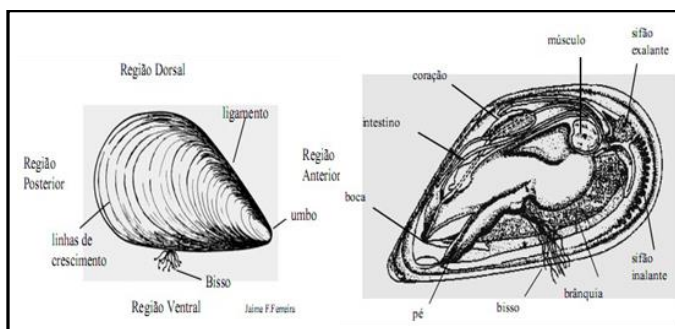
também se aplica à espécie *Mytilus edulis*, em relação à identificação de suas características, devido à sua capacidade de hibridizar em zonas de contato secundário com outras espécies, como *M. galloprovincialis* e *M. trossulus*, o que traz questionamento quanto à validade da situação taxonômica deste molusco (GROENENBERG et al., 2011).

Os moluscos desenvolvem exoesqueleto rígido em forma de concha para se proteger de predadores e suportar a pressão hídrica do meio aquático em que habitam. A formação das conchas é resultante da deposição contínua de uma substância produzida pelo próprio molusco, o nácar, a partir da superfície interna da concha onde se desenvolve, proporcionando um mecanismo de defesa contra parasitas e uma forma de manter a área lisa e livre de corpos estranhos como grãos de areia (SILVA et al., 2010).

O mexilhão apresenta duas conchas, que são unidas por um músculo adutor (responsável pelo controle da abertura e fechamento das valvas) para realizar sua alimentação e respiração (LUDORFF & MEYER, 1973). A concha dos mitilídeos é equivalva e inequilateral, com umbos prosógiros próximos à extremidade anterior. A tendência que a concavidade da borda ventral das valvas tem em ser maior nos animais que vivem em costões expostos do que naqueles de costões protegidos, em que a borda ventral é mais convexa foram documentados nos mexilhões *Perna perna* e *Mytilus edulis* (NARCHI & BUENO, 1997). As características visuais da concha evidenciam a coloração violeta mesclada com púrpura e ágata e tons de castanho para o gênero *Perna*, enquanto em *Mytilus edulis* observa-se o formato triangular no contorno; cor roxa, azul, marrom e ocasionalmente possui cor marrom escura destacada com inscrições radiais roxas (NARCHI & BUENO, 1997; FAO, 2006). Essas duas espécies possuem diferenças no tamanho da concha (média entre 3 a 5 cm para *Mytilus edulis* e 5 a 8 cm para a espécie *Perna perna*). Na parte interna está localizada o umbo, que é o extremo pontiagudo da concha e a face interna é de cor violácea e de aspecto nacarado, onde se distinguem os pontos de inserção de diferentes músculos (MOREIRA, 2008). Ainda na face interna, são percebidas diferenças entre essas duas espécies, cuja valva de *Perna perna* não existe a cicatriz do músculo adutor anterior, e esta ausência é uma das características que distinguem o gênero *Perna* do *Mytilus*, que a possui. Todos os outros músculos que se inserem nas valvas de *Perna perna* apresentam-se de forma a marcar dois grupos distintos de cicatrizes. Em *Mytilus* formam uma única cicatriz (NARCHI & BUENO, 1997).

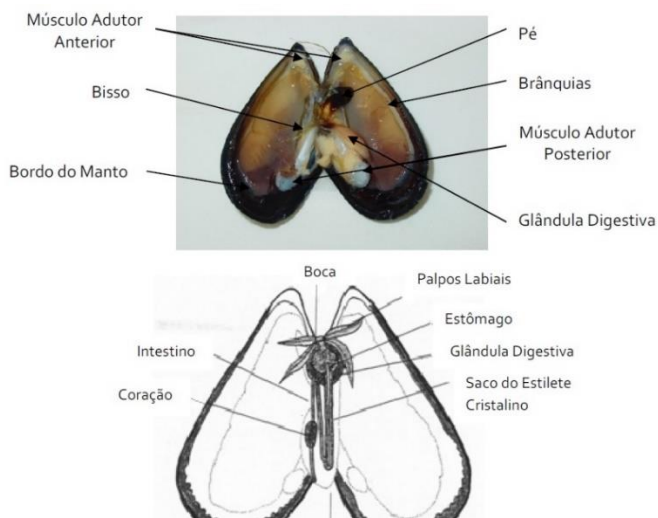
A região encefálica e olhos são ausentes nos moluscos (LUDORFF & MEYER, 1973). O manto, as lâminas branquiais, o pé e o bisso são as principais estruturas que compõem a anatomia interna do mexilhão. O manto é composto por lâminas epiteliais que formam as cavidades do animal, e servem como abrigo aos outros órgãos, encobrindo-os. As lâminas branquiais efetuam a respiração, com a absorção de oxigênio e seleção das partículas alimentares a serem absorvidas. O pé é usado para a locomoção do mexilhão quando ocorre o desprendimento do animal do substrato (MARQUES, 1998). A função de possibilitar a fixação do mesmo às superfícies é desempenhada pelo bisso, cuja estrutura forma-se a partir de uma substância protéica secretada por um conjunto de glândulas no interior do pé do mexilhão, que entra em contato com um produto de glândulas, o fenol e a própria água do mar, e é polimerizado. Essa estrutura no início é filamentososa, como algas, para então ocorrer uma fixação secundária a um substrato rígido (FERREIRA & MAGALHÃES, 1997). Existem diferenças nas características do bisso entre as espécies, onde o *Perna perna* possui maior resistência no bisso e exige a soltura manual dos mexilhões, enquanto *Mytilus edulis* possui facilidade em se desprender do meio onde estão fixados. Essa diferença está relacionada com a ausência do músculo adutor anterior em *Perna perna*, decorrente do ligamento bissal mais firme, embora a musculatura em todos os mitilídeos siga um mesmo padrão estrutural (NARCHI & BUENO, 1997; SCALICE, 2003). A Figura 1.2 mostra a anatomia interna e externa do mexilhão, enquanto a Figura 1.3 mostra a anatomia do mexilhão *Mytilus edulis*.

Figura 1.2 - Anatomia externa e interna do mexilhão *Perna perna*.



Fonte: Ferreira; Magalhães (1997).

Figura 1.3 - Anatomia do mexilhão *Mytilus edulis*.



Fonte: MOREIRA (2008).

O mexilhão possui sexos separados, sendo classificado como dióico. A sua reprodução ocorre por fecundação em ambiente aquático, dos gametas masculino e feminino. Toda a área do manto pode formar gametas, o que contribui no peso da porção comestível. As glândulas sexuais ou folículos estão distribuídos no manto, que abrigam os óvulos e os espermatozóides produzidos pelas gônadas. Os gametas conferem ao manto uma coloração característica, sendo branco-leitoso nos machos e laranja-salmão nas fêmeas. A reprodução dos mexilhões acontece praticamente durante o ano todo, com algumas variações, que são associadas à fisiologia dos organismos, determinando a formação ou liberação de material reprodutivo. Os mexilhões da espécie *Perna perna* iniciam sua maturação sexual com dois a três centímetros de comprimento (MARENZI & BRANCO, 2006; MARQUES, 1998). Na espécie *Mytilus edulis*, a reprodução é considerada sazonal, onde a liberação dos gametas pelos mexilhões ocorre durante a primavera e verão europeus, como resultado do estímulo promovido pelo aumento da salinidade e da temperatura da água nesta época do ano (MOREIRA, 2008). A cor do manto nem sempre é um guia confiável para a identificação do gênero de *Mytilus edulis*, porque a cor dos gametas varia do branco até o

laranja/rosa, além dos casos de hermafroditismo (BEAUMONT, GJEDREM & MORAN, 2007; MOREIRA, 2008). A Figura 1.4 mostra o mexilhão *Perna perna* macho (branco-leitoso) e fêmea (vermelho-alaranjado), e a Figura 1.5 mostra o mexilhão *Mytilus edulis*, respectivamente.

Figura 1.4 - Mexilhão *Perna perna* macho (branco-leitoso) e mexilhão fêmea (vermelho-alaranjado).



Fonte: Grupo de Estudos Pesqueiros UNIVALI –Itajaí (2009)

Figura 1.5 - Mexilhão *Mytilus edulis* fêmea (vermelho-alaranjado) e mexilhão macho (branco-leitoso).



Fonte: Google (2014).

Assim como outros moluscos, o mexilhão utiliza a filtração da água como meio de alimentação. Esse mecanismo ocorre através do movimento ciliar de células das brânquias, sendo o fitoplâncton o principal constituinte da sua dieta (FERREIRA & MAGALHÃES, 1997). O seu desenvolvimento está relacionado também a fatores externos que interferem no seu crescimento, como o ambiente de cultivo, a temperatura e circulação da água e a densidade de animais em uma área fixa, o que influencia na disponibilidade do alimento ao mexilhão, além da

concorrência predatória e das exigências reprodutivas (BOWNES & MCQUAID, 2010). Um mexilhão possui tamanho comercial em torno de 5 a 8 cm (TAVARES et al., 1998).

A sazonalidade do mexilhão foi estudada e comprovada em diversas pesquisas (MARQUES et al., 1998; RESGALLA JR. et al., 2007; VERNOCCHI et al., 2007; SOKOŁOWSKI et al., 2010). A carne do mexilhão passa por variação durante o ano devido à composição do fitoplâncton, que serve como alimento, na região de cultivo, o que proporciona alguma diferença no tamanho e também nos valores de sua composição centesimal (TAVARES et al., 1998). O rendimento da carne para mexilhões de cultivo é maior do que de estoques naturais, devido ao fato de que os mexilhões de cultivo estão sempre submersos, tendo assim, sua capacidade de respiração e filtração potencializadas. Nos estoques naturais, as variações de maré tornam o acesso do mexilhão aos nutrientes inconstante (FERREIRA & MAGALHÃES, 1997). Assim, os animais passam por ausência de alimentação, com consequente queda no metabolismo. Isso traz um menor crescimento e rendimento da carne dos mexilhões em cultivo (MARQUES, 1998).

### **1.1.2 Cadeia produtiva e processamento do mexilhão *Perna perna* e *Mytilus edulis***

#### *Histórico e produção*

A mitilicultura consiste na criação de mexilhões com o objetivo comercializar o produto *in natura* ou processado e é uma atividade existente na Europa desde o século XII, com o desenvolvimento dos processos de cultivo e industrialização já nos séculos XV e XVI. Na primeira metade do século XX, ocorreu uma implantação importante dos cultivos no mercado devido ao grande aumento no consumo (FERREIRA & NETO, 2008).

A comercialização do mexilhão *Perna perna* no Brasil ocorre principalmente na forma *in natura*, marinado e congelado, direcionada para estabelecimentos comerciais como bares e restaurantes locais no atacado. Algumas empresas já comercializam mexilhão marinado e temperado, ou pré-cozido acondicionado em embalagens flexíveis. Em outros países, como os da Europa, a forma de comercialização do mexilhão *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* é *in natura*, sem casca ou como mexilhões desconchados, refrigerados, embalados em embalagens flexíveis e defumados (FURLAN et al., 2007; CAGLAK,

CAKLI & KILINC, 2008). Quanto ao consumo, o mexilhão à vinagrete corresponde a 20 % dos pratos preparados com esse molusco (FURLAN et al., 2007).

O cultivo comercial do mexilhão *Perna perna* em Santa Catarina foi promovido por instituições públicas, através da participação de órgãos de pesquisa como o EPAGRI e de trabalhos de pesquisa desenvolvidos na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (EPAGRI, 2012). O desenvolvimento dessas pesquisas possibilitou o desenvolvimento da atividade a nível familiar, com o objetivo de melhoria da economia local. A comercialização costuma ser feita apenas entre produtores e restaurantes e peixarias sem um controle de qualidade dos mexilhões *in natura* ou processados (SOUZA et al., 2009).

O cultivo de moluscos bivalves no Estado de Santa Catarina aumentou com o decorrer do período, sendo responsável por 95% da produção nacional. A ostra, o mexilhão e a vieira estão entre as espécies em destaque (SOUZA et al., 2009; EPAGRI, 2012). A produção total de moluscos comercializados em 2011 por SC (mexilhões, ostras e vieiras) foi de 18.253,8 toneladas (t), representando um aumento de 16,75 % em relação a 2010 e representando a maior produção já registrada para o Estado (EPAGRI, 2012).

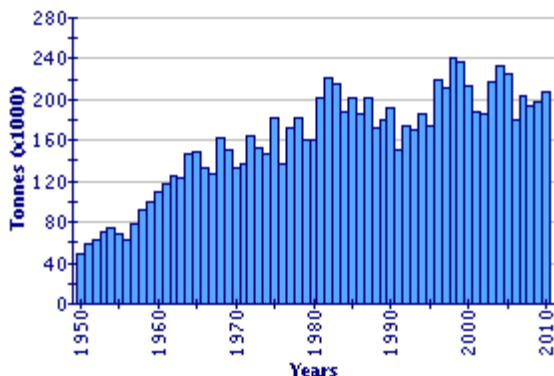
A comercialização de mexilhões na safra 2011 foi de 15.965 t, representando um aumento de 16,35 % em relação à safra 2010. O aumento da safra 2010 foi de 12,23%, quando comparado com o valor da safra 2005, que era a maior até o momento. Houve uma redução no número de miticultores, passando de 624, em 2009, para 588 em 2010, e 599 em 2011, mesmo com o aumento da produção. A crescente demanda nacional pelo produto; a maior disponibilidade de sementes provenientes de coletores artificiais; o assentamento remoto e extração de bancos naturais; o estabelecimento de uma tabela com preços mínimos já praticados por alguns produtores; protetoras do mercado, garantindo maior rentabilidade e as campanhas de incentivo ao consumo de moluscos inspecionados, estão entre os fatores que contribuíram para o aumento da produção de mexilhão *Perna perna* em SC (EPAGRI, 2012).

O conjunto desses fatores somados à morfologia da costa litorânea e à importância socioeconômica que esta atividade tem adquirido faz com que os parâmetros ambientais que regem a produção do mexilhão sejam uma estratégia básica para dar suporte ao ambiente de cultivo específico para esse fim (RESGALLA JR et al., 2007).



O cultivo do mexilhão *Mytilus edulis* não era realizada com finalidade comercial até o século XIX, e sua coleta era feita a partir de leitões selvagens existentes, tendo como objetivo alimentar, utilizar como isca de peixe e fertilizante. No entanto, as operações envolvendo a aquicultura foram baseadas na necessidade de se estocar alimentos, em especial o pescado. No século XIII já existiam sistemas de engorda de mexilhão em estacas na França, enquanto os países do norte da Europa desenvolveram o cultivo submerso, em parcelas menores. O aluguel de parcelas de cultivo de mexilhões no início do século XIX resultou da pesca excessiva de leitões naturais. Na virada da década de 1970, o cultivo tradicional foi melhorado com novos desenvolvimentos tecnológicos que utilizam cultivos suspensos (cordas ou espinheis) (FAO, 2006).

A produção de *Mytilus edulis* na Europa se estabilizou em grande escala em países tradicionais, como a França e a Holanda e a contribuição em termos de tecnologia no momento tem sido de nações periféricas como o Reino Unido, Noruega e Irlanda. O aumento na produção de mexilhão tem sido observado em países como o Canadá e a Irlanda, e a tendência no mercado é a ênfase em produtos transformados substituindo a comercialização tradicional do mexilhão na concha. O comércio internacional de mexilhões tem aumentado de forma consistente nos últimos 20 anos, de forma que o mercado de importação e exportação para o *Mytilus edulis* fresco depende da demanda, que é variável com o estágio de desenvolvimento do molusco e da época do ano (FAO, 2006). A Figura 1.6 apresenta a produção global do mexilhão *Mytilus edulis* desde a década de 50 até o ano de 2010. As fazendas de cultivo na Noruega produzem em torno de 2000 t por ano em cultivo suspenso, com o potencial de expansão todo ano. Para atingir este objetivo, o desenvolvimento de novos produtos com o aumento da vida útil em relação aos produtos frescos tradicionais aumentará a flexibilidade em relação ao transporte e manipulação dos produtos (SSB, 2013; SANDBERG et al., 2007).

Figura 1.6 - Produção global de *Mytilus edulis* nos últimos 60 anos.

Fonte: FAO (2006)

### *Beneficiamento dos mexilhões Perna perna e Mytilus edulis*

Os mexilhões são coletados e transportados ainda vivos, com as valvas fechadas. O primeiro requisito é a procedência de águas limpas e que estejam isentos de micro-organismos patogênicos. Quando os moluscos provêm de regiões arenosas, é recomendável deixá-los em um tanque com água corrente durante o tempo adequado para a remoção do lodo e faz-se a limpeza externa para a remoção de algas e sujidades aderidas (LUDORFF & MEYER, 1973). A qualidade microbiológica do mexilhão *in natura* é influenciada pela condição sanitária da água em que eles se desenvolvem e a contagem microbiológica do produto é também influenciada pelas práticas no processamento e armazenamento (WHO, 2009; HUSS, 1997).

O processamento de mexilhões, de maneira genérica, é composto das seguintes etapas: recepção do produto ainda na concha em fardos, cocção por vapor ou água quente, seguindo de choque térmico do produto em água fria, e o desconche (de forma manual ou automática), podendo ser congelados ou do tipo “pronto para consumo” para então serem embalados (CRUZ & FLETCHER, 2011).

O sistema de beneficiamento sofre alterações, podendo ser parcial ou totalmente automatizado, dependendo do local e do nível tecnológico. Em países mais desenvolvidos e com histórico mais extenso do cultivo e processamento de mexilhões, como a Espanha, o processamento é

realizado de forma padronizada e automatizada.

O mexilhão *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*, beneficiados na Espanha tem dois destinos principais: o congelamento ou o produto na forma enlatada (SCALICE, 2003). As versões de mexilhão congelado, defumado ou em vidro de conservas também são produzidas (FAO, 2001). A descrição das etapas de processamento referentes às espécies europeias na forma automatizada é feita a seguir, segundo Barros et al. (2009):

**Operações preliminares:** os mexilhões coletados ainda vivos chegam à indústria e através de uma correia transportadora e são direcionados para a lavagem das conchas por cilindros rotativos, que ao mesmo tempo em que removem as sujidades, servem para peneirar e remover os mexilhões que estão fora das especificações. Os mexilhões ficam temporariamente armazenados em *containers* de 1000 kg para a alimentação das linhas de processo. A seguir, os aglomerados de mexilhão são encaminhados para uma máquina debulhadeira, para ser dividido em pedaços. Esse equipamento consiste em um cilindro metálico com um eixo fixo de pás de metal cortantes que dividem os aglomerados. Os filamentos do mexilhão (bisso) são removidos por outro equipamento, cuja eficiência varia, dependendo se o bisso permanece junto à concha ou não.

**Operações de processo:** a cocção é feita com vapor de água a 115 °C em um sistema de processamento contínuo, semelhante a uma panela, onde os mexilhões abrem as conchas devido ao tratamento térmico. O sistema tem um par de travas que ajusta a entrada-saída de uma carga de mexilhões, por meio de válvulas. Após o cozimento, o mexilhão passa por uma separação em três passos:

1) A carne é separada da concha por flotação em um banho de salmoura refrigerado, para reduzir a temperatura da carne após o aquecimento, evitando que eles fiquem quebradiços e/ou degradados. A seguir, são submetidos a uma correia transportadora com agitação para facilitar a retirada de carne que ainda não se separou das conchas, para finalmente passar por uma inspeção visual e manual para recuperar a carne remanescente das etapas anteriores.

2) Remoção adicional do bisso que não foi retirado ainda da carne de mexilhões, por um equipamento provido de uma malha que garante a fixação da carne para remover os filamentos. A carne é classificada pelo tamanho em diferentes peneiras, da maior para a menor.

3) No caso do mexilhão ser direcionado para a linha enlatada, é realizada uma operação de desidratação, através de injeção de vapor, para remover a água contida na carne para evitar dispersão e lançamento da água durante a esterilização das latas, o que poderia causar distorções nos recipientes.

No Brasil, a automatização das indústrias ainda é escassa, pois depende de investimentos altos e muitas vezes, da importação desses equipamentos específicos. A seguir são descritas as etapas da linha semi-automatizada no país. A

Figura 1.7 ilustra o fluxograma genérico do processamento do mexilhão *Perna perna* (LIMA, 2010).

As conchas limpas seguem para a cocção, onde a carne é extraída das mesmas em virtude do enfraquecimento do músculo adutor que mantém a concha fechada. Assim, a temperatura mais alta supera a força que mantém tensos os músculos adutores e as valvas são separadas e a carne pode ser extraída com facilidade. Em alguns casos, a membrana exterior do manto ou os sífões são eliminados, quando os moluscos são oriundos de regiões arenosas e estavam enterrados (LUDORFF & MEYER, 1973). A abertura das valvas não significa o término da cocção, pois a abertura dos bivalves ocorre em seguida ao contato com o calor, o que não é suficiente para a eliminação de micro-organismos (WOOD, 1996).

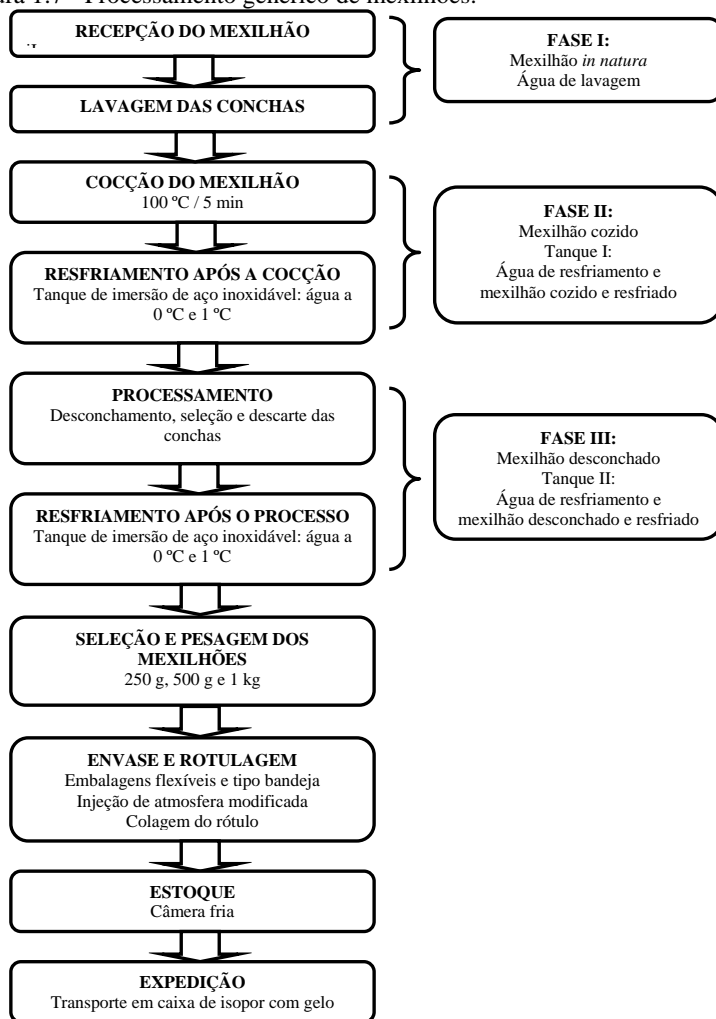
A cocção além de extrair a carne dos moluscos, serve como o tratamento térmico dado ao produto com a finalidade de reduzir a carga microbiana e inibir o crescimento de bactérias, parasitas e vírus patológicos ao homem. O tempo de exposição ao calor úmido é variável conforme o tamanho, velocidade de penetração do calor e condições de aquecimento (CAVALHEIRO, 2011; ANTONIOLLI, 1999).

Conforme Silva Júnior (1995), a temperatura ideal no interior do alimento durante a cocção é de 74 °C por 5 minutos ou 65 °C por 10 minutos, considerando as condições mais críticas de contaminação, desde a recepção até o consumo.

Os mexilhões cozidos e desconchados são submetidos ao resfriamento, para reduzir a velocidade das transformações microbianas e bioquímicas, prolongando sua vida útil. As pequenas unidades produtoras normalmente utilizam a aspersão ou imersão do produto em água gelada. As desvantagens dessa prática são o consumo elevado de água no processo e o risco de contaminação microbiológica pela água de resfriamento ou gelo. A carne é direcionada para o desconche manual,

com separação da carne e direcionamento desta para um novo resfriamento imerso em água. A carne pode ter diferentes destinos, como a fabricação de conservas (enlatamento em salmoura), ou ser resfriada e/ou congelada, sendo direcionadas para o envase e comercialização (HUBER, 2004).

Figura 1.7 - Processamento genérico de mexilhões.



Fonte: Lima (2010).

Lima (2010) descreveu os procedimentos utilizados para o processamento do mexilhão *Perna perna* em uma indústria da grande Florianópolis, que adotava procedimentos de lavagem das conchas em tanque com água salgada para remover sujidades e utilizava um rolo mecanizado desenvolvido pela própria empresa para seleção do tamanho. As conchas selecionadas seguem para a parte interna da indústria, através de uma esteira, onde são acondicionadas em caixas plásticas previamente higienizadas para o processo de cozimento, com vapor à temperatura de 100 °C durante 5 minutos. O produto cozido é imerso em um tanque para resfriamento, contendo água e gelo durante alguns minutos, após são drenados e descascados manualmente. Os mexilhões descascados são colocados em recipientes do tipo peneira, em aço inox, para remoção do excesso de água e posteriormente são acondicionados em caixas plásticas. Os mexilhões acondicionados nas caixas são pesados e imersos em tanque com água e gelo, para manutenção da temperatura. Após a imersão, o produto é disposto em uma mesa para seleção manual, onde são descartados os mexilhões de menor tamanho, com coloração diferente do padrão ou fisicamente danificados. Por fim, são embalados e refrigerados a 3 °C para comercialização.

A refrigeração aplicada à conservação de frutos do mar é essencial, visto que evita o crescimento de diversos grupos de micro-organismos, como os termófilos (35 °C a 55 °C) e mesófilos (10 °C a 40 °C). O grupo capaz de interferir nos alimentos sob refrigeração são os psicrotróficos (-5 °C a 15 °C). O uso de temperaturas mais baixas de refrigeração (abaixo de 5°C) retarda a alteração microbiana e evita o crescimento de patógenos (FELLOWS, 1994). Dependendo do processo de manipulação, a vida útil de mexilhões refrigerados crus é de 6 a 7 dias (CAGLAK, CAKLI & KILINC, 2008).

### **1.1.3 Características físico-químicas**

Os mexilhões possuem um valor nutricional excelente, o que torna o produto uma ótima alternativa para o consumo humano. O mexilhão é rico em minerais, como selênio, cálcio, ferro, magnésio, fósforo e vitaminas A, B1, B2, B6, B12 e C. O conteúdo lipídico dos mexilhões é rico em ácidos graxos poliinsaturados, correspondente a 37-48 % dos lipídeos totais. O que contribui para que este produto seja considerado saudável são as proporções das gorduras saturadas, monossaturadas e

poliinsaturadas (ORBAN et al., 2002; CAGLAK, CAKLI & KILINC, 2008).

O mexilhão é um produto que apresenta uma variação sazonal no que se refere à composição de sua carne. O valor calórico do mexilhão é comparado ao de peixes magros, sendo de 80 kcal/100 g. Os mexilhões estão incluídos no grupo do pescado que apresenta baixo valor calórico, além de baixos teores de lipídeos e proteínas. Em compensação, apresenta um teor elevado de glicogênio (CORDEIRO, 2005).

A água é o componente existente em maior proporção na carne de pescado e de moluscos, com valores em torno de 75 a 80 %. Os teores de água elevados potencializam a ação de agentes de deterioração e por isso a quantidade da água deve ser reduzida, como maneira de contribuir para sua conservação. O carboidrato presente no mexilhão é o glicogênio, que varia de 1 a 7 % de sua composição. O valor proteico médio de mariscos é de 13 % (CORDEIRO et al., 2007). O teor de cinzas em mexilhão é de 1 a 2% (KAI & RUIVO, 1988).

A Tabela 1.2 apresenta a composição centesimal do mexilhão, determinada por Lima (2010).

O pH do mexilhão é semelhante aos demais produtos de pescado, com valores em torno de 5 a 7, e por isso, classificado como um produto de baixa acidez. Os mexilhões não são contemplados especificamente pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – (RIISPOA) quanto aos valores de pH, mas aplicam-se os limites estipulados para pescado, cujo valor para carne externa é de 6,8 e para a interna, inferior a 6,5. Os dados de pH não são suficientes para determinar o frescor, de forma que outras análises complementam as condições físico-químicas do produto (FURLAN et al., 2007). O pH do mexilhão pode variar de acordo com as condições de armazenamento. A realização de estudos específicos para o pH dos moluscos bivalves é essencial, pois os valores de referência até então utilizados são para pescado, e os mexilhões possuem composição centesimal diversificada, o que pode acarretar decomposição e alteração do pH de forma diferente do pescado (GALVÃO et al., 2006).

Tabela 1.2 - Composição centesimal da carne de mexilhão *Perna perna* cozido e resfriado.

<b>Componente</b>	<b>Valor</b>
Umidade (g) 100 g	76,4 ± 0,2
Proteínas (g) 100 g	14,0 ± 0,1
Carboidratos (Fração NIFEXT)	5,3 ± 0,3
Lipídios (g) 100 g	2,2 ± 0,1
Cinzas (g) 100 g	2,1 ± 0,2

\*Os valores percentuais dos componentes representam o valor médio ± desvio padrão de determinações em triplicata.

Fonte: Lima (2010)

A atividade de água tem sido um parâmetro importante para garantir a estabilidade de alimentos e controlar o crescimento de micro-organismos deterioradores e causadores de intoxicação e infecção alimentar. O controle da água livre nos alimentos visa tornar o alimento estável perante a deterioração microbiana, de forma que os micro-organismos são dependentes da água para seu desenvolvimento. O valor alto de atividade de água ( $a_w > 0,95$ ) do mexilhão o torna um substrato ideal para os micro-organismos, combinados com a presença de aminoácidos livres, dos níveis de glicogênio e pH alto (6,7 a 7,1) (CAGLAK, CAKLI & KILINC, 2008).

A capacidade de retenção de água (CRA) é definida como a aptidão da carne em reter de forma total ou parcial a sua própria água, ou a água que for adicionada ao produto durante o seu processamento (ORDÓÑEZ et al., 2005; MCMILLIN, 2008). Está relacionada com os mecanismos de perda ou ganho de água nos produtos. Esse parâmetro pode auxiliar no perfil de exsudação do mexilhão, no sentido de avaliar sob quais condições o produto pode perder água e comprometer a sua qualidade. Esta propriedade influencia diretamente na cor, textura, firmeza, maciez e na suculência da carne e no desenvolvimento e na apreciação das características sensoriais, no valor nutritivo, no valor comercial e na atitude tecnológica da carne (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A CRA está diretamente relacionada com a suculência do produto, que pode ser modificada para maior ou menor grau, de acordo com as operações envolvidas nas diferentes formas de processar a carne. A maior retenção de água é favorável em produtos de pescado, por resultar em melhores características de textura, suculência, cor e sabor (TEIXEIRA & BEIRÃO, 1999).



Pulgar et al. (2012) explicam o mecanismo de perda de água em carne suína, associando a perda de água na carne pela cocção por três processos principais, onde a água pode ser evaporada devido ao aumento da temperatura e/ou redução da pressão, seguido do encolhimento das proteínas miofibrilares a altas temperaturas, com uma diminuição paralela no volume interfibrilar, o que reduz a capacidade da miofibrila para retenção da água. Assim, uma parte da água retida por capilaridade é perdida durante o cozimento.

O mexilhão tem a sua perda de água no armazenamento vinculada à degradação da estrutura muscular, causada pela combinação das enzimas proteinases endógenas do molusco com a atividade microbiana, que acarreta a secreção de uma gama de enzimas hidrolíticas, em especial proteinases. Além disso, o alto conteúdo de glicogênio e o conteúdo livre de aminoácidos da carne do mexilhão são fontes utilizadas para o crescimento microbiano e encurtam a vida útil do produto fresco (MASNIYOM, BENJAMA & MANEESRI, 2011). Portanto, em virtude da perecibilidade do produto, prolongar a vida útil tem sido o objetivo de diversos estudos com mexilhão (LIMA, 2010).

Os pigmentos que compõem a cor final do mexilhão também são dependentes da sua fase gametogênica. A presença de alguns pigmentos nos mexilhões é conhecida há mais de cem anos, como a clorofila, que pode existir nos órgãos, vísceras e gônadas de bivalves (LOUDA et al., 2008). Os carotenóides são pigmentos que prevalecem nas fêmeas, por isso a diferença de coloração em relação aos machos. A cor desses moluscos acaba sendo influenciada pelo seu metabolismo, seja para a reprodução (gametogênese) ou, após sua morte, por reações deteriorantes, decorrentes de ação microbiana (MARQUES, 1998).

A textura em mexilhões é uma propriedade importante para aceitação do produto pelo consumidor, embora hajam poucos estudos publicados sobre o assunto. No caso do mexilhão *Perna perna*, a textura da carne *in natura* apresenta-se como mole e aderida às paredes internas das valvas. Após o cozimento, que tem por consequência a abertura das valvas e desprendimento da carne das paredes, a textura do mexilhão torna-se endurecida. A quantidade de água presente no mexilhão é outro fator que determina a textura, em especial na dureza do produto.

A avaliação instrumental da textura é aplicada a diversos alimentos, e na avaliação de produtos cárneos, Huidobro et al. (2005) citam que o texturômetro é adequado para esta análise, uma vez que esse dispositivo é capaz de mensurar a resistência do tecido ao corte e à compressão. A análise instrumental deve ser baseada na força de

cisalhamento, capaz de oferecer uma resposta adequada à característica do produto, que possui consistência elástica e borrachenta. Cavalheiro et al. (2012) avaliaram a textura de mexilhões submetidos a diferentes tratamentos de cocção combinados com resfriamento a vácuo. Os autores utilizaram como parâmetro de resposta a medida de força de cisalhamento por uma célula de cisalhamento de Kramer (*Kramer shearcell* – KSC), um conjunto de 05 ou 10 lâminas que se move verticalmente por fendas de um suporte onde a amostra é colocada, e acoplada ao sistema (Texturômetro TAXT2). Essa probe é recomendada para produtos cuja configuração ou estrutura é variável, com perfil heterogêneo.

A textura dos mexilhões pode ser afetada por outros fatores, como o cozimento e o pH. Segundo Westphalen (2005), existe relação entre pH e a textura do produto, devido ao processo de gelatinização das proteínas miofibrilares, o que influencia de forma direta a textura de produtos cárneos cozidos. A estabilidade e desnaturação das proteínas podem ser afetadas pela concentração de sal, o que acarreta alterações nas características físico-químicas do produto (THORARINSDOTTIR et al., 2002).

## 1.2 Conservação do mexilhão

A qualidade dos moluscos bivalves depende do perfil microbiológico apresentado pelo produto ao longo da cadeia produtiva, desde o cultivo destes para processamento, até a comercialização do produto final. Desta forma, a qualidade global de mexilhões resulta de fatores biológicos (contagem microbiana, a ausência de micro-organismos patogênicos e vírus, a ausência de toxinas de algas, a ausência dos parasitas), químicos e das características sensoriais, que envolve desde o aspecto da casca até o produto final, que consiste no rendimento da carne, sua aparência e sabor típicos, além da ausência de componentes indesejáveis, como sujidades ou alterações em virtude de parasitismo ou má conservação do produto (VERNOCCHI et al., 2007).

O mexilhão deve ter características sensoriais e microbiológicas adequadas para consumo durante o seu prazo de validade. A contagem microbiana inicial elevada do mexilhão *in natura* é o primeiro obstáculo, pois as águas estuarinas do litoral brasileiro têm contaminação microbiana muito alta, principalmente por patógenos, e sabe-se que a condição sanitária da água de cultivo é um fator decisivo na qualidade do produto cru (FREITAS et al., 2006).

No Brasil, a eliminação da microbiota inicial do produto é dificultada, devido à ausência de tecnologia adequada das empresas processadoras de frutos do mar para tratar os seus produtos. Adicionalmente, as pessoas envolvidas na manipulação de frutos do mar são, em geral, da comunidade local, sem habilidade técnica para este trabalho. A consequência é um processo praticamente manual e com deficiências, que refletem na vida útil do produto, que acaba sendo reduzida. Em uma indústria da grande Florianópolis, amostras de mexilhão cozido e resfriado apresentaram vida útil reduzida (12 dias) em relação ao referenciado na embalagem (20 dias) devido à presença de *Vibrio* sp. e às contagens elevadas de psicrófilos e psicrotróficos, que levam à deterioração do produto. Neste estudo, constatou-se recontaminação microbiana no processo, envase inadequado por atmosfera modificada, o que comprometeu a função da mistura gasosa, além de problemas com a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (LIMA, 2010).

As operações de resfriamento e lavagem em pequenas indústrias envolvem o uso de um sistema estagnado, no entanto a contaminação cruzada pode levar a um aumento do nível de contaminação do produto durante o processamento (RODRIGO et al., 2005).

A exsudação ou perda de água é uma característica existente em produtos cárneos, e pode variar conforme o tipo de produto. No caso do mexilhão, o conteúdo majoritário é a água, que em conjunto com características de perecibilidade e elevada atividade de água ( $A_w$ ), propicia que o produto sofra exsudação da água para o interior de embalagens, conforme foi observado por Lima (2010), o que pode promover deterioração mais acelerada e a rejeição do produto pelo consumidor devido ao conteúdo de água acumulado dentro das embalagens (MCMILLIN, 2008). Em outros produtos cárneos, comercializados em bandejas, as almofadas com ação absorvente são comumente utilizadas para combater os problemas de exsudação (KERRY, O'GRADY & HOGAN, 2006).

As folhas ou almofadas absorventes são produzidas por muitas empresas, como a *Cryovac*® e *Dri-Loc*® (Sealed Air Corporation, EUA), *Thermarite*® e *Peaksorb* (Austrália), *Toppant* (Japão) e *Fresh-R-Pax*® (Maxwell Chase Technologies, LLC, EUA) para o controle líquido em alimentos com elevada atividade de água, como carne bovina e suína. Estes sistemas consistem em um polímero super absorvente localizado entre duas camadas de um polímero micro poroso ou não-tecido. Tais

folhas são usadas como almofadas absorventes colocadas em frangos inteiros ou em pedaços (SUPPAKUL et al., 2003).

Nas redes de supermercado brasileiras, observa-se que estas almofadas ficam no fundo das bandejas de isopor, e não são visíveis ao consumidor. No caso de embalagens flexíveis com o mexilhão cozido, a presença das almofadas comprometeria a aparência e não garantiria uma absorção homogênea da umidade dentro da embalagem, por isso a necessidade de se ter um produto final com menos exsudado.

### 1.3 Grupos alvo de micro-organismos em mexilhões

Os frutos do mar, como os mexilhões, possuem características microbiológicas de acordo com o seu *habitat*, bem como de acordo com as condições da água em que se desenvolvem. Os mexilhões podem filtrar até 30 L de água do mar por dia, constituída de matéria orgânica e inorgânica necessária para sua alimentação, e as partículas retidas na sua estrutura podem conter bactérias e vírus (GUILLON-COTTARD et al., 1998). Os moluscos, quando consumidos crus podem ser responsáveis por surtos de febre tifoide, hepatite e outras gastroenterites (OLIVEIRA et al., 2011).

O marisco fresco é caracterizado por uma vida útil relativamente curta, inferior a 7 dias e geralmente estão contaminados por bactérias aeróbias Gram-negativas (EMBORG et al., 2002).

Os micro-organismos presentes na microbiota do mexilhão são os deteriorantes e os patogênicos. Os micro-organismos deteriorantes são aqueles que causam deterioração no produto em virtude do seu metabolismo e possuem capacidade proteolítica, pectinolítica e lipolítica (KAI & RUIVO, 1988). A deterioração microbiana durante a distribuição e armazenamento dos alimentos é causada apenas por uma pequena fração de micro-organismos enquanto que nas etapas de coleta, processamento e manipulação a contaminação é maior e mais ampla (HUIS IN'T VELD, 1996).

Embora o consumo de frutos do mar não seja em grande proporção quando comparado aos demais produtos cárneos, estes produtos são responsáveis por uma série de surtos causados por bactérias patogênicas, algas marinhas tóxicas ou vírus, em países como os EUA. Isso se deve ao acúmulo de agentes patogênicos no produto durante a sua alimentação. A vigilância aponta gastroenterites, hepatites e diarreia como doenças transmitidas por frutos do mar, devido à presença de algumas espécies de

*Vibrio* sp. (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, e *V. cholerae*), que representam maior risco quando consumidos crus (HUSS, 2000).

As culturas microbianas presentes no mexilhão são mistas, e a predominância de um grupo ou outro depende das condições do alimento, como combinação de pH, temperatura e condições de atmosfera. Assim, as bactérias deteriorantes e/ou patogênicas que se desenvolvem dentro da faixa de pH típico do produto (6,5), em alguns casos, combinado com um meio mais ácido (com a presença de CO<sub>2</sub>) pode proporcionar condições ideais para que outro grupo venha a se desenvolver no armazenamento, como as bactérias ácido-lácticas. A presença deste grupo de micro-organismos origina-se do próprio alimento, e em condições favoráveis ocorre o seu crescimento. Assim o meio (o alimento) torna-se mais seletivo em relação ao crescimento de outros micro-organismos, que são inibidos devido à produção de uma ampla gama de metabólitos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (MATAMOROS et al., 2009; GRAM & DALGAARD, 2000).

Alguns micro-organismos patogênicos entéricos, como a *Shigella* spp., podem ser veiculadas pelos pescados, além da *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* (KAI & RUIVO, 1988).

As bactérias citadas na legislação Brasileira (RDC 12/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001)) por causar infecções alimentares, ligadas ao consumo de produtos de pescado são *Salmonella* sp, os coliformes termotolerantes a 45 °C, cujo maior percentual está ligado a *Escherichia coli* e ao *Vibrio parahaemolyticus*, este último próprio do ambiente marinho. 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<sup>3</sup>/g.

Os seguintes limites são previstos para moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados e não industrializados resfriados ou congelados.

- i) Coliformes a 45 °C/g: 5 x 10
- ii) Estafilococos coagulase positiva/g: 10<sup>3</sup>
- iii) *Salmonella* sp./25g: Ausência.

A Tabela 1.3 apresenta os padrões microbiológicos determinados pela legislação Brasileira para moluscos.

O *Codex Alimentarius*, através da CAC-RCP 52 (2003), determina que tanto para a água de cultivo quanto para os moluscos frescos, um

indicador de contaminação microbiana é necessário, e o mais indicado é a *E. coli* ou coliformes termotolerantes e coliformes a 35 °C (totais) para detectar a presença de contaminação fecal.

A Agência de Proteção à Saúde - *Health Protection Agency* (2009) demonstra como a legislação internacional procede em relação aos limites de contagens microbiológicas para os produtos prontos para consumo comercializados, expressos em CFU/g:

- i) *Bacillus cereus*:  $<10^3$
- ii) Outros *Bacillus* spp. Patogênicos (grupo *B. subtilis*):  $<10^3$
- iii) *Clostridium perfringens*:  $<10$
- iv) *Listeria monocytogenes*:  $<10$ ; não detectável em 25 g para alimentos com potencial de desenvolver o micro-organismo.
- v) *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos coagulase-positivos:  $<20$
- vi) *Vibrio parahaemolyticus*:  $<20$

Os limites de contagem microbianas estabelecidas pela legislação Brasileira diferem da legislação Internacional. Segundo Huss (2000) a Legislação espanhola, através do Boletín Oficial del Estado (BOE) – na Espanha - nº 308/1993, estabelecem limites microbiológicos para bivalves em função dos coliformes fecais de  $<300/100\text{g}$ ; *E. coli*  $<230/100\text{g}$  e ausência de *Salmonella* spp em 25 g. As normas da legislação Europeia que controlam a qualidade sanitária da produção comercial de moluscos bivalves, estabelece o padrão para o produto final de  $3 \times 10^2$  coliformes fecais/100 g de bivalves (frescos e líquido intravalvular) para bivalves vivos comercializados no mercado (CAMPOS & CACHOLA, 2007).

Tabela 1.3 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.	Estafil. Coag. Positiva/g	5 x 10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
		<i>Salmonella sp</i> /25 g	Aus.	----
	Moluscos bivalves, cozidos, temperados e não, industrializados resfriados ou congelados.	Coliformes a 45 °C/g	10	5x10
		Estafil. Coag. Positiva/g	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
		<i>Salmonella sp</i> /25 g	Aus.	----
		Moluscos secos e ou salgados.	Coliformes a 45 °C/g	10
	Semi conservas de moluscos mantidas sob refrigeração (marinados, anchovados ou temperados).		Estafil. Coag. Positiva/g	10 <sup>2</sup>
			<i>Salmonella sp</i> /25 g	Aus.
	Pescado defumado, moluscos e crustáceos, refrigerados ou congelados.		Coliformes a 45 °C/g	10
		Produtos derivados de pescado (surimi e similares), refrigerados ou congelados.	Estafil. Coag. Positiva/g	10 <sup>2</sup>
			<i>Salmonella sp</i> /25 g	Aus.
		Pratos prontos para o consumo (Alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares)	A base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc).	Coliformes a 45 °C/g
Estafil. Coag. Positiva/g	10 <sup>2</sup>			5x10 <sup>3</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (específico para produtos de à base de pescados)	<i>Salmonella sp</i> /25 g		10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>3</sup>
	Aus.		Aus.	----

### **1.3.1 Contagem total de aeróbios mesófilos**

A contagem padrão em placa ou contagem de aeróbios mesófilos em um produto alimentício reflete a qualidade da matéria-prima, bem como as condições de armazenamento e estocagem, permitindo estimar a vida útil do alimento em questão (JAY, 2005).

Esse tipo de contagem encontrado é um dos indicadores microbiológicos mais comumente utilizados, para descrever se a limpeza, desinfecção e o controle da temperatura durante o tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Outra utilidade é a informação obtida a respeito da alteração incipiente nos alimentos, como desvios de temperatura na refrigeração ou controle no descongelamento de alimentos (ICMSF, 1980).

Outro aspecto interessante da contagem total é permitir detectar a deterioração quando ainda não é possível identificá-la por testes químicos nem pelas características organolépticas do produto. Quando o alimento apresenta uma microbiota elevada, caracterizada como uma cultura mista, entre as quais não apresenta somente patogênicos, mas micro-organismos deteriorantes ou inofensivos em relação a riscos de saúde e à capacidade de promover formação de odores indesejáveis (MOHAN et al., 2010).

A contagem total de aeróbios mesófilos em mexilhões e vieiras indica a qualidade microbiológica dos frutos do mar e das águas circundantes, bem como a higiene durante a lavagem e processamento. Um valor elevado de contagem aeróbia que seja maior que  $10^5$  ou  $\log 10^5$  UFC/g, pode indicar um perigo potencial para a saúde dos consumidores. Desta forma, o uso da contagem total em placas aliada à contagem de psicrotróficos pode ser usado para estimar a vida útil microbiana de frutos do mar, visto que este último grupo é o principal contribuinte para a deterioração de frutos do mar sob temperaturas de refrigeração (KHAN et al., 2005).

### **1.3.2 Micro-organismos psicrotróficos e psicrófilos**

Os psicrotróficos são organismos capazes de crescer em temperaturas entre  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  e produzem colônias visíveis (ou turbidez) no período de 7 a 10 dias. A amplitude de temperatura dos psicrotróficos é de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com a temperatura ótima acima dos  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (BAPTISTA & VENÂNCIO, 2003). Desta forma, os micro-organismos que causam a



deterioração de carnes, aves e vegetais no intervalo de 0 °C a 5 °C deveriam ser considerados psicrotróficos (JAY, 2005). A contagem desses micro-organismos avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados (FRANCO, 2003).

As espécies e linhagens que podem crescer abaixo de 7 °C são amplamente distribuídas entre os gêneros de bactérias Gram-negativas e menos entre as Gram-positivas. As principais bactérias desses gêneros produzem alterações em carne, ovos e outros alimentos conservados em temperaturas de refrigeração. O desenvolvimento das bactérias nas temperaturas de refrigeradores domésticos (4,4 °C) é lento.

Os psicrotróficos presentes no pescado e frutos do mar são provenientes do ambiente de cultivo, em especial das águas temperadas. Entre os psicrotróficos, as *Pseudomonas* e *Shewanella* dominam a microbiota do alimento depois de uma a duas semanas de armazenamento (SIVERTSVIK et al., 2002).

Os psicrófilos são definidos como micro-organismos adaptados ao frio que se desenvolvem entre 0°C e 20 °C, com temperatura ótima de crescimento entre 10 e 15 °C (FRANCO & LANDGRAF, 2005; FRANÇA FILHO et al. 2006). E, possuem uma amplitude de temperatura de crescimento de -8 °C a 25 °C (BAPTISTA & VENÂNCIO, 2003).

Os psicrófilos mais conhecidos são capazes de se adaptar e se desenvolver a temperaturas próximas a 0°C, mas têm o seu crescimento ótimo entre 25 e 35°C, o que os aproxima dos mesófilos (FRANÇA FILHO et al. 2006).

### 1.3.3 *Vibrio* sp.

*Vibrio* sp. tem seu *habitat* principal em águas estuarinas, frutos do mar e peixes (TYAGI et al., 2009). Normalmente, este patógeno é eliminado durante o cozimento e sua presença em alimentos cozidos pode ser causada por recontaminação do produto. Para evitar riscos e garantir a qualidade do produto, é importante implementar Boas Práticas de Fabricação (BPF), juntamente com o controle de água de processo e água do cultivo.

As diversas espécies de *Vibrio* sp. estão distribuídas no ambiente marinho, e alguns desses micro-organismos são patogênicos ao homem. O gênero inclui pelo menos 12 espécies patogênicas ao homem, das quais 10 podem transmitir doenças por sua contaminação em alimentos (LIMA DOS SANTOS & VIEIRA, 2013). Destas espécies, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* são responsáveis pela

maioria das infecções alimentares causadas por este grupo, como surtos de enterite infecciosa, quando absorvido em grandes números. Bactérias no gênero *Enterococci* são apontadas como indicadoras mais apropriadas que *Escherichia coli* sobre o risco de consumo de mexilhões com *Vibrio* sp. (TYAGI et al., 2009; MARINO et al., 2005).

As espécies *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* foram isolados em casos de gastroenterite causada por alimentos contaminados (ambas as espécies) e água contaminada (o último). *V. vulnificus* é observado principalmente em infecções extra-intestinais (septicemia, feridas, etc.) septicemia primária causada por *V. vulnificus* é geralmente associado com o consumo de frutos do mar, especialmente os bivalves crus (LIMA DOS SANTOS & VIEIRA, 2013).

*Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria Gram-negativa halofílica e que se apresenta na forma de bastonetes curtos. É anaeróbio facultativo e seu crescimento ocorre melhor em pH alcalino entre 7,5 e 8,5 e a temperatura ótima entre 35 e 37 °C, além de se desenvolver em ambientes com presença de sal (VIEIRA, 2003). O nome *Vibrio parahaemolyticus* significa “*Vibrio* que dissolve o sangue” e este não é isolado na ausência de NaCl (2 a 3 %) (FORSYTHE, 2002).

Os sintomas comumente descritos e associados com infecções causadas por *Vibrio parahaemolyticus* são: diarreia, náusea, vômito, cefaleia, febre e calafrios. Os surtos registrados indicam que a causa é o consumo de alimentos de origem marinha crua ou inadequadamente cozidos, ou cozidos e recontaminados (LEE et al., 2008). As infecções por esse micro-organismo são mais frequentes nos meses de verão, período com maior distribuição quantitativa no ambiente marinho (ARCHER & MORETTO, 1994).

Uma das espécies mais comuns isoladas a partir de mexilhão e água do mar é o *Vibrio alginolyticus*, que faz parte do *habitat* marinho normal durante períodos quentes e pode atingir concentrações suficientes para causar doenças em seres humanos, como infecções, formação de feridas e otite interna e externa, além de infecção gastrointestinal, embora sua ação como patógeno entérico não seja clara (RIPABELLI et al., 2003). A infecção vinculada ao consumo de frutos do mar nunca foi relacionada a esse micro-organismo (LHAFI & KÜHNE, 2007). A ocorrência de *Vibrio alginolyticus* não é significativa em espécies específicas de pescado marinho analisadas como camarões ou moluscos bivalves (JAKSIC et al., 2002).

O isolamento de qualquer espécie de *Vibrio* sp. a partir de

alimentos cozidos indica práticas de higiene inapropriadas, já que essa classe de micro-organismo é rapidamente destruído pelo calor (FORSYTHE, 2002).

A preocupação em eliminar a contaminação de alimentos por *Vibrio parahaemolyticus* está no aumento dos casos de infecção. No Brasil, outros estudos já detectaram esse micro-organismo em amostras oriundas de ambientes diversos, e por isso, é essencial o monitoramento do ambiente de origem, no pescado e também da incidência desse micro-organismo em exames clínicos, para facilitar o diagnóstico e assim obter dados mais precisos a cerca de contaminações alimentares por *Vibrio parahaemolyticus* (ROJAS et al., 2011).

### 1.3.4 Bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

As bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S estão presentes naturalmente em pescado de água marinha (salmão, bacalhau) e frutos do mar (camarão, caranguejo), cujo número muitas vezes está relacionado com a vida útil desses produtos (HOZBOR et al., 2006). Esse grupo faz parte das bactérias específicas deteriorantes para os produtos oriundos de águas temperadas e tropicais, dispostas na forma fresca e armazenada aerobicamente sob refrigeração (GRAM & HUSS, 1996; KOUTSOUMANIS & NYCHAS, 1999).

A produção de H<sub>2</sub>S por esse grupo de bactérias acarretam processos de deterioração e produção de pigmentos, descolorindo as carnes tornando-as esverdeadas, onde H<sub>2</sub>S reage com a mioglobina para formar sulfitemioglobina. Esse efeito é observado em produtos cárneos armazenados entre 1-5 °C, sob envase a vácuo ou atmosfera modificada sem oxigênio e não costumam ocorrer em pH abaixo de 6,0 (JAY, 2005). Odores intensos e desagradáveis também são produzidos em virtude da redução de N-óxido de trimetilamina para trimetilamina, além da produção de H<sub>2</sub>S (DALGAARD, 1995). Alguns trabalhos identificaram como bactérias desse grupo: *Pseudomonas mefitica*; *S. Putrefaciens*; *Lactobacillus sake* e *Shewanella putrefaciens* (JAY, 2005; HOZBOR et al., 2006).

Algumas condições são capazes de inativar ou inibir o crescimento das bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S, como o processo de cocção em camarão (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006); e a presença de CO<sub>2</sub> em sistemas de atmosfera modificada pode inibir fortemente o crescimento de bactérias específicas deteriorantes desse grupo (como *S. Putrefaciens*), porém muitas das misturas gasosas testadas em um estudo com aplicação

de atmosfera modificada em bacalhau não inibiu todo o crescimento (GRAM et al., 1987). Combinação de baixo pH com armazenamento a baixas temperaturas pareceu explicar a ausência de bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S em bacalhau envasado com atmosfera modificada (SIVERTSVIK, 2007). Mohan et al. (2010) reduziram o crescimento de bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S em peixe da família cavala, utilizando absorvedores de oxigênio e acetato de sódio como antimicrobiano a 2 °C.

#### 1.4 Acondicionamento sob atmosfera modificada

O aumento da vida útil de alimentos processados através do controle dos processos deteriorativos é um dos mais importantes objetivos da indústria. Para tal, as alterações de natureza bioquímica e microbiológica devem ser consideradas para a manutenção da vida útil, que é condicionada por oxidação decorrentes da temperatura, exposição ao oxigênio, luz e crescimento microbiano (LUCIANO et al., 2009).

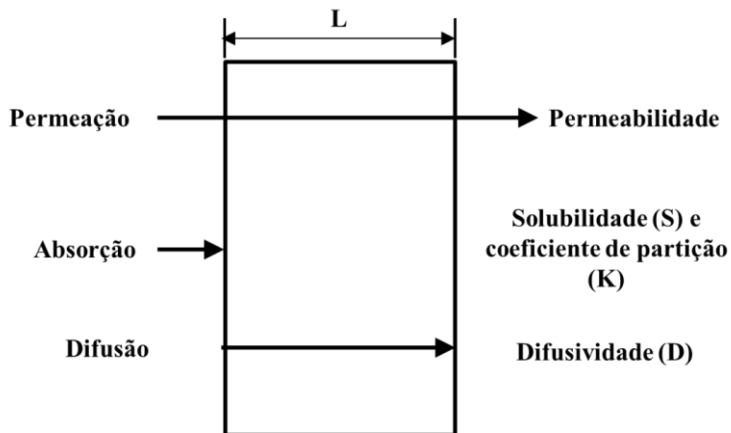
O processo de embalagem sob atmosfera modificada (MAP) é um sistema para acondicionamento do alimento através da remoção ou alteração da composição normal do ar atmosférico por uma mistura gasosa adequada capaz de aumentar a sua vida útil (SØRHEIM et al., 1999). A conservação de carne fresca oriunda de diferentes matérias-primas, acondicionada sob atmosfera modificada, apesar de possuir uma composição ótima para cada produto, necessita de materiais que ofereçam barreira à permeação de gases e contra a umidade, a fim de manter constante a atmosfera no *headspace* da embalagem (VENTURINI; CONTRERAS-CASTILLO & FARIA, 2009).

Entre as vantagens do uso da atmosfera modificada nesses produtos e particularmente em produtos de pescado refrigerado, está o aumento da sua vida útil e utilização de embalagens de aparência mais atraente ao consumidor e inodora pelo fato da embalagem transparente não entrar em contato direto com o conteúdo e possuir uma manipulação e rotulagem facilitadas (CANN, 2001).

Os fenômenos de transferência de massa típicos em sistema de embalagens de alimentos são a absorção, a permeação e a difusão, conforme mostrados na Figura 1.8. A permeação é o fenômeno de transferência de massa que ocorre quando uma molécula ultrapassa através de uma membrana de material ou a partir de uma região de elevada concentração para uma área de baixa concentração. A difusão é o movimento de moléculas no interior de um material provocada por uma

diferença de concentração. Absorção é a sorção das moléculas da superfície a partir do ambiente para o material. Os coeficientes de transferência de permeação, difusão e absorção são a permeabilidade ( $P$ ), a difusividade ( $D$ ), e a solubilidade ( $S$ ), no caso de um gás, ou o coeficiente de partição ( $K$ ) para um soluto, respectivamente.

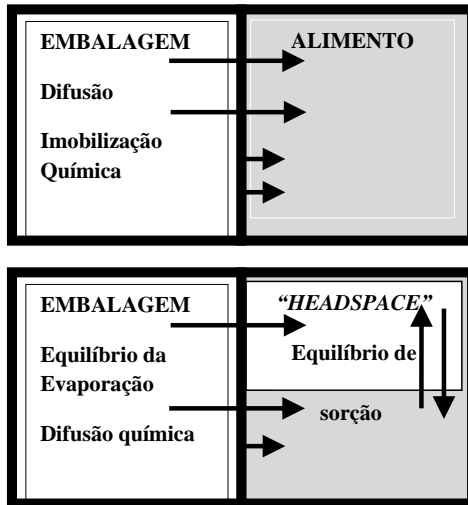
Figura 1.8 - Fenômenos de transferência de massa e as características dos seus coeficientes.



Fonte: Adaptado de Han; Ion (2005).

Em termos de constituintes, os sistemas de embalagem em alimentos podem ser representados como um sistema “embalagem-alimento” ou um sistema “embalagem-*headspace*-alimento” conforme mostra a Figura 1.9.

Figura 1.9 - Sistemas de envase para alimentos e comportamento relativo de substâncias ativas.



Fonte: Adaptado de Han (2000).

O sistema embalagem-alimento consiste do acondicionamento de alimentos sólidos em contato direto com o material da embalagem; ou ainda líquidos de baixa viscosidade ou alimentos líquidos sem *headspace*, embalados individualmente, como “prontos para consumo” ou carnes a vácuo. Os principais fenômenos de migração envolvidos neste caso são a difusão entre o material da embalagem e os alimentos, na interface (HAN, 2000).

O outro sistema compreende a interação entre embalagem, *headspace* e o alimento, que é representado por alimentos acondicionados em embalagens flexíveis, copos e caixas. Nesse caso, ocorre uma evaporação ou distribuição equilibrada de uma substância entre a embalagem, o *headspace* e os alimentos. Substâncias voláteis ativas (como os gases) podem ser utilizados, tendo em vista a sua capacidade de migração entre esses elementos, ou ainda para manipular as condições de permeabilidade e de reação das substâncias com o alimento e a embalagem, conforme os requisitos de cada produto para sua conservação (QUINTAVALLA & VICINI, 2002; HAN, 2000).

O acondicionamento dos produtos cárneos em atmosfera modificada tem sido realizado em bandejas envoltas por filmes permeáveis ao ar no interior de embalagens tipo “*masterpack*”, filmes encolhíveis e com baixa permeabilidade ao O<sub>2</sub> para aplicação de vácuo ou embalagens adequadas para reter o CO<sub>2</sub> e o N<sub>2</sub> (MCMILLIN, 2008).

A atmosfera modificada consiste em uma etapa após a retirada do ar atmosférico, onde ocorre a injeção de uma mistura gasosa, composta por O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. O resultado é o aumento significativo da vida útil de produtos frescos e curados, reduzindo perdas por deterioração precoce (MCMILLIN, 2008).

A atmosfera modificada tem efeito nos produtos de pescado por inibir as reações de oxidação e o crescimento bacteriano. O aumento da vida útil vai depender da espécie e também de alguns fatores, como o conteúdo de gordura, a população microbiana inicial, a mistura de gás, a relação gás/produto e a temperatura de armazenamento (CAGLAK et al, 2008).

Goulas et al., (2005) determinaram as mudanças microbiológicas, bioquímicas e sensoriais de mexilhões vivos (*Mytilus galloprovincialis*) durante armazenamento sobre condições aeróbias, a vácuo e com atmosfera modificada para determinar a vida útil do produto, com o mesmo tipo de embalagem. Os resultados microbiológicos e físico-químicos indicaram que a atmosfera modificada pode ser usada para aumentar a vida útil de mexilhões resfriados com casca, aumentada para 5 a 6 dias a 4 °C.

Caglak, Cakli & Kilinc (2008) acondicionaram mexilhões *in natura* sob vácuo e com diferentes proporções de gases sob atmosfera modificada e armazenaram o produto a 2 °C. A qualidade foi avaliada através das contagens microbiológicas, análises químicas e sensoriais. Obtiveram os melhores resultados para a mistura de (80 % CO<sub>2</sub>/ 20 % N<sub>2</sub>), com vida útil de até 8 dias.

Bernárdez & Pastoriza (2011) investigaram a aplicação de atmosfera modificada em mexilhões vivos (*Mytilus galloprovincialis*) de diferentes tamanhos, em diferentes concentrações de oxigênio (20, 75 e 85%) e avaliaram a influência da proporção gasosa na mortalidade e na qualidade de produto embalado. Os autores encontraram maior estabilidade do produto acondicionado em concentrações mais elevadas de O<sub>2</sub> e a baixas temperaturas, o que reduz o metabolismo do mexilhão vivo.

O envase de produtos cárneos pré-cozidos em atmosfera modificada é comum no oeste da Europa, contudo são raros os estudos

que mostram como ocorrem os mecanismos de solubilidade e de difusão de CO<sub>2</sub> nos alimentos (SIVERTSVIK & JENSEN, 2005).

Os estudos na preservação de moluscos cozidos com a atmosfera modificada ainda são restritos, em especial com mexilhões, de forma mais informações sobre os mecanismos de atuação do CO<sub>2</sub> são necessários.

#### 1.4.1 Gases utilizados na atmosfera modificada

Os produtos cárneos exigem uma embalagem com barreira à umidade e à permeabilidade de gás para manter as condições constantes durante o armazenamento. As misturas gasosas normalmente utilizadas para acondicionar alimentos sob atmosfera modificada são compostas por CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, mas outros gases não tóxicos também podem ser usados (MCMILLIN, 2008).

O dióxido de carbono é o gás com maior importância em sistemas de atmosfera modificada, uma vez que não é tóxico e possui efeito bacteriostático. Quanto maior a concentração de CO<sub>2</sub>, mais baixa é a respiração de micro-organismos e sua velocidade de crescimento. Em relação à ação bacteriostática do CO<sub>2</sub> sobre os micro-organismos, esta ainda não está totalmente esclarecida, porém, a teoria amplamente aceita é de que a dissolução do CO<sub>2</sub> modifica o pH do alimento, o que inibe o micro-organismo de sua taxa de crescimento ótimo, e com isso, diminui a frequência respiratória (SIMPSON, ACEVEDO & ALMONACID, 2009).

O oxigênio preserva a cor vermelha em carne e sustenta a respiração dos produtos frescos. Porém, este gás é responsável pelas reações de oxidação dos lipídios, rancidez, perda de gosto e sabor e descoloração de alimentos, além de possibilitar o crescimento de micro-organismos aeróbios, nos quais grande parte exerce ação deteriorante e em conjunto com outras reações químicas, viabiliza a deterioração. A remoção do oxigênio do *headspace* é essencial para manter o produto fresco por um período maior. Por outro lado, deve permanecer na proporção suficiente a fim de evitar o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios (MCMILLIN, 2008; NOVAK et al., 2003).

O nitrogênio é um gás inerte e não reativo com pigmentos a base de carne (MCMILLIN, 2008). É moderadamente solúvel em água e gordura e não exerce efeito intrínseco sobre os micro-organismos. O principal motivo para o seu uso é possibilitar o deslocamento do oxigênio, atuando como um gás inerte resultando em redução de reações oxidativas



e inibição de micro-organismos aeróbios. O seu uso também é atribuído por ser um “gás de enchimento”, que fisicamente protege os alimentos na prevenção de colapso da embalagem (NOVAK et al., 2003).

### 1.5 Solubilidade do CO<sub>2</sub> em produtos que não respiram

A solubilização de gases em alimentos ocorre comumente por difusão, que consiste em um processo pelo qual a matéria é transportada a partir de uma parte do sistema para outro, resultante de movimentos moleculares aleatórios (CRANK, 1975). A respeito de convecção em alimentos nos sistemas de atmosfera modificada não há muita informação, pois a resistência à convecção é insignificante quando comparado com a difusão molecular nos alimentos (SIMPSON, ACEVEDO & ALMONACID, 2009).

Aplicando este conceito para alimentos, a difusão em uma matriz sólida é mais complexa do que a difusão em um líquido ou um gás, pois a difusão do CO<sub>2</sub> na matriz sólida é na verdade aparente, uma vez que o CO<sub>2</sub> difunde apenas através do líquido dentro da matriz ou da fase gasosa em um sólido. A absorção de CO<sub>2</sub> pode ser representada pela variação da massa no meio gasoso como função da variação de pressão (em embalagens rígidas) e como variação do volume (embalagens flexíveis), conforme descrito pelas Equações (1.1 e 1.2) (SIMPSON, ACEVEDO & ALMONACID, 2009).

$$\frac{dn_{CO_2}}{dt} = \frac{V_0}{RT} \frac{dP_{CO_2}}{dt} \quad (1.1)$$

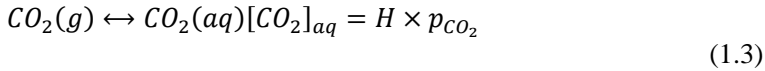
$$\frac{dn_{CO_2}}{dt} = \frac{P_0}{RT} \frac{dv_{CO_2}}{dt} \quad (1.2)$$

onde:

$V_0$  é o volume da fase gasosa (m<sup>3</sup>),  $v$  é o volume parcial de CO<sub>2</sub> (m<sup>3</sup>),  $p$  é pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Pa),  $R$  é a constante universal dos gases (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) e  $T$  é a temperatura (K),  $n$  é o número de mols de CO<sub>2</sub> e  $t$  é o tempo (s).

Quando se trata da solubilidade do CO<sub>2</sub> em alimentos com elevado teor de água, o CO<sub>2</sub> pode dissolver-se na água para formar ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que se dissocia em bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato

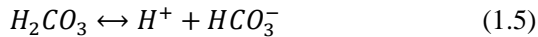
( $CO_3^{2-}$ ) e hidrogênio ( $H^+$ ) de acordo com os seguintes mecanismos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007):



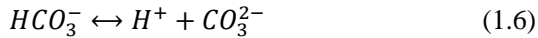
Com  $H = 3,3 \times 10^{-2} \text{ mol.} \cdot (\text{L atm})^{-1}$  (25 °C)



$$\frac{[H_2CO_3]}{[CO_2]_{aq}} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ mol.} \cdot L^{-1} \quad (25 \text{ }^\circ\text{C})$$



$$\frac{[HCO_3^-][H^+]}{[H_2CO_3]_{aq}} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.} \cdot L^{-1} \quad (25 \text{ }^\circ\text{C})$$



$$\frac{[CO_3^{2-}][H^+]}{[HCO_3^-]} = 5,61 \times 10^{-11} \text{ mol.} \cdot L^{-1} \quad (25 \text{ }^\circ\text{C})$$

Onde as notações (g) e (aq) referem-se ao estado das espécies, gás e líquido, respectivamente. Em condições atmosféricas normais, a concentração de dióxido de carbono dissolvido (não hidratado),  $CO_2$  (aq), pode ser relacionado com a pressão externa parcial de  $CO_2$  ( $p_{CO_2}$ ) e pela constante de Henry (H).

Em um sistema binário (ar-água), quando um soluto é introduzido, este se distribui entre as duas fases, procurando restabelecer o equilíbrio termodinâmico. No caso de alimentos, ocorre a introdução de  $CO_2$  em um sistema gás (*headspace* da embalagem-água e/ou lipídios contidos no alimento). Esse fenômeno de distribuição foi modelado utilizando a Lei de Henry, que na teoria da Termodinâmica moderna é documentada na literatura por sua determinação experimental e sua significância em ar-água (NIRMALAKHANDAN, BRENNAN & SPEECE; 1997).

Em essência, H (constante de Henry) pode ser considerado como a razão da concentração em fase gasosa do soluto para a concentração da fase líquida. O conceito básico de partição tem sido definido e interpretado pela ciência e engenharia de formas diferentes, algumas vezes gerando certa discussão (NIRMALAKHANDAN, BRENNAN & SPEECE; 1997).

A Lei de Henry aplica-se somente quando a concentração do soluto e a sua pressão parcial são baixas, isto é, quando o gás e sua solução são essencialmente ideais, e quando o soluto não interage fortemente de nenhuma maneira com o solvente. De acordo com essa lei, um aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> no *headspace* deve refletir mais CO<sub>2</sub> dissolvido no produto (ROTABAKK et al., 2007). No caso da quantidade absorvida de CO<sub>2</sub> em um produto no equilíbrio, o sistema é resolvido através de um balanço com a atmosfera ambiente, de acordo com a Lei de Henry, conforme mostrada pela Equação 1.8 (ROTABAKK et al., 2010).

$$P_{CO_2}^{t=\infty} = H_{CO_2,f} \times C_{CO_2}^{t=\infty} \quad (1.7)$$

Onde:

$P_{CO_2}^{t=\infty}$  é a pressão parcial do CO<sub>2</sub> no equilíbrio, pertencente ao produto (Pa);

$H_{CO_2}$  é a constante de Henry para CO<sub>2</sub>, dependente da temperatura (Pa. (mg kg<sup>-1</sup>));

$C_{CO_2}^{t=\infty}$  é a concentração de equilíbrio de CO<sub>2</sub> no produto (mg. kg<sup>-1</sup>).

O inverso da constante de Henry fornece, em geral, uma boa estimativa da solubilidade (S) do par soluto-solvente para o mesmo sistema e sabe-se que a solubilidade de gases é dependente da temperatura. As relações entre as constantes de Henry dos gases N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em água,  $H_{N_2} / H_{CO_2} \cong 60$  e dos gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em água,  $H_{O_2} / H_{CO_2} \cong 30$ , confirmam a consideração da dissolução de CO<sub>2</sub> como fenômeno predominante (ROTABAKK et al., 2008).

Rotabakk et al. (2010), em estudo com filés de frango, encontraram uma boa estimativa da constante de Henry no alimento segundo a Equação 1.8. A estimativa considera que o CO<sub>2</sub> dissolve

exclusivamente na fase aquosa do alimento (78% de água), não podendo ser utilizada para alimentos gordurosos.

$$H_{CO_2,p} = \frac{H_{CO_2,H_2O}}{X_w} \quad (1.8)$$

onde:  $X_w$  é fração de água no alimento,  $H_{CO_2,p}$  e  $H_{CO_2,H_2O}$  são as constantes de Henry do  $CO_2$  no produto (alimento) e na água, respectivamente.

Outra condição que satisfaz a Lei de Henry é quando a atividade termodinâmica do componente de interesse é diretamente proporcional à sua concentração molar numa dada fase (BEATTIE, 1993).

Carroll, Slusky & Mather (1991) pesquisaram as restrições da aplicação da Lei de Henry para a solubilidade do  $CO_2$  em água na literatura para alimentos. Com base nesses dados, os autores propuseram um modelo baseado na Lei de Henry que correlaciona dados para pressão (abaixo de 1 MPa). Os autores consideram a igualdade das fugacidades entre solvente e soluto, com algumas simplificações. Assume-se que os coeficientes de atividade para o solvente e para o soluto são iguais e a correlação de Poynting é desprezível. A fração de solvente e soluto são expressos respectivamente como:

$$x_1 P_1^\circ = y_1 \widehat{\varphi}_1 P \quad (1.9)$$

$$x_2 H_{21} = y_2 \widehat{\varphi}_2 P \quad (1.10)$$

Onde  $x_i$  é a fração molar do componente  $i$  na fase líquida,  $y_i$  é a fração molar do componente  $i$  na fase vapor,  $P_1^\circ$  é a pressão de vapor do solvente puro,  $H_{21}$  é a constante de Henry,  $\widehat{\varphi}_1$  é o coeficiente de fugacidade do componente  $i$  na mistura onde o componente 1 é água e o 2 é o dióxido de carbono e  $P$  é a pressão total. O produto ( $y_2 \cdot P$ ) é a pressão parcial do  $CO_2$ . A Tabela 1.4 apresenta as constantes de Henry do  $CO_2$  reportadas pela literatura para alimentos que não respiram.

Tabela 1.4 Constantes de Henry do CO<sub>2</sub> para alimentos que não respiram.  
Fonte: Adaptado de Cabral (2011).

<b>Produto</b>	<b>H (Pa.PPM<sup>-1</sup>)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Lipídios (%)</b>	<b>Referência</b>
Filé de frango	42,8 ± 3,7	2	78	*	Rotabakk et al. (2010)
Presunto	64,9 ± 6,5	4	72,3	5,7	Sivertsvik et al. (2005)
Atum	46,3 ± 2,7	0	74	0,2	Sivertsvik et al. (2004b)
Peixe Lobo	48,9 ± 3,7	0	77,6	2,5	Sivertsvik et al. (2004b)
Pescada	29	0	*	*	Simpson et al. (2001)
Carne ovina	44,5	2	*	*	Gill (1988)
Ostra	30,34	0	73	2	Soares (2013)
Queijo Minas Frescal	53,4	4	54,21	22,20	Cabral (2011)

Neste caso, a pressão é limitada até a faixa de 1 MPa porque o modelo despreza a não idealidade na fase líquida e à pressões mais elevadas, os coeficientes de atividade e também a correlação de Poynting não podem ser negligenciados devido à elevação da solubilidade do CO<sub>2</sub>. A 1 MPa, o erro é de 1 %, porém acima deste valor resulta em erro significante.

O coeficiente de fugacidade para um componente na mistura gasosa pode ser calculado por equações de estado, como van der Waals, Equação do Virial, Soave-Redlich-Kwong e Peng-Robinson (SMITH, VAN NESS & ABOIT, 2005). As equações de estado são descritas abaixo:

A equação de estado de van der Waals é proposta a partir da equação de gás ideal,

$$PV = RT \quad (1.11)$$

Onde: P e T são, respectivamente, pressão e temperatura absolutas e V é o volume molar, enquanto R é a constante universal dos gases cujo valor depende do sistema de unidades usado.

A equação de gás ideal tem duas restrições: as moléculas do gás são pontuais e não existe interação entre elas. van der Waals retirou essas restrições, considerando que as moléculas têm volume e que entre elas existe interação atrativa, chegando à equação empírica apresentada abaixo (1.12):

$$\left(P + \frac{a}{V^2}\right)(V - b) = RT \quad (1.12)$$

Onde: o parâmetro “a” reflete as interações intermoleculares enquanto b está associado ao volume molecular. Se estes parâmetros forem nulos, a equação de van der Waals se reduz à equação dos gases ideais.

O cálculo de a e b partem de duas equações e duas incógnitas. No ponto crítico, a isoterma P versus V tem um ponto de inflexão. Neste ponto as duas derivadas da isoterma se anulam, resultando:

$$a = \frac{27(RT_c)^2}{64P_c} \quad (1.13)$$

$$b = \frac{RT_c}{8P_c} \quad (1.14)$$

As variáveis reduzidas são:

$$\frac{P}{P_c} = P_r; \quad \frac{V}{V_c} = V_r; \quad \frac{T}{T_c} = T_r; \quad (1.15)$$

Assim, obtém-se a forma reduzida da equação de van der Waals:

$$\left(P_r + \frac{3}{V_r^2}\right)\left(V_r - \frac{8T_r}{3}\right) \quad (1.16)$$

Onde  $P_r$  é a pressão reduzida,  $V_r$  o volume reduzido e  $T_r$  a temperatura reduzida. A equação de van der Waals nesta forma independe dos valores de a e b sendo invariante para todos os fluidos.

A temperatura e a pressão são facilmente explicitáveis, de forma que a equação se apresenta da seguinte forma quando se explicita V:

$$\left(V_r^3 - \frac{1}{3}\right)\left(1 + \frac{8T_r}{P_r}\right)V_r^2 + \frac{3}{P_r}V_r - \frac{1}{P_r} = 0 \quad (1.17)$$

Esta é uma equação cúbica. As equações cúbicas podem ter três raízes reais ou uma raiz real e duas raízes complexas conjugadas ou ainda três iguais no ponto crítico. Quando  $T_r > 1$ , esta equação tem apenas uma raiz real, enquanto para  $T_r < 1$ , o número de raízes reais é três.

A equação de van der Waals iniciou as equações de estado cúbicas conhecida como família de van der Waals: van der Waals (1873); Clausius (1880); Berthelot (1899); Redlich-Kwong (1949); Wilson (1964); Borner (1966); Soave (1972); Lee-Erbar-Edmister (1973); Peng-Robinson (1976); Schmitdt-Wenzel (1980); Harmens-Knapp (1980), etc.

A equação do Virial é dada por uma série da forma:

$$\frac{PV}{RT} = 1 + \frac{B(T)}{V} + \frac{C(T)}{V^2} + \frac{D(T)}{V^3} + \dots \quad (1.18)$$

Onde: B(T), C(T) e D(T) são, respectivamente, o segundo, o terceiro e o quarto coeficiente do virial, e dependem da temperatura do sistema.

A equação do virial é aplicada somente para previsão das propriedades na fase vapor e se truncada no segundo termo (mais usual) pode ser utilizada para pressões baixas e moderada ( $P \leq 1,01$  MPa):

$$\frac{PV}{RT} = 1 + \frac{B(T)}{V} \quad (1.19)$$

A equação do virial possui uma forma generalizada, que permite que os parâmetros ajustáveis sejam calculados através das propriedades críticas das substâncias, sendo representada por:

$$Z = 1 + \frac{BP}{RT} = 1 + \left(\frac{BP_c}{RT_c}\right) \frac{P_r}{T_r} \quad (1.20)$$

$$\left(\frac{BP_c}{RT_c}\right) = B^0 + \omega B^1 \quad (1.21)$$

$$B^0 = 0,083 - \frac{0,422}{T_r^{1,6}} \quad (1.22)$$

$$B^1 = 0,139 - \frac{0,172}{T_r^{4,2}} \quad (1.23)$$

$$\frac{T}{T_c} = T_r; \quad (1.24)$$

$$\frac{P}{P_c} = P_r; \quad (1.25)$$

Onde:  $Z$  é o fator de compressibilidade,  $P_r$  e  $T_r$  correspondem à pressão e temperatura reduzidas, respectivamente.  $\omega$  é o fator acêntrico e  $B^0$  e  $B^1$  são aproximações de ordem zero e de primeira ordem em  $\omega$ .

Vale ressaltar que a generalização apresentada só é recomendada para  $V_r \geq 2$ .

$$\frac{v}{v_c} = V_r; \quad (1.26)$$

A equação de Soave-Redlich-Kwong foi proposta por Soave (1972) como um melhoramento da equação de estado de Redlich-Kwong (REDLICH & KWONG, 1949). É uma equação matemática muito utilizada em simulação e modelagem termodinâmica de processos, juntamente com a equação de Peng-Robinson.

A equação Soave-Redlich-Kwong é escrita como:

$$P = \frac{RT}{v} - \frac{\alpha a}{v(v+b)} \quad (1.27)$$

Onde:  $v$  é o volume molar do sistema,  $T$  é a temperatura,  $P$  é a pressão do sistema e  $R$  é a constante universal dos gases perfeitos. Os parâmetros da mistura,  $a$ ,  $b$  e  $\alpha$ , são definidos a partir de parâmetros dos componentes puros como segue:

$$a = \frac{0,42747R^2T_c^2}{P_c} \quad (1.28)$$

$$b = \frac{0,08664RT_c}{P_c} \quad (1.29)$$

$$\alpha = \left( 1 + (0,48508 + 1,55171\omega - 0,17613\omega^2) \left( 1 - T_r^{1/2} \right) \right)^2 \quad (1.30)$$

$$\frac{T}{T_c} = T_r; \quad (1.31)$$

A equação de Peng-Robinson foi elaborada para servir no cálculo das UPG – Unidades de Processamento de Gás. Ela compete com a modificação de Soave da equação de Redlich-Kwong tendo um desempenho melhor no cálculo da fase líquida. A expressão matemática desta equação é:



$$P = \frac{RT}{v-b} - \frac{\alpha a}{v(v+b)+b(v-b)} \quad (1.32)$$

Onde: P é a pressão, v é o volume molar, T é a temperatura absoluta, R é a constante universal dos gases e “a”, “b”, “ $\alpha$ ” e “m” são:

$$a = 0,40724 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \quad (1.33)$$

$$b = 0,07780 \frac{RT_c}{P_c} \quad (1.34)$$

$$\alpha = \left( 1 + m \left( 1 + T_r^{1/2} \right) \right)^2 \quad (1.35)$$

$$m = 0,37464 + 1,5422\omega - 0,26992\omega^2 \quad (1.36)$$

Onde  $\Omega$  é o fator acêntrico. O subíndice C se refere ao ponto crítico e o subíndice R se refere à condição de propriedade reduzida. Neste caso, a temperatura reduzida que é a razão entre a temperatura e a temperatura crítica. A equação não é explícita em relação a V. Neste caso ela se transforma numa equação polinomial do terceiro grau:

$$Z^3 - (1 - B)Z^2 + (A - 3B^2 - 2B)Z - AB - B^2 - B^3 = 0 \quad (1.37)$$

Onde, A, B e Z são:

$$A = \frac{aP}{R^2 T^2}; B = \frac{BP}{RT}; Z = \frac{PV}{RT}; \quad (1.38)$$

A regra de mistura da equação de Peng Robinson é apresentada a seguir:

$$a = \sum_i \sum_j x_i x_j a_{ij} \quad (1.39)$$

$$a_{ij} = (1 - K_{ij}) a_i^{1/2} a_j^{1/2} \quad (1.40)$$

$$b = \sum_i x_i b_i \quad (1.41)$$

A equação de Peng Robinson tem aplicabilidade para cálculo do equilíbrio líquido-vapor de diversas misturas incluindo hidrocarbonetos e gases como sulfeto de hidrogênio e dióxido de carbono.

A resolução das equações cúbicas envolve um cálculo iterativo a partir de programas computacionais, e são usados para obter as raízes da equação cúbica.

Com a finalidade de avaliar o comportamento da solubilidade a pressões mais altas, modelos termodinâmicos com equações de estado têm sido desenvolvidos para prever com precisão a solubilidade do CO<sub>2</sub> em soluções aquosas (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). Neste caso, o potencial químico do CO<sub>2</sub> na fase vapor é calculado usando uma equação de estado, enquanto o potencial químico do CO<sub>2</sub> na fase gasosa é descrito por um modelo de interação, através de simulação numérica (DUAN & SUN, 2003).

### **1.5.1 Parâmetros envolvidos na solubilidade do CO<sub>2</sub> em alimentos**

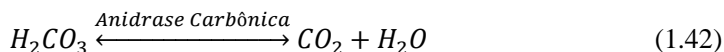
Os fatores mais importantes que afetam a solubilidade do CO<sub>2</sub> em alimentos estão relacionados à quantidade de água e de gordura e ao pH inicial. Este último merece uma ênfase especial, porque a alteração de pH no alimento promovido pela absorção de CO<sub>2</sub> pelo alimento, torna perceptível o sabor ácido nesses produtos quando consumidos imediatamente após a remoção da atmosfera modificada (SIMPSON, ACEVEDO & ALMONACID, 2009).

A molécula de CO<sub>2</sub> é mais solúvel em água do que qualquer outro gás utilizado em sistemas de atmosfera modificada, quando comparados ao O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. À temperatura de 0 °C, atinge o nível mais elevado de solubilidade em água, chegando a 77 atm mmol/kg<sup>-1</sup>. Fatores como o aumento de temperatura e da concentração de NaCl em um alimento diminuem a solubilidade de CO<sub>2</sub>. Gill (1988) menciona que mais de 99 % do CO<sub>2</sub> está como gás dissolvido e menos de 1 % como ácido carbônico, que se dissocia parcialmente na carne (pH 5,5 a 0 °C). Nessa situação, a solubilidade do CO<sub>2</sub> é de aproximadamente 43 mmol/(kg.atm)<sup>-1</sup> e diminui 0,85 atm mmol/kg para o aumento de cada grau Celsius e aumenta em 16 atm mmol/kg para cada unidade de pH. A molécula de CO<sub>2</sub> também é altamente solúvel em lipídios, onde a solubilidade aumenta juntamente com a temperatura.

A solubilidade do CO<sub>2</sub> também está relacionada com outros parâmetros, como a determinação do coeficiente de difusão, que não é

afetada de forma significativa dentro da faixa de temperatura de refrigeração, desde que esta seja constante. Para cada aumento de temperatura na ordem de 10 °C é obtido um aumento de 3 % na solubilidade do CO<sub>2</sub>, de acordo com a correlação de Wilke; Chang (1955). O problema de transferência simultânea de calor e massa em regime transiente foi resolvido por Simpson et al. (2003), que relataram a mudança marginal de CO<sub>2</sub> no *headspace* quando se muda a temperatura entre 0 °C a 15 °C.

Sivertsvik et al. (2004) afirmaram que o CO<sub>2</sub> deve difundir na fração aquosa do alimento, de modo que o coeficiente de difusão deve ser menor do que o da água pura. Essa afirmação nem sempre é verdadeira, uma vez que a transferência de CO<sub>2</sub> também pode ser facilitada pela presença de atividade enzimática, como a anidrase carbônica (reação apresentada pela Equação 1.42), presente em carne bovina, suína, peixes, frangos e outros alimentos frescos.



A escolha das proporções de cada gás no sistema de atmosfera modificada é essencial, visto que este influencia não somente o aspecto visual do produto, mas principalmente na sua microbiota, podendo alterar ou inibir o desenvolvimento de determinado grupo de micro-organismos em favor de outro grupo menos nocivo, ou ainda evitar o aumento da contagem total durante períodos mais longos de armazenamento (ESMER et al., 2011).

O pescado é muito susceptível a deterioração microbiológica e química, o que faz com que a extensão da vida útil através da atmosfera modificada seja dependente das características da matéria-prima (espécie, teor inicial de gordura, populações microbiológicas, etc) e também da temperatura da mistura gasosa e dos materiais utilizados nas embalagens (GOULAS & KONTOMINAS, 2007).

No caso de produtos cárneos, a atmosfera gasosa exerce uma função seletiva sobre a microbiota do produto. O armazenamento refrigerado e aeróbio favorece o crescimento de bactérias gram-negativas e aeróbias em formato de bastonete, incluindo *Pseudomonas* spp. Essa bactéria predomina sobre as demais, e produz odores indesejáveis em virtude do seu metabolismo, onde há quebra de proteínas em aminoácidos. Já em condições anaeróbias de armazenamento refrigerado, onde os níveis de CO<sub>2</sub> estão elevados, ocorre uma aceleração ao

desenvolvimento de bactérias ácido-láticas (que normalmente é lento) e inibe a deterioração aeróbia. Pode haver a possibilidade de crescimento de alguns anaeróbios indesejáveis, como o gênero *Clostridium* sp. Por outro lado, na presença de oxigênio, a bactéria *Brochothrix thermosphacta* pode ocasionar a deterioração de carnes (ESMER et al., 2011).

A solubilidade do CO<sub>2</sub> é potencializada com as baixas temperaturas, e no caso da atmosfera modificada, a concentração e a quantidade de CO<sub>2</sub> em contato com o alimento variam no decorrer do período de armazenamento. A atmosfera modificada aplicada no *headspace* da embalagem passará por alterações da concentração inicial de gás durante o armazenamento. Isto porque a composição gasosa no *headspace* é dinâmica e variações ocorrem normalmente devido ao metabolismo do alimento, a respiração microbiana, a solubilidade do gás e permeabilidade do material da embalagem (JAKOBSEN & RISBO, 2009; SIMPSON et al., 2001).

A temperatura interfere diretamente na eficácia da atmosfera modificada, uma vez que o efeito bacteriostático varia conforme esse parâmetro. O processo de inibição no crescimento microbiano pelo CO<sub>2</sub> e suas condições de armazenamento a baixas temperaturas pode ser interrompido devido aos desvios de temperatura, e ocasionar o crescimento de micro-organismos anaeróbios facultativos e aeróbios patogênicos resistentes ao CO<sub>2</sub>, que antes não tinham as condições adequadas para desenvolvimento (MCMILLIN, 2008).

A composição do CO<sub>2</sub> pode ser afetada pela atividade microbiana, uma vez que estes consomem oxigênio e produzem CO<sub>2</sub>. Esse efeito só é significativo quando a deterioração é evidente e o produto chegou ao término de sua vida útil, por isso que não é considerado um fator relevante para o delineamento de um sistema com atmosfera modificada (SIMPSON et al., 2001).

Soccol & Oetterer (2003) relatam que existem diversas teorias que podem explicar os caminhos pelos quais as células bacterianas são influenciadas pela ação do CO<sub>2</sub>. As mais importantes se referem; (1) às alterações nas funções das membranas celulares, incluindo efeitos nos nutrientes; (2) inibição direta das enzimas ou redução das reações enzimáticas; (3) penetração nas membranas bacterianas, levando a mudanças do pH intracelular e (4) alterações diretas nas propriedades físico-químicas das proteínas.

Em alimentos que não respiram, a captação de oxigênio não é considerada, porém, sabe-se que o tecido do músculo pode respirar nos primeiros dias após o abate, diminuindo depois com o tempo (JAKOBSEN & BERTELSEN, 2002). Em alguns casos, a dissolução de CO<sub>2</sub> na superfície de músculos que contenham elevados níveis de CO<sub>2</sub> (>60 %) e pH reduzido, resultam no aumento da perda de água por gotejamento, pela baixa CRA da proteína. Esse efeito é responsável pelas alterações na textura da carne quando expostas a concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, Davis (1995) afirmou que o uso de O<sub>2</sub> pode reduzir a exsudação no pescado durante o armazenamento, e sugere o uso do O<sub>2</sub> em pescado de baixo teor de gordura.

### **1.6 Aplicação do processo de pré-solubilização de CO<sub>2</sub> (SGS) em produtos que não respiram**

O conceito de grau de enchimento, dado pela relação volume do produto *versus* volume da embalagem, determina a efetividade do acondicionamento sob atmosfera modificada. Um percentual entre 25 e 33 % é recomendado para pescado marinho (ROTABAKK et al., 2008). Outro conceito importante é a relação g/p, que ocorre entre o volume do gás e o volume do produto e normalmente é alto, na proporção de 2:1 ou 3:1 (volume do gás duas ou três vezes o volume do alimento), sendo obtida através dos valores de pressão parcial do gás dentro da embalagem e o volume de gás no produto. Esta relação g/p elevada é necessária para prevenir o colapso da embalagem, devido ao CO<sub>2</sub> solubilizado ocupar menos volume do que na forma gasosa (SIVERTSVIK et al., 2004). Para o envase de frutos do mar, uma relação g/p entre 2 e 3 é recomendada para um processo bem-sucedido, assegurando o efeito bacteriostático do gás e evitando o colapso da embalagem (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006).

Os sistemas em atmosfera modificada são importantes na conservação dos alimentos, porém exigem um maior volume das embalagens ocupado pelo gás no *headspace* e o aumento da probabilidade de furos na embalagem durante a distribuição, quando comparados com a embalagem a vácuo (JAYASINGH et al., 2001). Desta forma, a solubilização de CO<sub>2</sub> no alimento para ser efetiva necessita de determinada quantidade de gás para reagir com o meio.

Com o objetivo de encontrar parâmetros capazes de estabelecer relação g/p adequados e minimizar o problema do colapso da embalagem, Sivertsvik et al (2004), Sivertsvik & Jensen (2005) montaram um aparato

experimental para a determinação da quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido em alimentos que não respiram (pescado). A água e/ou alimento foram colocados no aparato, e o CO<sub>2</sub> foi bombeado para o interior do sistema e com a medição da variação da pressão parcial do gás e da temperatura com o tempo, foi calculada a solubilidade e as taxas de absorção do CO<sub>2</sub> no alimento aplicando a Lei de Henry e a Lei de Fick.

O processo proposto é denominado como pré-solubilização do CO<sub>2</sub>, ou tratamento SGS (*Soluble Gas Stabilisation*), e consiste em um método que avalia parâmetros extrínsecos (relação g/p, nível inicial de CO<sub>2</sub>, pressão e temperatura totais no sistema embalagem-headspace-alimento) e também parâmetros intrínsecos (pH, teor de água, sal, conteúdo de gordura) que influenciam na taxa de CO<sub>2</sub> dissolvido no produto (SIVERTSVIK et al., 2004; SIVERTSVIK & JENSEN, 2005).

Cabral (2011) baseado em Sivertsvik (2004) montou um aparato experimental para determinar a solubilidade de CO<sub>2</sub> em alimentos. O aparato foi validado pela determinação da constante de Henry do CO<sub>2</sub> em água destilada e o coeficiente de difusão e efetivo do CO<sub>2</sub> em queijo minas frescal. O autor aplicou a solução numérica da segunda Lei de Fick unidirecional para cilindro, desprezando a resistência à transferência de massa entre as fases e utilizando a concentração da superfície obtida experimentalmente. O aparato apresentou ótima reprodutibilidade. A solubilidade foi determinada através da constante de Henry a temperaturas de 4, 7 e 10 °C, foi maior à temperatura de 7 °C, devido ao efeito combinado, segundo o autor, da temperatura e mudanças de fase de parte dos lipídios encontrados na estrutura do queijo. Desta forma, é possível aplicar os parâmetros obtidos como referência no processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> no alimento antes de embalar (SGS – *Soluble Gas Stabilization*).

No caso de alimentos que não respiram, como as carnes e em especial os moluscos, o CO<sub>2</sub> presente no alimento se dissolve na água e nos lipídios presentes (SIVERSTVIK et al., 2004).

A quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido em alimentos que não respiram foi predita e validada através da Equação (1.43) por Sivertsvik et al. (2004a, 2004b, 2005) e os autores encontram boas estimativas para a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido em água, peixe cru e produtos de carne cozidos, respectivamente.

$$C_{CO_2}^{pred} = \frac{(g/p)P_{CO_2}^{t=0}M_{CO_2}}{\rho RT + (g/p)H_{CO_2,p}M_{CO_2}} \quad (1.43)$$

Onde:

$g/p$  é a relação entre volume de gás e volume de produto,  $P_{CO_2}^{t=0}$  é a pressão parcial inicial de  $CO_2$  (Pa),  $M_{CO_2}$  é a massa molecular do  $CO_2$  ( $g\ mol^{-1}$ ),  $R$  é constante universal dos gases ( $J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (K),  $H_{CO_2,p}$  é a constante de Henry do  $CO_2$  dissolvido no produto ( $Pa\ ppm^{-1}$ ).

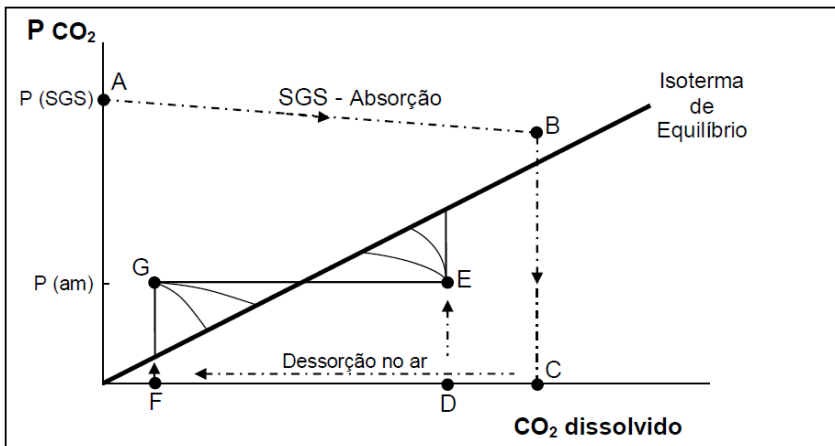
Na tentativa de simplificar a aplicação da equação, os autores sugerem a utilização da constante de Henry do  $CO_2$  na água, ao invés da constante de Henry do  $CO_2$  no alimento, adicionando à equação os termos de composição de água e gordura para peixe cru e apenas água para os produtos de carne cozidos, de acordo com as Equações (1.44) e (1.45), respectivamente.

$$C_{CO_2}^{pred} = \left( \frac{\% \text{ água} + \% \text{ gordura}}{100} \right) \left( \frac{(g/p) P_{CO_2}^{t=0} M_{CO_2}}{\rho RT + (g/p) H_{CO_2,p} M_{CO_2}} \right) \quad (1.44)$$

$$C_{CO_2}^{pred} = \left( \frac{\% \text{ água}}{100} \right) \left( \frac{(g/p) P_{CO_2}^{t=0} M_{CO_2}}{\rho RT + (g/p) H_{CO_2,p} M_{CO_2}} \right) \quad (1.45)$$

Cabral (2011) ilustrou uma situação de tratamento SGS com redução de pressão, seguido de embalagem sob atmosfera modificada, apresentado na Figura 1.10 e descreveu o que ocorre em cada etapa dos tratamentos, baseado nas equações de predição da solubilidade de  $CO_2$  em alimentos. Ambos os processos são na mesma temperatura.

Figura 1.10 - Ilustração do tratamento SGS seguido de embalagem em atmosfera modificada.



Fonte: Cabral (2011).

As etapas dos processos de pré-tratamento até a embalagem final são representadas pelas letras A, B, C, D, E, F e G, descritas a seguir:

- (A) Representa o início da pré-solubilização do  $\text{CO}_2$  no alimento (SGS). A taxa de solubilização é determinada pelo coeficiente de difusão efetivo do gás no alimento, pelo gradiente entre a pressão parcial de  $\text{CO}_2$  durante o tratamento e a pressão de  $\text{CO}_2$  de equilíbrio e pela área de transferência de massa.
- (B) É o fim do processo SGS, o qual não se encontra no equilíbrio termodinâmico do sistema. Atingir o equilíbrio durante o SGS não é necessário, nem viável, devido ao longo tempo de processo necessário. A concentração alcançada no estado B deve ser estabelecida levando-se em conta o efeito microbiológico e mudanças em propriedades físico-químicas e sensoriais como cor, exsudação, pH, etc.
- (C) Momento em que o alimento é retirado do sistema SGS e é submetido à atmosfera normal, na qual a pressão parcial de  $\text{CO}_2$  pode ser considerada zero ( $= 0,0003 \text{ atm}$ ). Nesse momento, o alimento está supersaturado e ocorre liberação do gás do alimento para a atmosfera. O grau de dessorção é,



evidentemente, influenciado pelo tempo e temperatura de exposição à atmosfera normal (ROTABAKK et al., 2010; JAKOBSEN & BERTELSEN, 2006).

- (D, E e F) O produto antes de ser embalado definitivamente está representado pelos estados D e F, sendo maior a dessorção no estado F. Quando o produto no estado D é embalado sob atmosfera modificada com determinada pressão parcial de CO<sub>2</sub> (estado E) ele continua supersaturado e, portanto, ainda irá liberar CO<sub>2</sub>. Nesse caso pode ocorrer um inchamento de embalagens flexíveis (JAKOBSEN & RISBO, 2009). O trajeto até o equilíbrio é influenciado pela razão g/p da embalagem. O trajeto vertical até o equilíbrio é observado quando o grau de enchimento da embalagem tende a 100% (g/p tende a zero) e o trajeto horizontal quando o grau de enchimento da embalagem tende a 0% (g/p tende a infinito).
- (G) O estado G representa o produto embalado em atmosfera modificada (mesma pressão parcial de CO<sub>2</sub> que o estado E) após maior dessorção em atmosfera normal. Observa-se que o produto absorverá CO<sub>2</sub> até o equilíbrio, mesmo que esta quantidade seja muito pequena. É possível utilizar uma embalagem com alto grau de enchimento (baixo g/p) e altas concentrações de CO<sub>2</sub>. Aqui se pode aproveitar o colapso da embalagem para promover um aspecto de vácuo (SCHIRMER & LANGSRUD, 2010; JAKOBSEN & RISBO, 2009). Igualmente ao estado E, o trajeto até o equilíbrio é condicionado ao grau de enchimento da embalagem.

O tratamento SGS vem sendo aplicado em diversos produtos cárneos, como filés de salmão fresco, camarão descascado cozido, filés de frango, alabote do Atlântico (SIVERTSVIK, 2003; ROTABAKK et al., 2006; SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; ROTABAKK et al., 2008). O tratamento SGS ainda não foi relatado em mexilhões.

## **1.7 Alta pressão hidrostática em alimentos**

O processamento a alta pressão, também denominado como alta pressão hidrostática (APH) ou processamento a ultra-alta pressão, é um processo não térmico que visa a inativação microbiana para a produção de alimentos seguros, de alta qualidade e valor agregado, e mantém as

características sensoriais (aparência, cor, sabor e textura) ao mesmo tempo que proporciona uma alta retenção de vitaminas (WRIGHT, CARDELLO & BELL, 2007; PATTERSON, LINTON & DOONA, 2007). Além disso, o processo de alta pressão não rompe as ligações covalentes, assim a estrutura primária das proteínas é pouco afetada (MURCHIE et al, 2005). Embora a aplicação da alta pressão em alimentos seja recente e em desenvolvimento, esta tecnologia tem seu início na década de 80 (MURCHIE et al., 2005).

A Tabela 1.5 apresenta as vantagens únicas oferecidas pelo processo a alta pressão, de acordo com Nguyen & Balasubramaniam (2011).

Esta tecnologia utiliza uma ampla faixa de pressões até 900 MPa. Um típico sistema de alta pressão consiste em um recipiente de pressão e um dispositivo gerador de pressão. Os alimentos são acondicionados no interior do recipiente, que é fechado e depois bombeado com água a partir do fundo. Após o sistema atingir a pressão desejada, o bombeamento é paralisado, as válvulas são fechadas e a pressão pode ser mantida sem a necessidade adicional de entrada de energia, o que é vantajoso para as indústrias do setor. O princípio do processo é aplicar a alta pressão de forma isostática de forma que todas as regiões do alimento possuam uma pressão uniforme, dispensando os gradientes de temperatura dos tratamentos térmicos. No entanto, a aplicação de alta pressão provoca o aquecimento adiabático nos alimentos (Figura 1.11), que pode variar de acordo com a composição do alimento (normalmente 3-9 °C/100 MPa). A alta pressão pode ser aplicada em conjunto com o calor, com temperaturas iniciais em torno de 80-90 °C, e aquecimento de compressão ( $T > 121$  °C) quando se deseja destruir esporos resistentes (PATTERSON, LINTON & DOONA, 2007). A aplicação de alta pressão em alimentos sólidos requer a remoção de todo o ar possível do alimento com envase a vácuo, em embalagens flexíveis e de alta barreira, assim um maior número de embalagens pode ser submetido ao processo em cada batelada e o trabalho de compressão não será perdido no ar do sistema. Para líquidos, o processo pode ser conduzido em batelada, realizando o mesmo tipo de envase aplicado para sólidos ou de modo semi-contínuo, com dois ou mais recipientes com pistões móveis para comprimir os alimentos líquidos (NGUYEN & BALASUBRAMANIAM, 2011).

Tabela 1.5 - Vantagens particulares do processamento a alta pressão.

<b>Descrição</b>	<b>Vantagem</b>
Pressão	Distribuição rápida e uniforme através da amostra
Distribuição térmica	Impacto reduzido do gradiente térmico
Compressão física	Aumento instantâneo de temperatura e subsequente resfriamento na descompressão
Manipulação do produto	Adequada para ambos os alimentos particulados e bombeáveis
Tempo de processo	Menos dependência do tamanho e formato do produto
Funcionalidade	Oportunidades para novos processos, desenvolvimento de produtos
Impacto na qualidade	Alimento não deve sofrer mudanças químicas significativas
Velocidade de reação	Pressão acelera a cinética de inativação térmica tradicional

Fonte: Nguyen & Balasubramaniam (2011).

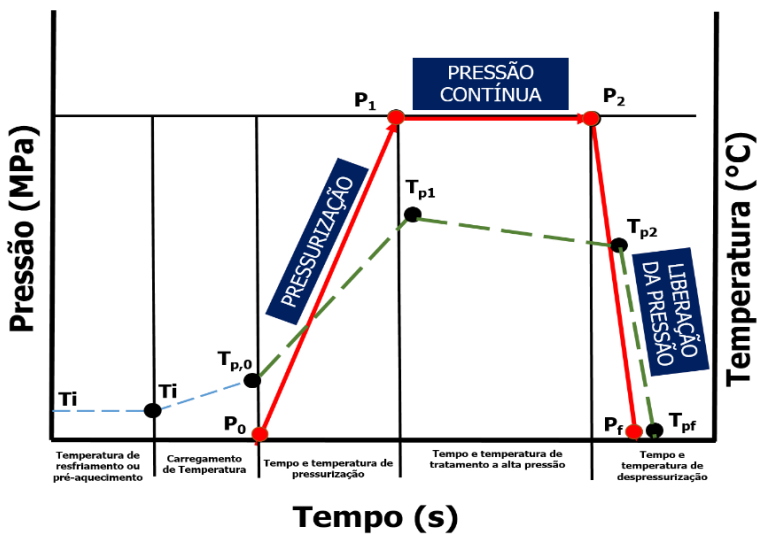
A alta pressão hidrostática vem sendo aplicada na pasteurização de alimentos, com pouco uso de calor no processo, elevando as temperaturas para 20-45 °C e tem a vantagem de promover menos alterações nas características sensoriais dos produtos em comparação à pasteurização tradicional. Este tratamento inativa os micro-organismos vegetativos para estender a vida útil de alimentos com elevada acidez e também de pode estender a vida útil de alimentos de baixa acidez refrigerados.

No processamento à alta pressão para fins de esterilização, a pressão e temperatura são aplicados de forma sinérgica para inativar micro-organismos vegetativos e também os esporos, aumentando a estabilidade de alimentos de baixa acidez. A condição necessária ideal para esterilizar alimentos de baixa acidez é  $\geq 700$  MPa e  $\geq 105$  °C, porém existem poucas unidades experimentais capazes de operar nessas condições, apenas com pequenos volumes internos, adequados para

experiências microbiológicas porém insuficientes para a produção de alimentos em maior escala (LAU & TUREK, 2007).

Alguns estudos mostram que o efeito do processo na textura dos alimentos é variável e dependente do gênero alimentício. Em vegetais à base de proteínas podem ocorrer aumento da firmeza e manutenção da estrutura muscular, aimenproporcionando menor escurecimento e com isso coloração mais acentuada, aumento da firmeza em vegetais à base de proteínas e manutenção da estrutura muscular, que no entanto pode tomar consistência borrachosa em alguns alimentos. Esse processo tem oferecido produtos com melhor qualidade final do que a autoclavagem comercial (LAU & TUREK, 2007).

Figura 1.11 - Processo de aquecimento adiabático do produto durante o processo de alta pressão hidrostática em alimentos.



A composição dos alimentos é um dos fatores que interferem na extensão com que a alta pressão inativa os micro-organismos nos alimentos, pois deve inativar enzimas ou alterar as propriedades físicas do alimento por desnaturação protéica ou enrijecer quanto à textura. Por isso, não somente a inativação microbiana deve ser considerada, como também os efeitos no alimento tratado (PATTERSON, LINTON & DOONA, 2007).

A efetividade da alta pressão como um método de preservação depende de fatores intrínsecos e extrínsecos que precisam ser analisados quando se otimiza tratamentos para um alimento em especial. Assim, da mesma forma que ocorre com o tratamento térmico, também são estipulados um limiar de inativação específico para cada micro-organismo, abaixo do qual não ocorre inativação. Acima desse limiar, o efeito letal do processo tende a aumentar de acordo com o aumento de pressão e/ou temperatura durante o processo (PATTERSON, LINTON & DOONA, 2007).

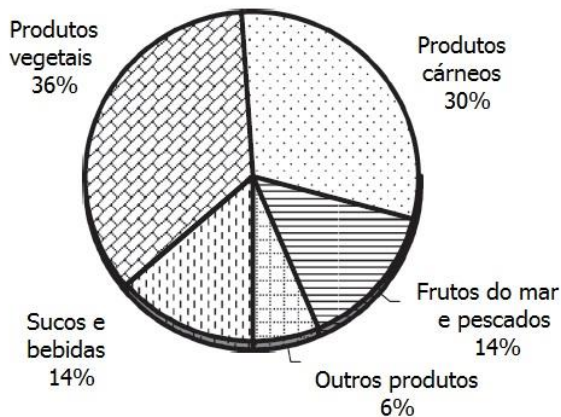
As classes de micro-organismos respondem de forma diferente aos tratamentos a alta pressão, de acordo com a seguinte ordem crescente de resistência: bactérias vegetativas < bolores e leveduras < vírus < esporos bacterianos. Os esporos bacterianos podem ser extremamente resistentes a alta pressão, bem como a outras modalidades de tratamentos como irradiação, calor e agentes químicos (PATTERSON, LINTON & DOONA, 2007).

A alta pressão vem sendo aplicada em diversos grupos de alimentos, em especial os produtos cárneos, como as carnes em fatias, fermentadas e inteiras; presunto curado e cru, tiras de frango pré-cozidos, adicionalmente, a tecnologia permite a redução dos níveis de conservantes químicos adicionados (lactato de sódio, lactato de potássio, e diacetato de sódio) em virtude da eliminação de organismos de deterioração e inativação de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* spp (PATTERSON, LINTON & DOONA, 2007).

Na indústria de frutos do mar a principal aplicação da alta pressão está nas ostras, para abertura de conchas e separação da carne, oferecendo muitas vantagens no processamento, melhorando a segurança e estendendo a sua vida útil (MURCHIE et al., 2005). A remoção da carne da concha de outros crustáceos como lagosta, caranguejo e camarão também vem sendo estudada (TERIO et al., 2010; AUBOURG et al., 2010). Para esses produtos, a literatura relata a utilização de pressões na faixa de 200-300 MPa para uma eficiente remoção da casca. Até o momento, apenas pequenas companhias, localizadas principalmente no Canadá, nos Estados Unidos e Nova Zelândia vem realizando esse processo, visto que o mercado Europeu é mais resistente ao aplicar essa tecnologia em bivalves porque os consumidores costumam comprar apenas ostras e lagostas vivas. O desenvolvimento da tecnologia de alta pressão aplicada a bivalves está restrito devido à existência de muitas patentes na área. Essas patentes trazem certa confusão quando se referem

à inativação microbiana, pois há pesquisas publicadas na literatura sobre inativação de patógenos em frutos do mar (TONELLO, 2011). A Figura 1.12 apresenta a distribuição do processamento a alta pressão em relação ao tipo de produtos processados.

Figura 1.12 - Distribuição dos equipamentos de alta pressão envolvidos com cada classe de alimentos processados.



Fonte: Tonello (2011).

Hurtado et al. (2001) aplicaram alta pressão em polvo através de uma pressurização contínua e pulsada em etapas, e em ambos os casos, a 7 e 40 °C. Os autores observaram reduções na microflora microbiana durante o armazenamento a 3 °C, após a pressurização em etapas a 400 MPa a 40 °C. Foram observadas reduções nas perdas de água e também na capacidade de retenção de água. Houve um aumento da vida útil de 43 dias no polvo pressurizado em relação ao produto não tratado.

Calik et al. (2002) estudaram a aplicação de alta pressão em ostras do pacífico e sob caldo inoculados com *Vibrio parahaemolyticus* sob diferentes níveis (241, 276, 310 e 345 MPa) e os resultados mostraram que este micro-organismo foi reduzido na cultura pura e nas ostras inteiras. A inativação foi dependente do tempo e da pressão aplicados, onde as melhores condições foram obtidas a 345 MPa por 30 e 90 s, atingindo níveis não detectáveis e se mostrou eficiente para reduzir *Vibrio parahaemolyticus* em ostras.

He et al. (2002) processaram ostras do pacífico sob alta pressão de 207 a 310 MPa durante 0, 1 e 2 min e armazenaram a 4 °C e avaliaram o produto durante 27 dias. O tratamento de alta pressão promoveu discreto decréscimo do pH (6,3 para 5,8) e da umidade e a atividade de lipase não foi significativamente reduzida. A microbiota foi reduzida em para 2 e 3 logs e permaneceram baixos durante o armazenamento. A qualidade das ostras foi considerada com índices de qualidade mais altos do que as amostras sem o tratamento a alta pressão.

Linton et al. (2003) investigaram as mudanças proporcionadas pelo tratamento a alta pressão em quatro espécies de frutos do mar (mexilhões, camarões, vieiras e ostras), e observaram que o processo foi capaz de inativar a microflora típica deteriorante, como psicrotrofos, coliformes e *Pseudomonas* spp. estendendo a fase lag de crescimento desses microorganismos. Após o armazenamento, as principais bactérias foram *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Moraxella* e bactérias ácido-lácticas. As contagens microbianas se mantiveram baixas mesmo após 28 dias de armazenamento a 2 °C.

Cruz-Romero et al. (2004) avaliaram o efeito da alta pressão (a 100-800 MPa por 10 min a 20 °C) em ostras, em relação às características físico-químicas. A alta pressão induziu mudanças na cor, característico do produto cozido, se mostrou mais volumoso e aparência suculenta em relação ao tecido cru. Observou-se que a carne descolou da concha, provavelmente devido à desnaturação do músculo adutor. A umidade aumentou, enquanto cinzas e proteínas diminuíram em relação às ostras não tratadas, acima de 800 MPa.

Hsu et al. (2009) processaram ostras inteiras sob alta pressão (150-300 MPa) para determinar as propriedades bioquímicas e de abertura das conchas avaliaram o desempenho das ostras tratadas sob cocção a 160 °C por 90 s, para o preparo de um prato de omelete, para avaliação das propriedades físicas e sensoriais em relação às ostras *in natura*. Os melhores tratamentos para o desconche de ostras foram a 250 e 300 MPa. O omelete de ostras tratadas com alta pressão foram aceitos pelos consumidores e mostrou que é possível melhorar a aceitabilidade do produto com a aplicação desta tecnologia.

Meujo et al. (2010), estudaram o efeito da aplicação da alta pressão usando CO<sub>2</sub> supercrítico na inativação microbiana de ostras inteiras e 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. *Vibrio fisheri* teve redução de sete ciclos logarítmicos, na condição de processamento a 100

bar, 37°C e 30 minutos. A textura das ostras *in natura* e das ostras tratadas com alta pressão não diferiram significativamente na aparência, odor e na textura na análise sensorial.

Gou et al. (2010) avaliaram a influência da alta pressão hidrostática em lulas para a inibição de N-óxido desmetilase de trimetilamina e a produção de *off-flavours*. O tratamento foi aplicado a 300 MPa por 20 min e o produto foi avaliado durante 12 dias de armazenamento. A lula teve a atividade da N-óxido desmetilase de trimetilamina reduzida significativamente pela alta pressão.

O desafio para a indústria de frutos do mar é controlar a geração de maus odores e a deterioração microbiana (GOU et al., 2010). Alguns estudos sugerem a combinação de técnicas sinérgicas de preservação para aumentar a inativação microbiana e melhorar a qualidade dos produtos, em particular, a combinação da alta pressão e tecnologias de envase ou alta pressão e tratamento térmico brando para aplicações práticas no processamento de alimentos (MURCHIE et al., 2005; GARCIA-GONZALEZ et al, 2007). Outra modalidade da alta pressão utiliza o dióxido de carbono, onde o alimento permanece em contato com o gás pressurizado, em condição sub ou supercrítico por um determinado período. Assim, a inativação microbiana ocorre pela ação da pressão combinada com o efeito bactericida do CO<sub>2</sub> em sistemas do tipo batelada, semi-contínuo e contínuo (DAMAR & BALABAN, 2006). Em outro estudo, Amanatidou et al. (2000) aplicaram a combinação do envase com atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) usando gases pressurizados com o processamento a alta pressão a 150 MPa, sob baixa temperatura (5 °C), em salmão e obtiveram aumento da vida útil de 4 para 18 dias (AMANATIDOU et al., 2000).



## CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE DESTE TRABALHO

A exploração dos recursos marinhos no mundo tem se acentuado, principalmente com a inclusão de países como o Brasil, que tradicionalmente firmam sua economia nas atividades agrícolas e de criação de animais. Algumas regiões no país possuem como fonte de renda a atividade pesqueira, porém, o consumo majoritário de carnes provém da criação de bovinos, suínos e aves, enquanto o consumo de pescado ainda não é culturalmente difundido no país. O estado de Santa Catarina utiliza seu litoral na extração de pescado e frutos do mar. A estes últimos, é possível agregar valor maior do que o pescado tradicional, além do estado ser o maior produtor de moluscos bivalves no país.

O processamento de mexilhões no Brasil ainda tem caráter artesanal em relação a outros países mais desenvolvidos no setor, como Nova Zelândia, Espanha e Chile. Existem poucas empresas processadoras, que apresentam deficiências na mecanização e nos procedimentos para um processo adequado, e por esta razão há interesse em buscar soluções para aumentar a vida útil dos moluscos e assim comercializar o produto também em regiões distantes do litoral.

Em relação à conservação de mexilhões, as pesquisas têm avançado no que concerne à combinação de fatores, tais como: tratamentos térmicos capazes de eliminar a microbiota e garantir aceitabilidade das características sensoriais, tratamentos não térmicos a alta pressão, combinados com técnicas de envase, como a aplicação de atmosfera modificada no mexilhão vivo e/ou *in natura*, através do vácuo ou de misturas gasosas contendo CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> em diferentes proporções. Esses processos, combinados com a conservação do produto a baixas temperaturas, são capazes de prolongar a vida útil do produto. Entretanto, a literatura referencia apenas trabalhos com aplicação de atmosfera modificada em mexilhões vivos e/ou crus, e não há até o momento, estudos disponíveis quanto a aplicação da atmosfera modificada em mexilhões cozidos e desconchados, que é uma alternativa viável para a logística de transporte e, ao mesmo tempo, uma forma mais prática para o consumo.

Uma outra alternativa da aplicação do CO<sub>2</sub> em alimentos que não respiram, é a técnica denominada *soluble gas solubilization* (SGS), desenvolvida por Sivertsvik et al. (2003). Essa técnica pode ser usada como alternativa à atmosfera modificada para diminuir o uso de embalagens de grandes volumes, ao mesmo tempo que aumenta a vida

útil dos produtos. Esta técnica já foi estudada em produtos cárneos (salsicha e presunto), pescado (peixes com baixo e alto teor de lipídios) e em laticínios. O presente trabalho é pioneiro em mexilhões e as tecnologias estudadas tem potencial para aplicação neste tipo de produto. O processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> (SGS) até o momento vem sendo aplicado a baixas pressões com tempo de processo de 2 horas. A velocidade do processo, pode ser melhorada em escala industrial utilizando pressões mais altas, que potencializa a solubilidade do CO<sub>2</sub> no produto.

Outra tecnologia interessante para o aumento da vida útil de mexilhão é o processo a alta pressão hidrostática, que vem sendo aplicada a alguns frutos do mar, principalmente para o desconche de ostras, além da remoção da carne de lagostas e camarões. Não existem relatos na literatura a respeito do comportamento da alta pressão em mexilhões cozidos e na influência deste processo na vida útil do produto.

A contribuição deste trabalho está em propor a utilização do CO<sub>2</sub> como atmosfera ativa no mexilhão cozido, tanto na forma pré-solubilizada (processo SGS) e acondicionada em atmosfera convencional ou em atmosfera modificada (CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>), e ainda combinando o mexilhão pré-solubilizado com CO<sub>2</sub> ao tratamento de alta pressão, fornecendo dados sobre o comportamento do produto mediante as condições de processo e conservação, ao mesmo tempo que investiga as propriedades físicas de um produto de fisiologia heterogênea e poroso como o mexilhão.

## REFERÊNCIAS

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

ANTONIOLLI, M. A. **Vida Útil do Mexilhão *Perna perna* (L.) Processado e Mantido Sob Refrigeração**. Florianópolis, 1999. 98 p. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

ARCHER, R. M.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p. 379-386, jul/set, 1994.

AUBOURG, A. P.; TABILO-MUNIZAGA, G.; REYES, J. E.; RODRÍGUEZ, A.; PÉREZ-WON, M. Effect of high-pressure treatment on microbial activity and lipid oxidation in chilled coho salmon. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.112, p. 362-372, 2010.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. Forvisão: Guimarães, Portugal, 2003. 109 p.

BARROS, M. C.; MAGÁN, A.; VALIÑO, S.; BELLO, P. M.; CASARES, J. J.; BLANCO, J. M. Identification of best available techniques in the seafood industry: a case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 391-399, 2009.

BEATTIE, P. On the occurrence of apparent non-Henry's Law behaviour in experimental partitioning studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.57, p. 47-55, 1993.

BEAUMONT, A.; GJEDREM T.; MORAN, P. **Blue Mussel – *M. edulis* and Mediterranean mussel – *M. galloprovincialis***. In: “Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations.” D. Crosetti, S. Lapègue, I. Olesen, T. Svaasand (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. 6 p, Itália, 12-17 Junho, (2006). Disponível em: <<http://genimpact.imr.no/>>, Acesso em: 15 jan 2014.

BERNÁRDEZ, M.; PASTORIZA, L. Quality of live packaged mussels during storage as a function of size and oxygen concentration. **Food Control**, v. 22, p. 257-265, 2011.

BOWNES, S. J.; MCQUAID, C. D.; Mechanisms of habitat segregation between an invasive (*Mytilus galloprovincialis*) and an indigenous (*Perna perna*) mussel: adult growth and mortality. **Marine Biology**, v. 157, p. 1799-1810, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos em Alimentos**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)> Acesso em: 22 fev. 2010.

CABRAL, G. J. **Determinação experimental da solubilidade e do coeficiente de difusão efetivo do CO<sub>2</sub> em queijo tipo Minas Frescal e simulação de embalagem sob atmosfera modificada**. 90 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

CAGLAK, E.; CAKLI, S.; KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1293-1299, 2008.

CALIK, H.; MORRISSEY, M. T.; RENO, P. W.; AN, H. Effect of High-Pressure Processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and pacific oysters. **Journal of Food Science**, v. 67(4), 2002.

CANN, D. C. **Packing Fish in a Modified Atmosphere**. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. (2001). Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5956e/x5956e00.htm>> – Acesso em: 14 jun 2012.

CARROLL, J.; SLUPSKY, J.; MATHER, A. The solubility of carbon dioxide in water at low pressure. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 20(6), p. 1201-1209, 1991.

CAVALHEIRO, D. **Estudo de alternativas para o processamento de mexilhões (*Perna perna*)**. 2011. 212 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2011.

CAVALHEIRO D.; SCHMIDT F. C.; RODRIGUES L. G. G.; SIGA C.; LEITEMPERGHER F.; LAURINDO, J.B. Processing of *Perna perna* mussels using integrated process of cooking and vacuum cooling. **Journal of Food Process Engineering**, 2012.

**CODEX ALIMENTARIUS. Code of practice for fish and fishery products**. World health organization food and agriculture organization of the united nations, Roma, 2009.

**CODEX ALIMENTARIUS. CAC/RCP 52/2003. Code of practice for fish and fishery products**. World health organization food and agriculture organization of the united nations, 2003. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>> Acesso em: set 2010.

CORDEIRO, D. **Qualidade do Mexilhão *Perna perna* submetido ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento**. Piracicaba, 2005. 82 p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo – USP.

CORDEIRO, D.; LOPES, T. G. G.; OETTERER, M.; PORTO, E.; GALVÃO, J. A. Qualidade do Mexilhão *Perna perna* Submetido ao Processo Combinado de Cocção, Congelamento e Armazenamento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n.1, p. 165-179, jan.-jun. 2007.

CORRÊA, A. A.; ALBARNAZ, J. D.; MORESCO, V.; POLI, C. R.; TEIXEIRA, A. L.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, R. M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium*. **Marine Environmental Research**, v. 63, p. 479-489, 2007.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. 2° Ed., Clarendon Press, Oxford, UK, 1975.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.92 (3), p.460-465, 2002.

CRUZ, C. D.; FLETCHER, G. C.; Prevalence and biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* in New Zealand mussel (*Perna canaliculus*) processing plants. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1387-1393, 2011.

CRUZ-ROMERO, M. C.; SMIDDY, M.; HILL, C.; KELLY, A. L. Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 161-169, 2004.

DALGAARD, P., 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 319e333.

DALGAARD, P.; JØRGENSEN, L. V. Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have shelf life > 7 months at 0 °C, but spoil in 4-6 days at 25 °C. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 431-442, 2000.

DAMAR, S.; BALABAN, M.O. Review of Dense Phase CO<sub>2</sub> Technology: Microbial and Enzyme Inactivation, and Effects on Food Quality. **Journal of Food Science**, v.71(1), p.R1-R11, 2006.

DAVIS, H.K. **Modified atmosphere packaging (MAP) of fish and seafood products**. In *Proceedings Modified Atmosphere Packaging*

(MAP) and Related Technologies, Campden and Chorleywood Food Research Association, Gloucestershire, UK. p. 1-13. (1995).

DE BUYSER, M.L.; AUDINET, N.; DELBART, M. O.; MAIRE, M.; FRANÇOISE, F. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive *staphylococci* in cheeses made from raw milk. **Food Microbiology**, v.15, p. 339–346, 1995.

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; MARIN, V. A. Evaluation of antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* strains isolated from mussels (*Perna perna* linnaeus 1758). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 329-324, abr-jun, 2010.

DUAN, Z.; SUN, R. An improved model calculating CO<sub>2</sub> solubility in pure water and aqueous NaCl solutions from 273 to 533 K and from 0 to 2000 bar. **Chemical Geology**, v.193, p. 257– 271, 2003.

EMBORG, J.; LAURSEN, B. G.; RATHJEN, T.; DALGAARD, P. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 790-799, 2002.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca. SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, G.; SOUZA, R. V.; COSTA, S.W. **Síntese Informativa da Maricultura 2011**, p 1-7, 2012. Disponível em: <[www.epagri.sc.gov.br](http://www.epagri.sc.gov.br)> Acesso em 25/07/2012.

ESMER, O. K.; IRKIN, R.; DEGIRMENCIOGLU, N.; DEGIRMENCIOGLU, A. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. **Meat Science**, v. 88, p. 221–226, 2011.

FAO. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Mytilus edulis*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Texto por Goulletquer, P. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Roma, 2006, Acesso em: Fev. 2014.

FELLOWS, P. **Tecnología del procesamiento de los alimentos: principios y prácticas**. Zaragoza: Acribia, 1994. 549 p.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Mexilhões: Biologia e Cultivo**. Apostila UFSC. 1997.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M. **Cultivo de moluscos em Santa Catarina**.

**RECOS – Maricultura sustentável – Capítulo 11**. 2008. Disponível em: <<http://www.mileniodomar.org.br>>. Acesso em: 13 de agosto de 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre :Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2º edição – São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo :Editora Atheneu, 2005. 196 p.

FRANÇA FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 315-325, jul./set. 2006.

FREITAS, E. I.; SANTOS, M. C. S.; FARAGE, S.; TÓRTORA, J. C. O. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Mexilhões Comercializados na Área Urbana de Niterói – RJ. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 144, p. 101-105, 2006.

FURLAN, É. F.; GALVÃO, J. A.; SALÁN, E. O.; YOKOYAMA, V. A.; OETTERER, M. Estabilidade físico-química e mercado do mexilhão (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba – SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 516-523, jul.-set., 2007.

GALVÃO, J. A.; FURLAN, É. F.; SALÁN, E. O.; PORTO, E.; OETTERER, M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da Água e dos Mexilhões



Cultivados na Região de Ubatuba, SP. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 30(6), p. 1124-1129, 2006.

GALVÃO, J. A. **Qualidade Microbiológica da Água de Cultivo e do Mexilhão *Perna perna* (Linneus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. Piracicaba, 2004. 128 p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, USP.

GARCIA-GONZALEZ, L.; GEERAERD, A. H.; SPILIMBERGO, S.; ELST, K.; VAN GINNEKEN, L.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. F.; DEVLIEGHERE, F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 1-28, 2007.

GILL, C.O. The solubility of carbon dioxide in meat. *Meat Science*, v. 22, p. 61-71, 1988.

GOU, J.; LEE, H.; AHN, J. Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage. *Food Chemistry*, v.119, p. 471-476, 2010.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 100, p. 287–296, 2007.

GOULAS, A. E.; CHOULIARA, I.; NESSI, E.; KONTOMINAS, M. G.; SAWAIDIS, I. N. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal of Applied Microbiology**, n. 98, p. 752-760, 2005.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria - problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 262–266, 2002.

GRAM, L.; HUSS, H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 121-137, 1996.

GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 65–72, 1987.

GROENENBERG, D. S. J.; WESSELINGH, F. P.; RAJAGOPAL, S.; JANSEN, J. M.; BOS, M. M.; VAN DER VELDE, G.; GITTENBERGER, E.; HOEKSEMA, B. W.; RAAD, H.; HUMMEL, H. On the identity of broad-shelled mussels (Mollusca, Bivalvia, *Mytilus*) from the Dutch delta region. **Contributions to Zoology**, v. 80 (2), 2011.

GRUPO DE ESTUDOS PESQUEIROS, UNIVALI. Disponível em: <<http://siaiacad04.univali.br/404.html>> Acesso em: 24 ago. 2012.

GUILLOM-COTTARD, I.; AUGILER, H.; CONSOLEB, J. J.; ESMIEU, O. Study of microbiological pollution of a Pleasure Boat Harbour Using Mussels as Bioindicators. **Marine Environmental Research**, v. 45(3), p. 239-241, 1998.

HAN, J. H. Antimicrobial Food Packaging. **Food Technology**, v. 54(3), p. 56–65, 2000.

HAN, J. H.; ION, M. C. S. Mass transfer of gas and solute through packaging materials. In: **Innovations in Food Packaging**, 536 p., Elsevier, 2005.

HE, H.; ADAMS, R. M.; FARKAS, D. F.; MORRISSEY, M. T. Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. **Journal of Food Science**, v. 67, n.2, 2002.

HEALTH PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods**. London:Health Protection Agency, November 2009.

HOZBOR, M.C.; SAIZ, A. I.; YEANNES, M. I.; FRITZ, R. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). **LWT**, v. 39, p. 99–104, 2006.

HUIDOBRO, F. R.; MIGUEL, E.; BLÁZQUEZ, B.; ONEGA, E. A comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. **Meat Science**, n. 69, p. 527-536, 2005.

HUBER, E. **Resfriamento a vácuo de cortes de carnes após o cozimento**. Florianópolis, 2004. 85 p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

HUBER, E.; SOARES L. P.; LAURINDO, J. B. Vacuum cooling of pre-cooked mussels for small scale. **Alimentos e Nutrição de Araraquara**, v.14, n.2, p. 165-170, 2003.

HUIS IN'T VELD, J. H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1-18, 1996.

HURTADO, J. L.; MONTERO, P.; BORDERÍAS, J. Chilled Storage of Pressurized Octopus (*Octopus vulgaris*) Muscle. **Journal of Food Science**, v. 66(3), 2001.

HSU, K.; HWANG, J.; CHI, H.; LAI, K. Effect of different high pressure treatments on shucking, biochemical, physical and sensory characteristics of oysters to elaborate a traditional Taiwanese oyster omelette. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 530-535, 2010.

HUSS, H. H. Garantia da Qualidade para os Produtos de Pesca. **FAO Documento Técnico sobre as Pescas**. n. 334. Roma, FAO. 1997. 176p.

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v. 8, n. 2, p. 91-98, 2000.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Micro-organismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1980, 431 p.

JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified

by semihard cheese. **Journal of Food Engineering**. v. 92, p. 285-290, 2009.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Solubility of carbon dioxide in fat and muscle tissue. **Journal of Muscle Foods**, v. 17, p. 9-19, 2006.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**. v. 68, p. 603-610, 2004.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. The use of CO<sub>2</sub> in packaging of fresh red meats and its effect on chemical quality changes in the meat: A review. **Journal of Muscle Foods**, v. 13, p. 143-168, 2002.

JAKSIC, S.; UHITIL S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L. G. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v. 13, p. 491-493, 2002.

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

JAYASINGH, P.; CORNFORTH, D. P.; CARPENTER, C. E.; WHITTIER, D. Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. **Meat Science**, v. 59, p. 317-324, 2001.

KAI, M.; RUIVO, U. **Trabalhos apresentados no Seminário sobre Controle de Qualidade na Indústria do Pescado**. 1988. São Paulo: Loyola, 1988. 303p.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, p. 113-130, 2006.

KHAN, M. A.; PARRISH, C. C.; SHAHIDI, F. Enumeration of total heterotrophic bacteria using different types of agar to evaluate the microbial quality of the blue mussels (*Mytilus edulis*) and sea scallops

(*Placopecten magellanicus*). **Food Research International**, v. 38 p. 751–758, 2005.

KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 1 °C, 3 °C, 7 °C and 10 °C. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, 698-706, 1999.

KOVAČ, K.; DIEZ-VALCARCEA, M.; HERNANDEZA, M.; RASPORB P.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 558-568, 2010.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P. K.; THAMPURAN, N. Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella serovars* isolated from seafood. **Food Control**, v. 20, p. 376–380, 2009.

LAU, M. H.; EVAN, T. J. Determination of Quality Differences in Low-Acid Foods Sterilized by High Pressure versus Retorting – Cap 9. Em: **High pressure processing of foods**, Editores: Doona, C.J.; Florence E. Feeherry, F.E. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2007.

LEE, J.; JUNG, D.; EOM, S.; OH, S.; KIM, Y.; KWAK, H. KIM, Y. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, p. 990 – 994, 2008.

LHAFI, S. K.; KÜHNE, M. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 297-300, 2007.

LIMA, M. **Avaliação das condições de processamento de mexilhões *Perna perna* pré-cozidos e resfriados**. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LIMA DOS SANTOS, C. A.M.; VIEIRA, R. H. S. F. Perigos e riscos bacteriológicos associados ao consumo de pescado no Brasil. **Revista do**

**Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo , v. 55, n. 4, Aug. 2013.

LINTON, M.; MC CLEMENTS, J. M. J.; PATTERSON, M. F. M. Changes in the microbiological quality of shellfish, brought about by treatment with high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 713-727, 2003.

LÓPEZ-VÁSQUEZ, R.; VANACLOCHA, A. **Tecnologia de Mataderos**. Ediciones Mundi-Prensa, 2004.

LOUDA, J. W.; NETO, R. R.; MAGALHÃES, A. R. M.; SCHNEIDER, V. F. Pigment alterations in the brown mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. v. 150, p. 385-394, 2008.

LUCIANO, G.; MONAHAN, F. J.; VASTA, V.; PENNISI, P.; BELLA, M.; PRIOLO, A. Lipid and colour stability of meat from lambs fed fresh herbage or concentrate. **Meat Science**, v. 82, p. 193–199, 2009.

LUDORFF, W; MEYER, V. **El Pescado Y Los Productos de La Pesca**. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia, 1973, 342 p.

MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. **O cultivo do mexilhão *Perna perna* no município de Penha, SC**. In: BRANCO, J.; MARENZI, A. W. C. (Org.). Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC. 291. Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. p. 227-244, 2006.

MARINO, A.; LOMBARDO, L.; FIORENTINO, C.; ORLANDELLA, B.; MONTICELLI, L.; NOSTRO, A.; ALONZO, V. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MARQUES, H. L. A. **Criação Comercial de Mexilhões**. São Paulo: Nobel, 1998, 109 p.

MARQUES, H. L. A.; PEREIRA, R. T. L.; CORREA, B. C. Seasonal variation in growth and yield of the brown mussel *Perna perna* (L). cultured in Ubatuba, Brazil. **Aquaculture**, v. 169, p. 263–273, 1998.

MARTINEZ-URTAZA, J.; LIEBANA, E. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the genetic diversity and clonal persistence of *Salmonella senftenberg* in mussel processing facilities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 153– 163, 2005.

MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Extending the shelf-life of refrigerated green mussel (*Perna viridis*) under modified atmosphere packaging. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 33, n.2, p. 171-179, Mar. - Apr. 2011

MATAMOROS, S.; PILET, M. F.; GIGOUT, F.; PRÉVOST, H.; LEROI, F. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. **Food Microbiology**, v. 26, p. 638-644, 2009.

MCMILLIN, K. W. Review: Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. **Meat Science**, v. 80, p. 43–65, 2008.

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

MOHAN, C. O.; RAVISHANKAR, C. N.; GOPAL, T. K. S.; LALITHA, K. V.; KUMAR, A.

Effect of reduced oxygen atmosphere and sodium acetate treatment on the microbial quality changes of seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks stored in ice. **Food Microbiology**, v. 27, p. 526-534, 2010.

MOREIRA, L. R. M. *Mytilus edulis e Mytilus galloprovincialis: características e aquicultura*. 59 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2008.

MURCHIE, L. W.; CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. P.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; SMIDDY, M.; KELLY, A. L. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 257 – 270, 2005.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. Anatomia funcional de *Perna perna* (Linné) (Bivalvia, Mytilidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14 (1), p.135-168, 1997.

NEIRA, C. D.; CASTROVIEJO, R. A.; CAAMAÑO, J. S. **El mejillo: biología, cultivo y comercialización**. 1 Ed, La Coruña, Espanha: Fundación Caixa Galicia, 1990.

NGUYEN, L. C.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Fundamentals of Food Processing Using High Pressure – Chapter 1. In: **Nonthermal Processing Technologies for Food**, Editado por: Zhang, H. Q.; Barbosa-cánovas, G. V.; Balasubramaniam, V. M.; Dunne, C. P.; Farkas, D. F.; Yuan, J. T. C. **Blackwell Publishing Ltda e Institute of Food Technologists**, 2011.

NIRMALAKHANDAN, N.; BRENNAN, R. A.; SPEECE, R. E. Predicting Henry's Law and the effect of temperature on Henry's Law Constant. **War. Research**, v. 31, n.6, p. 1471-1481, 1997.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v. 21, p. 343–361, 2010.

NOVAK, J. S.; SAPERS, G. M.; JUNEJA, V. K. **Microbial Safety of Minimally Processed Foods**. 360p. Washington DC: CRC Press, 2003.

OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J. L.; PEREIRA, M. J. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, p. 805-816, 2011.

ORBAN, E.; DI LENA, G.; NEVIGATO, T.; CASINI, I.; MARZETTI A.; CAPRONI, R. 2002. Seasonal changes in meat content, condition



index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. **Food Chemistry**, v. 77, p. 57-65, 2002.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos - Vol 2: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artemed, 2005, 280 p.

OSÓRIO, J. C. S.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 292-300, 2009.

PASTORIZA, L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA, J. J. R. Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussel stored refrigerated. **European Food Research Technology**, v. 218, p. 415-419, 2004.

PATSIAS, A.; CHOULIARA, I.; BADEKA, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. **Food Microbiology**, v. 23, p. 423-429, 2006.

PATTERSON, M. F.; LINTON, M.; DOONA, C. J. Introduction to High Pressure Processing of Foods – Cap 1. Em: **High pressure processing of foods**, Editores: Doona, C.J.; Florence E. Feeherry, F.E. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2007.

PEREIRA, M. M. D.; FERREIRA, V. M.; VALADÃO, R. C.; OLIVEIRA, G. M.; ALENCAR, T. A.; RIBEIRO, A. L. M. S.; SILVA, P. P. O.; BARBOSA, C. G. Utilização da análise de coliformes como indicativo de sanidade dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guaíba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n.2, p.95-99, maio/ago, 2009.

PULGAR, J. S.; GÁZQUEZ, A.; RUIZ-CARRASCAL, J. Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time. **Meat Science**, v. 90, p. 828–835, 2012.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373–380, 2002.

REDLICH, O.; KWONG, N. S. **Chemical. Rev.**, v. 44, p. 233-244, 1949.

RESGALLA JR, C.; BRASIL, E. S.; LAITANO, K. S.; REIS FILHO, R. W. Physioecology of the mussel *Perna perna* (*Mytilidae*) in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 270, p. 464-474, 2007.

RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M. L.; MCLAUCHLIN, J.; FANELLI, I. Molecular Characterization and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 119-126, 2003.

RODRIGO, S.; ADESIYUNA, A.; ASGARALI, Z.; SWANSTON, W. Analysis for selected pathogens in water used during rinsing of broiler carcasses in small processing operations in Trinidad. **Food Microbiology**, v. 22, p. 609-614, 2005.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.201-216, 2007.

ROJAS, M.V.R.; MATTÉ, M.H.; DROPA, M.; SILVA, M.L. MATTÉ, G.R. - Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. **Revista Internacional de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 53(4): p. 201-5, 2011.

ROTABAKK, B.T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Solubility, absorption and desorption of carbon dioxide in chicken breast fillets. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 442-446, 2010.

ROTABAKK, B.T.; WYLLER, J.; LEKANG, O.I; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008a.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14(2), p. 179-186, 2008b.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, v.82, p. 43-50, 2007.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; JEKSRUD, W.; SIVERTSVIK, M. Effect of modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization on the shelf life of skinless chicken breast fillets. **Journal of Food Science**, v. 71(2), p. 124-131, 2006.

SÁENZ, L. A.; SEIBERT, E. L.; ZANETTE, J.; FIEDLER, H. D.; CURTIUS, A. J.; FERREIRA, J. F.; ALMEIDA, E. A.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 796–804, 2010.

SANDEL, M. K.; MCKILLIP, J. L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, p. 5-10, 2004.

SCALICE, R. K. **Desenvolvimento de uma Família de Produtos Modulares para o Cultivo e Beneficiamento de Mexilhões**. Florianópolis, 2003. 252 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

SCHIRMER, B. C.; LANGSRUD, S. A dissolving CO<sub>2</sub> headspace combined with organic acids prolongs the shelf-life of fresh pork, **Meat Science**, v. 85, p. 280-284, 2010.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A.; JÚNIOR, A. B. C.; ROHERS, F. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes da região litorânea da ilha de Santa Catarina. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053-1058, 2010.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual do controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo, editora Varela, 4° ed, 1995.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do Padrão Coliformes a 45 °C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.2, p. 352 – 359, abr. jun., 2006.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18 (12), p. 1565-1568, 2007.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO<sub>2</sub> in MAP systems: Advances for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 233–239, 2009.

SIMPSON, R.; CAREVIC, E. Designing a modified atmosphere packaging system for foodservice portions on nonrespiring foods: optimal gas mixture and food/headspace ratio. **Foodservice Research International**, v. 14, p. 257-272, 2004.

SIMPSON, R.; ALMONACID, S.; ACEVEDO, C.; CORTÉS, C. Mathematical model to predict effect of temperature abuse in MAP systems applied to pacific hake (*Merluccius Australis*). **Journal of Food Process Engineering**, v. 26, p. 413-434, 2003.

SIMPSON, R.; ALMONACID, S.; ACEVEDO, C. Development of a Mathematical Model for MAP Systems Applied to Nonrespiring Foods. **Journal of Food Science**, v. 66, n.4, 2001.

SIVERTSVIK, M. The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and 37ml/100ml carbon dioxide, **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p. 430-438, 2007.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilisation, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and

Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). **Food Science and Technology International**, v.12 (5), p. 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JENSEN, J. S. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 3: Cooked meat products. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 499-505, 2005.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; VAGANE, A.; ROSNES, J. T. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61(3), p. 449-458, 2004a.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 451-458, 2004b.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled stored on the microbial and sensory quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1467-1472, 2003.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, K.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 107-127, 2002.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H.; ABBOTT, M. **Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics**. 7<sup>o</sup> Ed., Editora: McGraw-Hill Companies, Incorporated, 840 p., 2004.

SOCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n.4, p.569-580, 2003.

SOKOŁOWSKI, A.; BAWAZIR, A. S.; SOKOŁOWSKA, E.; WOŁOWICZ, M. Seasonal variation in the reproductive activity, physiological condition and biochemical components of the brown

mussel *Perna perna* from the coastal waters of Yemen (Gulf of Aden). **Aquatic Living Resources**, v. 23, p. 177-186, 2010.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N.; JOZIC, S.; CURAC, D. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. **Environment International**, v. 25, n. 8, p. 991-1000, 1999.

SOMBRIO, P. **Produção de Conserva de Mexilhões (*Perna perna*) em Embalagem Flexível – Avaliação Sensorial e Instrumental da Textura**. Florianópolis, SC, 2005. 72 p. Dissertação de mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Science**, v. 52, n. 2, p. 157-164, 1999.

SOUZA, R.V.; NOVAES, A. L. T.; SANTOS, A. A.; RUPP, G. S.; SILVA, F. M. Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves no Litoral de Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, p. 54-59, 2009.

SSB. Statistics Norway. **Aquaculture 2012, preliminary figures**. Available in: <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-forelopige/2013-06-06?fane=tabell&sort=nummer&tabell=117237> Acess in: 13 dec 2013.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 408–420, 2003.

TAVARES, M.; MELLO, M. R. P.; CAMPOS, N. C.; MORAIS, C.; OSTINI, S. Proximate composition and caloric value of the mussel *Perna perna*, cultivated in Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 473-475, 1998.

TEIXEIRA, A. M. BEIRÃO, L. H. Efeitos de agentes crioprotetores na capacidade de retenção de água em pasta de pescado utilizando-se a

técnica de análise de superfície de resposta. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 71-82, jan./jun.1999.

TERIO, V.; TANTILLO, G.; MARTELLA, V.; DI PINTO, P.; BUONAVOGLIA, C.; KINGSLEY, D. H. High pressure inactivation of HAV within mussels. **Food and Environmental Virology**, v.2 (2), 83-8, 2010.

THORARINSDOTTIR, K. A.; ARASON, S.; GEIRSDOTTIR, M.; BOGASON, S. G.; KRISTBERGSSON, K. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 377-385, 2002.

TONELLO, C. Case Studies on High-Pressure Processing of Foods – Chapter 4. In: **Nonthermal Processing Technologies for Food**, Editado por: Zhang, H. Q.; Barbosa-cánovas, G. V.; Balasubramaniam, V. M.; Dunne, C. P.; Farkas, D. F.; Yuan, J. T. C. **Blackwell Publishing Ltda e Institute of Food Technologists**, 2011.

TRONSDEN, T.; BRAATEN, T.; LUND, E.; EGGEN, A. E. Consumption of seafood—the influence of overweight and health beliefs. **Food Quality and Preference**, v. 15, p. 361–374, 2004.

TYAGI, A.; SARAVENAN, V.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. 2009. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYRB green real-time PCR and evaluation of the three media. **International Journal of Food Microbiology**, 129,124-130, 2009.

VENTURINI, A. C.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; FARIA, J. A. F. A review: modified atmosphere packaging systems for fresh beef. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 128-137, abr./jun. 2009.

VERNOCCHI, P.; MAFFEI, M.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GARDINI, F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). **Food Control**, v. 18, p. 1575-1583, 2007.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo, Livraria Varela, 2003.

WESTPHALEN, A. D.; BRIGGS, J. L.; LONERGAN, S. M. Influence of pH on rheological properties of porcine myofibrillar protein during heat induced gelation. **Meat Science**, v. 70, n. 2, p. 293-299, 2005.

WHO – World Health Organization. **Code of Practice for fish and fishery products**. Roma: Food and agriculture organization of the United Nations. First Edition, 2009.

WILKE, C. R.; CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. **AIChE Journal**, v.1, p. 264-270,1955.

WOOD, P. C. **Manual de higiene de los mariscos**. Zaragoza: Acribia, 1996.

WRIGHT, A. O.; CARDELLO, A. V.; BELL, R. Consumer Evaluations of High Pressure Processed Foods – Cap 10. Em: **High pressure processing of foods**, Editores: Doona, C.J.; Florence E. Feeherry, F.E. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2007.



## **CAPÍTULO 2:**

**PROCESSO ALTERNATIVO DE COCÇÃO E ENVASE SOB  
ATMOSFERA MODIFICADA PARA MEXILHÃO *Perna perna*.**



## **2 PROCESSO ALTERNATIVO DE COCCÃO E ENVASE SOB ATMOSFERA MODIFICADA PARA MEXILHÃO *Perna perna*.**

Neste capítulo está apresentado o estudo propondo um processo alternativo visando minimizar a contaminação cruzada durante o processamento do mexilhão e exsudação de líquido nas embalagens durante o armazenamento.

### **2.1 Introdução**

A elevada quantidade de água e a microbiota nativa presente no mexilhão *Perna perna* torna o produto altamente perecível e susceptível ao desenvolvimento microbiano, o que requer controle durante seu processamento com a utilização das boas práticas de processo. Lima et al. (2013) relatam que o mexilhão *Perna perna* cultivado no litoral de Santa Catarina, é altamente perecível, devido à sua alta carga microbiana oriunda de sua condição de cultivo e falta das Boas Práticas de Processamento. Outro fator que deve ser considerado no acondicionamento de produtos cárneos é a exsudação da água, mostrado por Lima et al. (2013) nos mexilhões cozidos, processados na indústria, para a embalagem durante armazenamento por 25 dias. A boa aparência é o critério mais importante usado pelos consumidores para avaliar o produto no momento da compra, incluindo a existência da perda de água depositada na embalagem, embora esta não esteja relacionada com a qualidade microbiológica. Os principais critérios sensoriais de produtos cárneos são a cor e a perda de água nas embalagens (OTTO et al., 2006). A característica mais importante da carne para a indústria é a capacidade de retenção de água (CRA), causando rejeição pelos consumidores quando ocorre a perda de água (ANDERSEN, 2000; JEREMIAH, 2001). Assim, o mexilhão processado e envasado sob atmosfera modificada requer um controle da microbiota e dos mecanismos de perda de água durante o armazenamento.

Os mexilhões tem a sua perda de água relacionada à degradação da estrutura muscular causada pela combinação das enzimas endógenas proteinases com a atividade microbiana, que causa a secreção de uma variedade de enzimas hidrolíticas, em especial proteinases. Além disso, o alto teor de glicogênio e os aminoácidos livres na carne de mexilhão são usados como nutrientes para o crescimento microbiano e reduzem a vida útil do produto (MASNIYOM et al., 2011). Portanto, aumentar a vida útil

com ênfase na segurança de alimentos tem sido o foco dos estudos com mexilhão (LIMA et al., 2013).

O processamento convencional de mexilhões inclui as operações de coleta, limpeza e a cocção em vapor a 100 °C durante 6 min, seguido da remoção da carne das conchas, resfriamento imerso em água e gelo, envase, armazenamento e comercialização (HUBER, 2004; LIMA et al., 2013).

Desta forma, melhorias no processamento convencional de mexilhões é uma alternativa para minimizar contaminação cruzada tendo como consequência produtos com menor contagem microbiana inicial, além de maior retenção de água e de qualidade microbiológica e sensorial.

Alguns estudos tem indicado o uso do vácuo nos processos de resfriamento, e outros tratamentos térmicos como o cozimento do produto dentro de embalagens do tipo *pouches* (CAVALHEIRO et al., 2012). A qualidade de carnes cozidas resfriadas usando o vácuo tem sido investigada e expressas pela cor, sabor e textura. Em termos de aceitabilidade global dos produtos, não há diferença significativa em relação aos atributos sensoriais citados acima entre os produtos resfriados usando vácuo ou métodos tradicionais (DESMOND et al., 2000, 2002; MCDONALD et al., 2000, 2001).

O objetivo desde estudo foi propor um processo alternativo para o cozimento de mexilhão *Perna perna*, visando evitar contaminação cruzada e reduzir a exsudação dentro das embalagens.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1.1 Matéria-prima

O mexilhão *Perna perna* foi obtido em uma indústria localizada na grande Florianópolis. O produto foi adquirido *in natura* e foram utilizados os mexilhões colhidos no dia, com as conchas fechadas e que apresentassem estado de frescor e integridade física. Os mexilhões foram embalados e acondicionados em caixa térmica e gelo para o transporte até o Laboratório de Propriedades Físicas (PROFI) da UFSC, onde foram armazenados em câmara fria a  $4 \pm 1$  °C até o momento de serem processados.

No Laboratório PROFÍ foi montado um esquema com os seguintes passos: higienização prévia dos equipamentos, utensílios e superfícies com sanitizante hipoclorito de sódio (200 ppm), seguido da

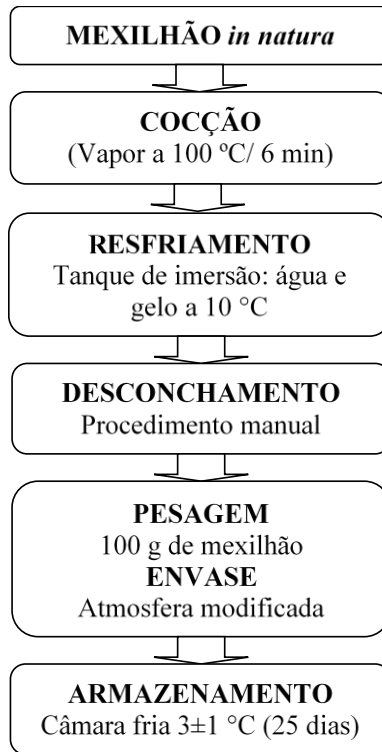
aplicação de álcool a 70% (v/v). A qualidade da água e do gelo usados no resfriamento também foi monitorada durante o processamento. A manipulação do produto em todas as etapas foi realizada conforme o recomendado pelas Boas Práticas de Fabricação. O bisso dos mexilhões e materiais aderidos às conchas foram extraídos com o auxílio de uma faca, antes de serem submetidos ao processamento.

### **2.1.2 Processamento convencional**

Os mexilhões foram processados na forma denominada como “convencional”, adotadas pelas indústrias de beneficiamento do produto do Estado de SC, esquematizada na Figura 2.1.

O processamento da matéria-prima foi dividida em bateladas de 2,5 kg, respeitando a capacidade dos equipamentos em uso, onde foram processados. O cozimento das amostras foi realizado em gaiolas com uso de vapor a 100 °C durante 6 minutos, em autoclave vertical (marca Phoenix, modelo AV-50, Brasil). As amostras foram resfriadas por imersão em tanque contendo água e gelo, à temperatura de 10 °C, durante 10 minutos. Em seguida os mexilhões foram desconchados manualmente, para separação da carne e posterior envase.

Figura 2.1 - Fluxograma do procedimento adotado para processamento convencional de mexilhão *Perna perna*.

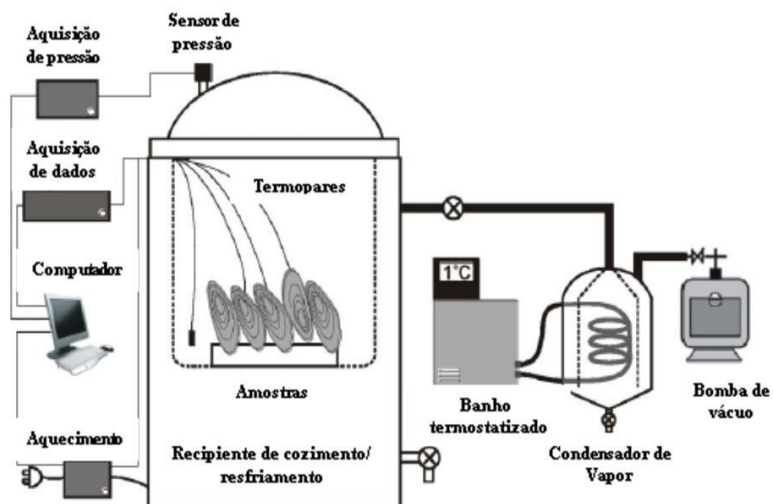


### 2.1.3 Processamento alternativo de mexilhões

O método alternativo buscou sugerir uma opção à etapa de cocção e desconche do mexilhão *Perna perna*. Para tal, a primeira modificação foi a inclusão de um pré-cozimento do mexilhão *in natura* em vapor a 100 °C durante 3 minutos, em autoclave vertical (marca Phoenix, modelo AV-50, Brasil). As conchas foram removidas manualmente e a carne dos mexilhões submetida novamente ao tratamento térmico, para cozimento no sistema integrado de cozimento e resfriamento a vácuo em um mesmo dispositivo experimental, desenvolvido por Schmidt, Aragão & Laurindo (2010) e utilizado por

Cavalheiro et al. (2012) para processamento de mexilhão cozido na concha, apresentado na Figura 2.2.

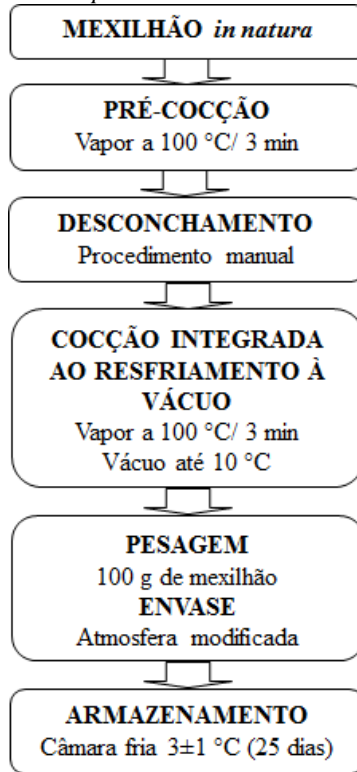
Figura 2.2 - Esquema do dispositivo experimental utilizado nos experimentos de cozimento e resfriamento a vácuo de mexilhões.



Adaptado de Cavalheiro et al. (2012).

Nesse sistema, houve uma cocção no vapor a 100 °C durante 3 minutos, seguido do resfriamento do produto a vácuo, até este atingir a temperatura de 10 °C, após 20 min. Os mexilhões foram retirados do sistema e encaminhados para pesagem e envase. A Figura 2.3 mostra o fluxograma das etapas envolvidas no processamento alternativo de mexilhões.

Figura 2.3 - Fluxograma do procedimento adotado para processamento alternativo de mexilhão *Perna perna*.



#### 2.1.4 Envase do mexilhão processado

Porções de 100 g foram envasados sob atmosfera modificada, para uma composição de 50% de nitrogênio e 50% de dióxido de carbono, da marca Linde, da linha MAPAX®. A embalagem utilizada para o envase foi a selecionada nos testes preliminares, onde três diferentes tipos de embalagens tiveram sua permeabilidade ao CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> monitorados durante 25 dias de armazenamento. A embalagem selecionada possui as seguintes características: multicamada, constituída de uma mistura de Polietileno de baixa densidade (PEBD) e Polietileno aditivados (PEL) e poliamida, da empresa CELOFIX (Cambé - PR), com permeabilidades ao



oxigênio (TPO<sub>2</sub>) 55 (cc/ m<sup>2</sup> dia) e ao vapor d'água (TPVA) 62 (g/ H<sub>2</sub>O. m<sup>2</sup> dia), respectivamente. As amostras foram armazenadas em câmara fria à temperatura de 3±1 °C durante 25 dias.

### 2.1.5 Análises físico-químicas

As propriedades físico-químicas do mexilhão processado na forma convencional e na proposta alternativa foram avaliadas ao longo do tempo de armazenamento, em dois lotes distintos. O período estipulado para a realização das análises foi: zero, 4, 7, 11, 14, 18 e 25 dias.

#### *i) pH*

O pH dos mexilhões foi determinado por método eletrométrico, em pHmetro digital Quimis modelo Q400A. A leitura do pH foi realizada conforme a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL 1981); onde 50 g de amostra foram homogeneizadas em liquidificador até a formação de uma pasta. Em seguida o eletrodo do pHmetro foi inserido diretamente na amostra preparada, com leituras em triplicata.

#### *ii) Umidade*

O conteúdo de umidade dos mexilhões foi determinado conforme método do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2009). Foram utilizados 5 g de amostra, submetidas ao aquecimento em estufa a 105 °C até obter massa constante, com determinações em triplicata.

#### *iii) Textura*

A determinação das propriedades mecânicas de textura, foi expressa pela firmeza dos mexilhões cozidos e resfriados, realizada pela medida da força máxima de cisalhamento, utilizando uma célula de Kramer (KSC) acoplada ao texturômetro (Stable Micro System, modelo TA.XT2i, Inglaterra) com célula de carga de 500 N. Os mexilhões foram colocados dentro do suporte para amostra da KSC (aproximadamente 50 g) e submetidos ao ensaio numa velocidade de 3 mm.s<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em firmeza do produto em N.g<sup>-1</sup> em triplicata.

#### *iv) Perda de água durante as etapas de processamento*

Em todas as etapas do processo, o cálculo da perda percentual de água foi realizado a partir do teor de umidade em base seca. Desta forma, a perda de massa refere-se à perda de água durante as etapas do

processamento de mexilhões, em ambos os métodos utilizados, foi calculada a partir da diferença entre o teor de umidade da amostra na etapa anterior e o teor de umidade da amostra na etapa seguinte (Equação 2.1).

$$\% \text{ PAP} = \frac{X_1 - X_2}{X_1} * 100 \quad (2.1)$$

Onde: *PAP* é a perda de água em cada etapa de processamento,  $X_1$  é o teor de umidade da amostra na etapa inicial a ser avaliada (g água.g sólidos secos<sup>-1</sup>) e  $X_2$  é o teor de umidade da amostra após cada etapa avaliada (g água.g sólidos secos<sup>-1</sup>).

Os valores positivos obtidos referem-se à massa de água perdida, enquanto que a obtenção de valores negativos indica o inverso, ou seja, ganho de água durante determinada etapa do processo.

v) *Avaliação dos exsudados na embalagem*

Os exsudados do produto nas embalagens individuais foram quantificados gravimetricamente em todo o lote analisado durante o armazenamento. Para tal, cada embalagem armazenada foi pesada e catalogada, assim como a massa de produto. A massa do exsudado (g) foi dividida pela massa inicial do produto (g) e relatada como uma percentagem (%), conforme descrita por (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006).

vi) *Capacidade de retenção de água (CRA)*

A capacidade de retenção de água (CRA) dos mexilhões submetidos às duas modalidades de processamento foi determinada utilizando um método modificado de centrifugação, conforme descrito por Desmond et al. (2000). Amostras de aproximadamente 10 g ± 0,5 g foram envolvidas em gaze e centrifugadas em tubo de polipropileno de 50 mL (contendo uma camada de algodão ao fundo) a 7000 rpm (5697 g) por 10 minutos a 3 °C (Centrífuga Sigma, modelo 4k15, Alemanha). As amostras foram pesadas antes e após a centrifugação e a CRA foi calculada de acordo com a Equação 2.2 (razão entre a massa de água retida pela amostra após a centrifugação e a massa de sólidos secos da amostra). A média das triplicatas de cada processo foi considerada para a análise estatística.

$$CRA \text{ (g água/g amostra seca)} = \frac{(m_a \cdot x_w) - (m_a - m_d)}{m_a \cdot (1 - x_w)} \quad (2.2)$$

Onde:  $m_a$  é a massa da amostra antes da centrifugação,  $m_d$  é a massa da amostra após a centrifugação e  $x_w$  é o teor de umidade da amostra.

vii) *Cor*

As medidas de cor no mexilhão processado foram divididas de acordo com o gênero, onde o mexilhão macho apresenta coloração branca leitosa e o mexilhão fêmea, amarela alaranjada, respectivamente. Utilizou-se um colorímetro (Miniscan EZ, Hunterlab) operando no sistema Hunter ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h$ ), utilizando sistema de iluminação D65 e ângulo de observação de  $10^\circ$ . De acordo com a escala,  $L^*$  (luminosidade, 0 a 100 – preto ao branco), as coordenadas de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  que indicam ( $-a$  = verde e  $+a$  = vermelho;  $-b$  = azul e  $+b$  = amarelo). O “ $C^*$ ” representa o chroma, que fornece uma medida da intensidade ou saturação da cor e o “ $h$ ” é o ângulo de matiz e corresponde à tonalidade.

Foi calculado o fator  $\Delta E$ , que é um valor numérico que expressa a diferença entre os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  da amostra padrão no espaço. Esse fator indica o tamanho da diferença de cor global no produto, mas não indica a direção em que as cores são diferentes. É definido pela Equação 2.3:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2.3)$$

## 2.1.6 Grau de enchimento e composição gasosa da embalagem

i) *Grau de enchimento*

O grau de enchimento, definido como volume do produto *versus* o volume da embalagem (mL/mL), foi determinado nas embalagens contendo 100 g ( $\pm 0,03$ ) de mexilhão, de acordo com a metodologia adaptada de Rotabakk et al., (2007). A embalagem é disposta em um recipiente contendo 4000 mL de água e um probe na forma retangular de dimensões de 17,5 mm x 13,5 mm x 2 mm, conectado ao texturometro (Stable Micro System, modelo TA.XT2i, UK, com célula de carga de 500 N) por uma haste de 118 mm altura, conforme mostra a Figura 2.4. Dessa forma foi realizada a imersão da probe na água. O probe tem um volume total de 100 cm<sup>3</sup>, com massa de 437,73 g. A calibração do probe foi realizada pela sua imersão em água a uma taxa de 2 mm/s, com 85 % de

deformação e permaneceu durante o período de 30 s para estabilidade da medição. O grau de enchimento da embalagem contendo o produto foi realizado usando os mesmos parâmetros da calibração. A força resultante foi obtida a partir da Equação 2.4:

$$F_r = F_s - F_c \quad (2.4)$$

Onde:  $F_r$  é a força de flutuação da probe sobre a embalagem, que foi determinada pela diferença entre a força obtida na calibração ( $F_s$ ) menos a força obtida ( $F_c$ ).

O cálculo do grau de enchimento foi realizado, de acordo com Rotabakk et al. (2008) em que a força de Flutuação é expressa para um objeto, pela Equação 2.5:

$$F_b = \rho_f \cdot g \cdot V_p \quad (2.5)$$

Onde  $F_b$  é a Força de Flutuação ( $kg \cdot m \cdot s^{-2}$ );  $\rho_f$  é a densidade do fluido no qual o objeto é submerso, em ( $kg \cdot m^{-3}$ ) e  $V_p$  é o volume da embalagem ( $m^3$ ).

Esta equação também pode ser representada como:

$$F_b = \rho_f \cdot g \cdot \left( V_g \frac{m_a}{\rho_a} \right) \quad (2.6)$$

Onde  $V_g$  é o volume do gás,  $m_a$  é a massa do alimento (kg),  $\rho_f$  é a densidade do fluido no qual o objeto é submerso e  $\rho_a$  é a densidade do alimento ( $kg \cdot m^{-3}$ ). A força da gravidade trabalha na direção oposta à Força de Flutuação. Considerando que a massa do gás é  $\approx 0,0$  kg, a força da gravidade para a embalagem é:

$$F_{grav} = m_a \cdot g \quad (2.7)$$

Onde  $F_{grav}$  é a força da gravidade ( $kg \cdot m \cdot s^{-2}$ ). A força resultante, conforme mensurada pelo texturômetro seria:

$$F_{res} = F_b - F_{grav} \quad (2.8)$$

A substituição das Equações (2.6), (2.7) e (2.8) e rearranjando a equação para  $V_g$ , obtem-se:

$$V_g = \frac{F_{res}}{g \cdot \rho_f} + \frac{m_a}{\rho_f} - \frac{m_a}{\rho_a} \quad (2.9)$$

A Equação (2.9) assume que a densidade para os materiais no interior e exterior ao filme são equivalentes à densidade do fluido.

Com o valor de  $V_g$ , obtém-se o grau de enchimento, dado por:

$$GE = \frac{V_p}{V_g} \cdot 100 \quad (2.10)$$

Onde GE é o grau de enchimento (%),  $V_g$  é o volume de gás contido na embalagem em e  $V_p$  é o volume da embalagem, ambos em  $(m)^3$ .

Figura 2.4 - Probe de imersão em aço inox utilizada para o teste de grau de enchimento das embalagens.



## ii) Composição gasosa

A análise da composição gasosa presente no *headspace* das embalagens contendo o mexilhão foi realizada mediante a leitura da concentração de  $O_2$  e  $CO_2$  utilizando analisador de gases (CheckMate II, PBI Dansensor). Realizou-se uma cinética de comportamento do  $CO_2$  em contato com a água contida no mexilhão no decorrer do tempo de armazenamento, além de observar se havia presença de  $O_2$  e sua evolução

no período. As determinações foram feitas em duas etapas: (1) Leituras de hora em hora até as primeiras 24 hs e (2) Medição durante os 25 dias de armazenamento do produto processado.

iii) *Concentração de CO<sub>2</sub> nos mexilhões*

A concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido nos mexilhões (mg CO<sub>2</sub>/kg produto) foi calculada através da variação do volume dentro das embalagens, baseada em Rotabakk et al. (2007), de acordo com a Equação (2.11):

$$C_{CO_2}^t = \frac{1000 (V_{CO_2i} - V_{CO_2t}) M_{CO_2}}{R.T.m_p} \quad (2.11)$$

Onde:  $C_{CO_2}^t$  é a concentração de CO<sub>2</sub> no tempo t (mg CO<sub>2</sub>/kg produto),  $V_{CO_2i}$  é o volume de CO<sub>2</sub> no tempo inicial (m<sup>3</sup>),  $V_{CO_2t}$  é o volume de CO<sub>2</sub> no tempo t (m<sup>3</sup>),  $M_{CO_2}$  é a massa molar de CO<sub>2</sub> (44.01 g/mol CO<sub>2</sub>) e  $m_p$  é a massa de produto (kg).

As taxas de absorção do CO<sub>2</sub> nos mexilhões foram calculadas usando as diferenças na concentração gasosa, o volume livre dentro das embalagens e a massa de mexilhões, de acordo com a Equação (2.12) (TORRIERI et al., 2009).

$$R_{CO_2abs} = \frac{dCO_2}{dt} \quad (2.12)$$

Onde:  $R_{CO_2abs}$  são as taxas de absorção (mg CO<sub>2</sub>.kg produto.d<sup>-1</sup>);

$\frac{dCO_2}{dt}$  é a variação da concentração de CO<sub>2</sub> com o tempo.

O comportamento da absorção de CO<sub>2</sub> nos mexilhões foi determinada através de equações de ajuste em relação aos dados experimentais (Equação 2.13):

$$[CO_2] = \frac{t}{at + b} \quad (2.13)$$

Onde: t (d) é o tempo de cada ponto; [CO<sub>2</sub>] é a concentração de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub>. kg<sup>-1</sup> produto), “a” e “b” são os parâmetros de ajuste para os dados experimentais.

Derivando a Equação (2.13) em relação ao tempo:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{at}{(t+b)^2} \quad (2.14)$$

Pela substituição da Equação (2.14) na Equação (2.12) e Equação (2.13), as taxas de absorção do the CO<sub>2</sub> nos mexilhões podem ser determinadas, resultando em:

$$R_{CO_2_{abs}} = \frac{at}{(t+b)^2} \quad (2.15)$$

### 2.1.7 Análise estatística

Os dados de caracterização físico-química dos mexilhões foram tratados através da análise de ANOVA, a fim de verificar se havia diferença significativa entre os processamentos testados, e se havia mudanças nos parâmetros físico-químicos com o tempo de armazenamento para os processamentos. A comparação de médias para os fatores que apresentaram diferença significativa (p<0,05) foi realizada através do teste de Tukey. O software *Statistica 7.0* foi utilizado para ambos os testes.

### 2.1.8 Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica foi realizada nos mexilhões durante as etapas de processamento e no produto final durante o armazenamento (0, 4, 7, 11, 14, 18 e 25 dias), para contagem total de aeróbios mesófilos, de psicrófilos a 7 °C e *Vibrio* sp.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Os métodos utilizados para estes ensaios são descritos conforme *American Public Health Association* (A.P.H.A.) – (2001).

i) *Contagem de Aeróbios Mesófilos Totais e Psicrófilos Totais*

Para a determinação de bactérias mesófilas e psicrófilas, utilizou-se como meio de cultura o *Plate Count Agar* (PCA) ou Agar Padrão para contagem. O sistema de espalhamento foi por superfície.

Cerca de 25 g de mexilhão foram adicionados em 225 mL de água peptonada 3% e agitados durante 1 minuto. Foram vertidos nas placas em torno de 15 a 20 mL de ágar fundido e resfriado a 44-46 °C, após a solidificação do meio foram inoculados 100 µL das diferentes diluições do mexilhão nas placas, sendo espalhadas até secar no meio. As placas foram incubadas invertidas a 35-37 °C por 24h para contagem de total de aeróbios mesófilos e a 7 °C por 10 dias para contagem total de psicrófilos.

ii) *Presença de Vibrio spp.*

Em torno de 25 g de mexilhão foram adicionados em 225 mL de água peptonada 0,1% com 3% de NaCl e agitados durante 1 minuto. Em seguida foram vertidos cerca de 15 a 20 mL de meio agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (TCBS) e resfriado até a temperatura entre 44-46 °C nas placas e após a solidificação do meio foram inoculados 100 µL das diferentes diluições nas placas, sendo espalhadas até secar no meio. As placas foram incubadas invertidas a 35-37 °C por 24h e foi realizada a contagem após esse período.

## 2.2 Resultados e Discussão

### 2.2.1 Características físico-químicas do produto processado

i) *pH e Textura*

Os valores de pH encontrados para os dois processos e durante os 25 dias de armazenamento não apresentaram variação significativa quanto ao tipo de processamento e durante o período de armazenamento (média de 6,5), conforme mostrado pela Tabela 2.1. Os valores de pH estabelecidos pelo RIISPOA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1980), para pescado e derivados são inferiores



a 6,5 na parte interna da carne e 6,8 na parte externa da carne. Considerando que não há limites de pH estabelecidos exclusivamente para mexilhão e que o método de pH para quantificar essa variável utiliza a parte interna e externa da carne simultaneamente, são aceitáveis os valores de pH obtidos neste trabalho dentro da faixa estabelecida.

Tabela 2.1 - Média do pH e da textura no processamento tradicional e alternativo de mexilhões durante os 25 dias de armazenamento a 3 °C.

Tempo (dias)	pH		Textura (Firmeza – N.g <sup>-1</sup> )	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
00	6,50±0,02	6,64±0,044	4,47±0,36 <sup>aA</sup>	5,05±0,72 <sup>aA</sup>
04	6,37±0,023	6,66±0,025	4,31±0,355 <sup>aA</sup>	5,10±0,65 <sup>aA</sup>
07	6,52±0,020	6,58±0,061	4,46±0,053 <sup>ba</sup>	6,94±0,218 <sup>aB</sup>
11	6,43±0,010	6,46±0,064	4,32±0,314 <sup>ba</sup>	6,94±0,218 <sup>aB</sup>
14	6,48±0,015	6,61±0,045	5,60±1,933 <sup>aA</sup>	6,20±0,094 <sup>aAB</sup>
18	6,60±0,015	6,57±0,005	5,71±0,456 <sup>aA</sup>	6,25±0,579 <sup>aAB</sup>
25	6,60±0,044	6,65±0,017	4,44±0,116 <sup>ba</sup>	7,16±0,619 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$ .

Os valores encontrados para o pH inicial (6,5) estão de acordo com os valores obtidos por Salán (2005) para mexilhões processados, que variaram de 5,8 a 7,11 e abaixo dos valores obtidos por Cordeiro et al., (2007), de 6,9 para mexilhão submetido à cocção.

Os resultados de pH encontrados neste trabalho, (6,5), estão dentro da faixa exposta por Goulas et al. (2005), que explicam que o pH do mexilhão é considerado alto (6,7 -7,1), tornando-os um substrato ideal para o crescimento microbiano. Os resultados também se assemelham aos obtidos por Lima et al. (2013), que avaliou o pH de mexilhões *Perna perna* pré-cozidos e processados, acondicionados com e sem atmosfera modificada (50% CO<sub>2</sub>/50% N<sub>2</sub>). Os autores não encontraram diferença significativa quanto a influência da atmosfera modificada na alteração de pH, com valores de 6,56 com atmosfera e 6,65 para os mexilhões acondicionados sob ar atmosférico. Neste trabalho, a manutenção do pH durante o armazenamento evidencia uma estabilidade do produto em relação aos mecanismos de deterioração por causa enzimática e/ou microbiana.

O comportamento do pH em moluscos e sua influência como determinante na qualidade do produto final tem sido questionada, de forma que estes possuem o comportamento diferente das espécies de

pescado, no qual este parâmetro é baseado. Galvão et al. (2006) mostraram que há necessidade de estudos específicos para os limites de pH a serem estabelecidos a partir de dados de decomposição e alteração deste parâmetro. Outros estudos como de Caglak et al. (2008) mostra dificuldades para correlacionar o pH de mexilhões selvagens da espécie *Mytilus galloprovincialis* armazenados em atmosfera modificada contendo 50% N<sub>2</sub> e 50 % O<sub>2</sub> com a qualidade do produto. Os autores mostram valor inicial de pH de 6,72 e, após 8 dias, o pH foi de 6,38 e, aos 12 dias de armazenamento a 2°C, o pH de 5,99. Outro estudo no qual não foi possível correlacionar a variação de pH com a qualidade sensorial do produto foi o trabalho proposto por Erkan (2005), que estudou as mudanças na qualidade de mexilhão cozido da espécie *Mytilus galloprovincialis* durante o armazenamento em refrigeração a 4 °C, e obteve uma redução não significativa do pH em 6 dias de armazenamento (5,96 para 5,89).

A firmeza dos mexilhões (Tabela 2.1) foi influenciada pelo tipo de processamento, com valores mais elevados no processamento alternativo. Provavelmente isso se deve ao menor teor de umidade das amostras, o que está relacionado com a maior rigidez do produto. Durante o período de armazenamento não foram observadas mudanças significativas ( $p > 0,05$ ) na firmeza do mexilhão em ambos os processos.

O valor inicial de firmeza do processamento alternativo obtido neste trabalho (5,05 N.g<sup>-1</sup>) está de acordo com Cavalheiro et al. (2012), que encontraram uma firmeza média de 5,1 N.g<sup>-1</sup> para o mexilhão cozido sob vapor e resfriado à vácuo, enquanto no processamento convencional, o valor inicial encontrado neste trabalho (4,47 N.g<sup>-1</sup>) foi inferior ao obtido pelos autores (5,4 N.g<sup>-1</sup>). A firmeza de mexilhões cozidos e resfriados foi avaliada em ambos os casos considerando a força necessária para as lâminas que constituem o probe cortar a amostra.

A determinação da textura em frutos do mar é essencial, visto que essa propriedade é um atributo importante neste tipo de produto, quanto à aceitação do consumidor, e por consequência, a sua comercialização. Ao contrário de outros músculos alimentares, os frutos do mar sofrem um *rigor mortis* mais rápido, culmina no extenso amolecimento da carne, causada pelo menor teor de tecido conjuntivo, além de menor formação de ligações cruzadas no colágeno desses animais (ASHIE & SIMPSON, 1996). Desta forma, os processos de cocção e conservação do mexilhão no armazenamento, propostos neste trabalho, podem contribuir em minimizar esses efeitos do *rigor mortis* e manter o

mexilhão com uma textura aceitável para comercialização e consumo. O cozimento alternativo manteve as propriedades físico-químicas do produto até o final do período de armazenamento proposto, embora haja a necessidade de complementação da análise instrumental com análise sensorial e a verificação de aceitação do produto final.

ii) *Perda de Água e Umidade*

A determinação da umidade em g água.g sólidos<sup>-1</sup> permite observar as variações na perda ou ganho que ocorrem em cada etapa do processamento de mexilhão. Conforme esperado, houve perda de água no mexilhão durante o cozimento (40,34 %) e ganho de água após o resfriamento imerso (-27,28 %) devido ao contato com a água e o gelo, nas etapas correspondentes ao processamento convencional, com perda global de 13,6 %. No processo alternativo, houve perda sucessiva de água na pré-cozção (19,53 %) e após o cozimento integrado ao resfriamento à vácuo (38,70 %), com perda global de água no mexilhão de 58,23%, valor este superior à perda global de massa obtida em processo semelhante por Cavalheiro et al. (2012), que foi de 51,3 %.

Huber et al. (2003) também utilizaram vácuo no resfriamento de mexilhão com concha como alternativa ao resfriamento imerso. Os autores encontraram perda de massa provocada pela evaporação de água das amostras de mexilhões com concha durante o resfriamento a vácuo de aproximadamente 8,1%, o que demonstrou ser uma alternativa tecnicamente viável para o processamento de mariscos.

É importante considerar que além da água, há outros componentes solúveis que também são perdidos durante o cozimento. Por exemplo, ocorre uma solubilização parcial do colágeno em virtude da temperatura, e nesta etapa, a proteína flui para fora do músculo com a água, e pode formar uma gelatina mediante o resfriamento do exsudado (PULGAR et al., 2012). Em relação ao mexilhão não há informação na literatura a respeito da composição do exsudado, tampouco se a quantidade de proteínas solúveis representa uma perda significativa no processo. Chan, Hossain & Brooks (2006) mostraram que o processamento promove perda proteica, onde recuperaram proteína de mexilhão contida na água residual de uma indústria de processamento na Nova Zelândia, a partir do escoamento do líquido produzido pelo mexilhão no processo de cozimento em água a 80 °C, e atestaram que no processo há uma composição inicial de proteína variável entre 0,3 mg/L

a 0,6 mg/L na água residual. Assim, o estudo desta composição no exsudado do produto após o processamento poderia indicar se ocorre perda significativa de proteína pelo produto ou não.

A umidade do produto não apresentou diferença significativa ao longo do período de armazenamento nos dois processamentos, porém mostrou diferença significativa entre os processos aplicados, conforme apresenta a Tabela 2.2. Os menores teores de umidade foram observados para o processo alternativo (0,70 g água.g amostra<sup>-1</sup>) que pode estar relacionado relacionado possivelmente com a aplicação de vácuo durante o resfriamento, acarretando uma perda maior de água, conforme comentado anteriormente. No processamento convencional, o contato do mexilhão com a água do resfriamento contribui para maior absorção de água e consequentemente aumentarão o teor da umidade do produto.

Os valores encontrados para os mexilhões neste trabalho para ambos os métodos de cozimento são inferiores aos obtidos por Pedrosa e Cozzolino (2001), de 0,83 (g água. g amostra<sup>-1</sup>) e de Cordeiro et al., (2007), de 0,81 para mexilhões submetidos à cocção. Os valores encontrados são próximos aos de Tavares et al., (1998), que obtiveram 0,72. As médias de umidade dos mexilhões através do processamento convencional neste trabalho aproximaram-se aos encontrados por Lima (2010), que encontrou teores de umidade na faixa entre 0,72 a 0,79 (g água. g amostra<sup>-1</sup>) e se manteve ao longo dos 25 dias, nas duas condições estudadas (com atmosfera modificada e ar), não apresentando diferença significativa ( $p>0,05$ ). A variação nos teores de umidade encontrados na literatura é comum, pois depende das alterações sazonais na composição do mexilhão, estágio de desenvolvimento do molusco e dos diferentes métodos de cocção empregados.

Tabela 2.2 - Umidade e capacidade de retenção de água (CRA) no processamento tradicional e alternativo de mexilhões durante os 25 dias de armazenamento.

Etapa do processamento	Umidade (g água. g amostra <sup>-1</sup> )		CRA (g H <sub>2</sub> O retida/ g matéria seca)	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
<i>In natura</i>	0,82±0,641	0,82±0,641	3,72±0,27	3,72±0,27
Pré-cozção (3 min.)	*	0,78±0,902	*	2,73±0,244
Cozção (6 min.)	0,73±0,923	*	2,17±0,099	*
Resfriamento por imersão	0,77±0,974	*	2,39±0,164	*
Cozimento (3 min) e Resfriamento a vácuo	*	0,69±0,613	*	1,92±0,045
Período (dias)	Após Processamento			
0	0,77±0,410 <sup>bABC</sup>	0,69±0,783 <sup>aC</sup>	2,38±0,164 <sup>bB</sup>	1,92±0,044 <sup>aA</sup>
4	0,77±0,529 <sup>bBC</sup>	0,71±0,319 <sup>aA</sup>	2,65±0,095 <sup>bB</sup>	2,08±0,056 <sup>aA</sup>
7	0,76 ±0,335 <sup>bCD</sup>	0,70±0,571 <sup>aABC</sup>	2,62±0,176 <sup>aB</sup>	2,27±0,524 <sup>aA</sup>
11	0,76±0,335 <sup>bAB</sup>	0,70±0,149 <sup>aAB</sup>	2,35±0,222 <sup>aB</sup>	1,81±0,271 <sup>aA</sup>
14	0,76±0,293 <sup>bBC</sup>	0,69±0,410 <sup>aBC</sup>	2,64±0,322 <sup>aB</sup>	2,17±0,046 <sup>aA</sup>
18	0,78±0,125 <sup>bAB</sup>	0,70±0,207 <sup>aAB</sup>	2,86±0,074 <sup>bB</sup>	2,31±0,198 <sup>aA</sup>
25	0,76±0,372 <sup>bA</sup>	0,71±0,683 <sup>aA</sup>	2,83±0,033 <sup>aB</sup>	2,35±0,340 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$

\* Etapas não existentes em determinado tipo de processamento

### iii) *Capacidade de Retenção de Água (CRA) e Exsudação*

A capacidade de retenção de água foi expressa pela água retida na matéria seca e, mostrou maior índice (2,38 g de água retida para cada g de matéria seca) no processo convencional, em relação ao processo alternativo (1,92 g de água retida para cada g de matéria seca) e por consequência com maior potencial para uma possível exsudação na embalagem, conforme mostra a Figura 2.5. O resultado corrobora com os valores superiores de umidade e ganho de água obtido para o processo convencional.

Figura 2.5 - Presença de exsudado e vapor de água na embalagem de mexilhão proveniente do processamento convencional durante o armazenamento a 3 °C durante 25 dias.



A cocção integrada ao vácuo promoveu menor CRA no produto final (1,92 g de água retida para cada g de matéria seca). Isto ocorreu devido à perda de água no processo, visto que o princípio do resfriamento a vácuo é baseado na obtenção do resfriamento através da evaporação de parte da umidade do produto sob condições de vácuo (SUN & ZHENG, 2006). Esse efeito é favorável à conservação dos mexilhões, desde que o teor de água evaporado não seja prejudicial à qualidade do produto final. Do contrário, haveria prejuízo na aparência e na textura do produto, promovendo rejeição pelo consumidor. A Figura 2.6 apresenta o aspecto

visual do produto obtido através do processamento alternativo, comparado ao convencional.

O armazenamento do produto demonstrou que a capacidade de retenção de água não teve variação significativa em ambos os processos. Desta forma, pode-se considerar que em condições estáveis de armazenamento, com controle de temperatura, umidade relativa e utilização de embalagens adequadas, a CRA não é afetada.

Figura 2.6 - Análise visual das embalagens com mexilhão processado durante o armazenamento durante 25 dias.



Segundo Lawrie (2005) durante o cozimento de carnes e produtos cárneos os processos de transferência de calor e massa são complexos. Assim, as propriedades térmicas, físicas e sensoriais são alteradas pela CRA, aliada aos fenômenos de desnaturação proteica e derretimento da gordura. A CRA das proteínas diminui como consequência da desnaturação das mesmas e pelas forças internas causadas por pressões do encolhimento do tecido conjuntivo (ERDOGDU et al., 2004). Assim, os fenômenos de exsudação também podem ser associados a processos que ocasionem desnaturação das

proteínas do músculo do mexilhão, onde o ponto isoelétrico das proteínas pode ser afetado (MASNIYOM et al., 2011). A Tabela 2.3 apresenta os resultados obtidos com a análise de exsudado nas embalagens mediante os dois processos estudados.

Figura 2.7 - Ausência de exsudado e de vapor de água na embalagem de mexilhão proveniente do processamento alternativo durante o armazenamento a 3 °C durante 25 dias.



Tabela 2.3 - Perda de água por exsudação em mexilhões *Perna perna* no processamento tradicional e no alternativo.

Tempo (dias)	Exsudação (%)	
	Convencional	Alternativo
4	3,28	0,00
7	3,60	0,00
11	2,32	0,00
14	2,36	0,00
18	2,25	0,00
25	5,78	0,00

\* Os valores se referem a massa de água perdida pelo produto em relação a massa inicial.

A exsudação no processo convencional atingiu 5,78 % em 25 dias a 3 °C. Esses valores são inferiores aos obtidos por Masniyom et al.



(2011), que avaliaram o efeito do uso de atmosfera modificada sobre mexilhões frescos armazenados a 4 °C e encontraram um aumento da exsudação com o armazenamento, com percentual inicial e final de 8 e 16 %, para as misturas gasosas testadas. Os mesmos autores constaram que perda de exsudado pelo músculo contribuiu para menor aceitabilidade do produto pelos consumidores, através de análise sensorial. Naturalmente, neste trabalho, o produto processado possui menos exsudado, pois o excesso de água foi perdido na etapa anterior do processamento, durante a cocção.

Apesar da perda de água observada entre o produto *in natura* e após a cocção pelo processo convencional (40,34 %), a exsudação também ocorre durante o armazenamento, principalmente a temperaturas acima de 0 °C, provocando rejeição do produto pelo consumidor (JEREMIAH, 2001).

A exsudação no armazenamento pode estar relacionada ao conteúdo de água absorvido pelos mexilhões durante a operação de resfriamento em água. O mexilhão possui uma anatomia heterogênea quanto a composição das estruturas morfológicas, influenciada pela sazonalidade e pelo estágio de desenvolvimento do mesmo. Assim, a variação encontrada na exsudação durante os 25 dias de armazenamento pode ter sido influenciada por esta condição, bastante comum neste tipo de matéria prima.

O processamento alternativo não apresentou exsudação nas embalagens durante os 25 dias de armazenamento, garantindo boa aparência do produto durante todo o período. Esse comportamento resulta da modificação proposta no processamento alternativo, onde foi realizada uma pré-cocção para retirada da carne das conchas e uma nova cocção utilizando vácuo como alternativa ao resfriamento imerso não havendo contato com a água e com a água perdida por este tipo de tratamento. Cavalheiro et al. (2012) mostraram que o sistema integrado de cozimento e resfriamento a vácuo, em mexilhão cozido na concha, apresentou perdas de água devido à aplicação de vácuo. Desta forma, as perdas de água, expressas em umidade, ocorreram apenas durante as etapas de processamento (Tabela 2.2) e não durante o armazenamento.

Sivertsvik (2007) avaliou a influência da concentração de CO<sub>2</sub> nas perdas por exsudação em bacalhau armazenado a 0 °C, e observou o aumento da perda de exsudado conforme o aumento do teor de CO<sub>2</sub> nas embalagens. O autor ressalta, porém, que a formação de exsudados também se relaciona com a relação de rigidez e flexibilidade da embalagem, conforme a alteração de CO<sub>2</sub> no *headspace*. Neste trabalho,

porém, não foi evidenciado nenhum efeito da mistura gasosa aplicada (50% CO<sub>2</sub> e 50% N<sub>2</sub>). Porém verificou-se que nas amostras processadas pelo método convencional houve um aumento no exsudado entre o 18° e o 25° dia, provavelmente devido à diferença de processamento, visto que as atmosferas aplicadas foram idênticas em todas as amostras.

iv) *Cor do produto*

Os mexilhões macho e fêmea foram avaliados quanto à variação da coloração durante o armazenamento e com o tipo de processamento. No Apêndice A estão as Tabelas referentes às determinações de L\*, a\* e b\*, que foram utilizados para o cálculo do parâmetro  $\Delta E$  (mudança global de cor).

Não foram avaliadas as mudanças de cor entre machos e fêmeas devido ao fato de que essa diferença de coloração é decorrente da proporção bem maior de pigmentos carotenoides presentes na fêmea em relação aos machos. Nos estágios de gametogênese, os machos possuem teor total de carotenoides em torno de 0,72  $\mu\text{g/g}$  (base seca) enquanto as fêmeas possuem uma média de 4,19  $\mu\text{g/g}$  (base seca). Por outro lado, os machos possuem derivados totais de clorofila nesse mesmo estágio, de 20,59  $\mu\text{g/g}$  (base seca), e sua coloração gonadal é branco leitosa (LOUDA et al., 2008).

A Tabela 2.4 mostra os dados da mudança global ( $\Delta E$ ) de cor e o parâmetro C\* das amostras de mexilhões machos e fêmeas. O  $\Delta E$  mostra que o produto manteve suas características de cor durante todo o período de armazenamento, observado pelos resultados entre o primeiro e último dia. A variação da cor total em carnes pode ser avaliada seguindo a convenção proposta por Abril et al. (2001), onde esta variação é visualmente perceptível para  $\Delta E \geq 0,9$ , de forma que com essa informação, é possível diferenciar as carnes em relação ao pH (faixa inferior e superior a 6,1). Seguindo essa convenção, a variação na cor deveria ser perceptível, o que não ocorreu no caso dos mexilhões, possivelmente devido à heterogeneidade das amostras analisadas. A dificuldade na quantificação da cor se deve à análise destrutiva das amostras, pois a aplicação de atmosfera modificada implica alguns problemas na avaliação da cor, conforme explicam Mancini & Hunt (2005).

Tabela 2.4 - Mudança global da cor ( $\Delta E$ ) e parâmetro C\* para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo.

Tempo (dias)	$\Delta E$ Macho		$\Delta E$ Fêmea		C* Macho		C* Fêmea	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
00	-	-	13,57±0,67 <sup>aA</sup>	14,42±0,86 <sup>aA</sup>	36,38±1,23 <sup>aA</sup>	39,64±2,40 <sub>aAB</sub>	-	-
04	7,37 ±3,02 <sup>aA</sup>	4,74±0,59 <sup>aA</sup>	11,88±0,49 <sup>aA</sup>	13,86±0,95 <sup>aA</sup>	32,38±1,11 <sup>aA</sup>	34,44±3,17 <sub>aAB</sub>	6,35±0,73 <sup>aA</sup>	12,13±3,33 <sup>aA</sup>
07	7,26 ±2,32 <sup>aA</sup>	3,51±0,88 <sup>aA</sup>	14,50±0,80 <sup>aA</sup>	14,11±0,48 <sup>aA</sup>	30,35±2,46 <sup>aA</sup>	35,24±1,81 <sub>aAB</sub>	8,47±2,88 <sup>aA</sup>	7,61±1,58 <sup>aA</sup>
11	8,09±2,66 <sup>aA</sup>	5,23±2,50 <sup>aA</sup>	12,50±0,39 <sup>aA</sup>	12,95±0,43 <sup>aA</sup>	30,46±1,54 <sup>aA</sup>	30,91±1,71 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	7,25±1,61 <sup>aA</sup>	12,52±3,61 <sup>aA</sup>
14	14,00±1,43 <sup>aB</sup>	4,55±1,07 <sup>aA</sup>	14,98±1,94 <sup>aA</sup>	14,14±0,89 <sup>aA</sup>	30,41±0,38 <sup>aA</sup>	30,43±2,04 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	8,49±1,39 <sup>aA</sup>	13,63±3,31 <sup>aA</sup>
18	7,40±2,65 <sup>aA</sup>	3,86±0,90 <sup>aA</sup>	12,71±0,41 <sup>bA</sup>	15,88±0,67 <sup>aA</sup>	33,69±1,80 <sup>aA</sup>	36,08±2,12 <sub>aAB</sub>	5,92±1,30 <sup>aA</sup>	6,82±1,81 <sup>aA</sup>
25	8,84±2,80 <sup>aA</sup>	5,79±0,85 <sup>aA</sup>	12,52±0,22 <sup>aA</sup>	15,27±1,26 <sup>aA</sup>	33,70±1,91 <sup>bA</sup>	41,40±1,12 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	5,82±1,58 <sup>aA</sup>	7,63±1,82 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$ .

Tabela 2.5 - Ângulo *hue* (h) para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo.

Tempo (dias)	h Macho		h Fêmea	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
00	79,80±0,75 <sup>ba</sup>	76,01±1,20 <sup>aAB</sup>	51,77±0,27 <sup>ba</sup>	49,91±0,67 <sup>aA</sup>
04	79,13±0,56 <sup>ba</sup>	76,92±0,68 <sup>aAB</sup>	51,51±0,63 <sup>aA</sup>	50,23±1,12 <sup>aA</sup>
07	74,34±0,46 <sup>bBC</sup>	78,41±0,45 <sup>aB</sup>	50,61±0,36 <sup>ba</sup>	46,84±0,32 <sup>aA</sup>
11	78,22±0,73 <sup>aAB</sup>	77,68±0,86 <sup>aAB</sup>	57,73±6,12 <sup>aA</sup>	48,63±0,96 <sup>aA</sup>
14	72,32±2,13 <sup>bc</sup>	78,63±0,43 <sup>aB</sup>	49,23±1,06 <sup>aA</sup>	47,88±1,31 <sup>aA</sup>
18	77,20±0,84 <sup>aAB</sup>	74,90±0,73 <sup>aA</sup>	50,18±0,44 <sup>aA</sup>	48,79±0,50 <sup>aA</sup>
25	78,12±0,55 <sup>aAB</sup>	76,37±0,89 <sup>aAB</sup>	50,75±0,60 <sup>ba</sup>	48,83±0,29 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$

C\* não teve alteração significativa em relação ao tipo de processamento e durante o tempo de armazenamento ( $p > 0,05$ ) para os mexilhões machos (de 11,88 até 15,88), enquanto para as fêmeas, somente houve variação de C\* com o tempo quando comparado ao 25º dia de armazenamento. O ângulo de matiz para machos. A tabela 2.5 apresentou variação significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao tipo de processo. Para as fêmeas, não houve diferença significativa entre os processos e durante o período de armazenamento.

Os valores de Chroma (C\*) e de L\* são uteis quando se deseja determinar em carne as alterações da coloração em razão de fenômenos como o *rigor mortis* (JEREMIAH, 2001). No caso dos moluscos, esses parâmetros são importantes para avaliação da presença de parasita no produto ou como indicativo de processo de deterioração, seja por via enzimática ou microbiológica, devido as alterações de cor no manto do molusco. O ângulo *hue* ou de tonalidade pode ser influenciado pelo tipo de embalagem aplicada, quando se trata da análise de cor do produto dentro da embalagem (JEREMIAH, 2001). Neste estudo, as análises foram realizadas após a retirada do produto da embalagem, ou seja, não houve influência da embalagem nos resultados.

Estes resultados são favoráveis, visto que a estabilidade da cor é uma das características importantes associadas com a qualidade de produtos cárneos acondicionados sob atmosfera modificada, por ser o primeiro atributo percebido pelo consumidor, pois representa frescor e boas condições para o consumo (NANNERUP et al., 2004).

### 2.2.2 Composição gasosa nas embalagens com mexilhão

A Tabela 2.6 apresenta o comportamento da mistura gasosa (50% CO<sub>2</sub> e 50% N<sub>2</sub>) nos mexilhões nas primeiras 24 horas depois do envase e armazenamento à temperatura de 3 °C. Esta determinação é útil para compreender a cinética de absorção do CO<sub>2</sub> na fração aquosa contida nos mexilhões. Depois deste período, a concentração de CO<sub>2</sub> diminuiu significativamente com o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ), onde a concentração final foi 17,66% no processo convencional (Tabela 2.7). Torrieri et al. (2006) aplicaram seis diferentes atmosferas (0% O<sub>2</sub>-70% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>-70% de CO<sub>2</sub>; de 30% O<sub>2</sub>-60% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub>-60% de CO<sub>2</sub>; de 30% de O<sub>2</sub>-50% de CO<sub>2</sub>; 21% de CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 0%) em peixe lobo do mar e quantificou a composição gasosa no *headspace* e verificaram que em todos os casos, o dióxido de carbono diminui, provavelmente como uma consequência da dissolução de gases no líquido do tecido celular.

Um comportamento do CO<sub>2</sub> semelhante ao encontrado neste trabalho também foi observado por Fernández et al. (2009), que avaliaram o efeito de aditivos naturais, refrigeração e envase sob atmosfera modificada em filetes de salmão do Atlântico. Os autores observaram reduções crescentes de CO<sub>2</sub> no decorrer do armazenamento para todas as condições experimentais, em que durante os seis primeiros dias, a concentração de CO<sub>2</sub> diminuiu cerca de 25% e, a partir do 18º dia, permaneceu constante até o 25º dia. E ao final do tempo de armazenamento, houve uma redução de 30-40% da concentração inicial de CO<sub>2</sub>. Os autores atribuíram que a redução do CO<sub>2</sub> ocorreu devido à solubilidade do CO<sub>2</sub> na água do músculo do salmão (formação de gás carbônico) e por perdas associadas à permeabilidade da embalagem utilizada no trabalho.

Tabela 2.6 - Composição gasosa no *headspace* da embalagem contendo mexilhões processados até 24 horas para amostras condicionadas a 3 °C contendo 50% de CO<sub>2</sub>.

<b>Tempo (h)</b>	<b>CO<sub>2</sub> (%)</b>	<b>O<sub>2</sub> (%)</b>
0	50,70±0,08	0,005±0,003
2	45,83±1,75	0,021±0,003
4	45,65±1,10	0,027±0,007
6	44,43±1,01	0,028±0,009
8	45,26±0,66	0,025±0,002
10	44,01±1,20	0,030±0,008
12	43,76±2,32	0,030±0,006
14	44,48±0,84	0,032±0,004
16	44,03±1,52	0,040±0,018
18	45,11±0,96	0,030±0,004
20	45,08±1,13	0,033±0,004
22	44,18±1,71	0,005±0,002
24	45,16±0,94	0,036±0,002

Os processamentos aos quais os mexilhões foram submetidos não influenciaram nos mecanismos de solubilização do CO<sub>2</sub>, de forma que não foi evidenciada nos resultados de composição gasosa. Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração de O<sub>2</sub> durante o armazenamento dos mexilhões - 0,008 % até 1,58 % para ambos os processos testados. O aumento da concentração de O<sub>2</sub> provavelmente deve-se às propriedades de permeabilidade da embalagem, visto que não foi adicionado O<sub>2</sub> na mistura gasosa empregada. Este teor, porém, não acarreta problema no que se refere à proliferação de micro-organismos aeróbios, uma vez que necessitaria de uma proporção maior de O<sub>2</sub> para permitir o desenvolvimento. Por outro lado, essa permeação ao O<sub>2</sub> pode ser considerada positiva, uma vez que, de acordo com Masniyom, et al. (2011) a inclusão de O<sub>2</sub> em sistemas de atmosfera modificada deve ser considerada no sentido de evitar o aparecimento de bactérias estritamente anaeróbias produtoras de toxinas.

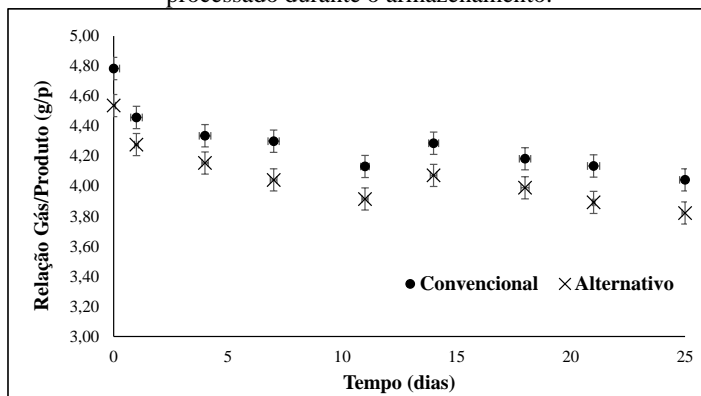
Tabela 2.7 - Composição gasosa (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) medidas no *headspace* das embalagens de mexilhão acondicionado sob atmosfera modificada durante 25 dias de armazenamento a 3 °C.

Tempo (dias)	CO <sub>2</sub> (%)		O <sub>2</sub> (%)	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
0	48,63±0,21	50,70±0,08	0,008±0,001	0,011±0,000
4	40,48±0,15	41,96±0,08	0,103±0,001	0,080±0,001
7	39,85±0,17	39,56±0,05	0,180±0,001	0,155±0,001
11	37,15±0,26	36,95±0,06	0,325±0,009	0,285±0,001
14	33,11±0,75	32,63±0,82	0,452±0,005	0,463±0,015
18	30,80±0,27	28,75±1,11	0,571±0,015	0,674±0,044
21	27,85±0,44	26,41±0,61	0,893±0,035	0,833±0,047
25	17,66±0,03	20,70±0,11	1,580±0,000	1,310±0,000

i) *Proporção gás/produto nas embalagens*

A proporção gás/produto foi quantificada nas mesmas embalagens oriundas dos dois processos durante os 25 dias de armazenamento, como mostrado pela Figura 2.8. A variação dos valores da relação g/p entre as embalagens para ambos os tratamentos (4,5 até 5,0 no tempo inicial) pode estar associada com a máquina de envase, que não adiciona no interior das embalagens volume total de gás exatamente igual. Outro fator foi a permeação do O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> nas embalagens.

Figura 2.8 - Evolução da relação gás/produto das embalagens com mexilhão processado durante o armazenamento.



A avaliação dos dados obtidos no decorrer do armazenamento mostrou que a relação gás/produto diminuiu com o tempo. Esta tendência está de acordo com o comportamento relatado por Rotabakk et al. (2007), que afirmam que a redução da relação gás/produto reflete na diminuição da quantidade de gás presente no *headspace*, ou seja, menos CO<sub>2</sub> para ser dissolvido na massa do produto. Este resultado coincide com o fenômeno de redução da proporção gasosa de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento devido sua solubilidade no mexilhão, conforme mostrado na Tabela 2.7.

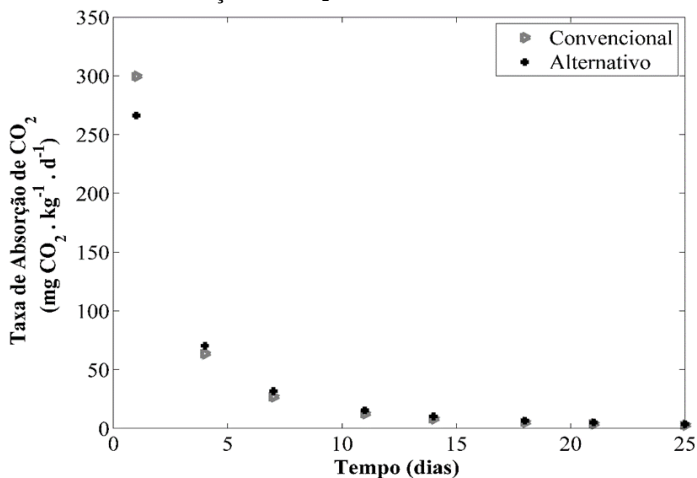
A relação g/p aplicada (em torno de 4,5 a 5,0), está dentro da margem recomendada por Rotabakk et al. (2008), que avaliaram a aplicação do método de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> em alabote do Atlântico, e consideraram o percentual entre 25 e 33 % (ou g/p de 4:1 e 3:1) como ideais para assegurar o efeito bacteriostático do CO<sub>2</sub> e para prevenção do colapso da embalagem. Esta relação g/p também está de acordo com as recomendações de Sivertsvik et al. (2002) que relatam que a relação g/p usada deve ser de 2:1 ou 3:1 (onde o volume do gás deve ser pelo menos o dobro ou o triplo da quantidade de produto), principalmente quando se trata de alimentos com elevado teor de umidade.

Rotabakk et al. (2007) determinaram a solubilidade de CO<sub>2</sub> em bacalhau acondicionado sob 60% de CO<sub>2</sub> e 40% de N<sub>2</sub> inicial, utilizando grau de enchimento em torno de 31,2 % e observaram que a concentração de CO<sub>2</sub> no produto aumentou durante as primeiras 26 horas, juntamente com o grau de enchimento, representando a redução de CO<sub>2</sub> no *headspace* da embalagem.

A utilização de um grau de enchimento considerado adequado (25 – 33%) ou g/p (4:1 – 3:1) proporciona a conservação do alimento devido ao efeito bacteriostático do CO<sub>2</sub>, o que atinge o objetivo do acondicionamento sob atmosfera modificada. Porém, quando a questão de transporte e comercialização é considerada, necessita-se de um volume alto de embalagem para comportar essa condição, o que resulta em baixo rendimento de embalagem em relação ao produto embalado. A taxa de absorção do CO<sub>2</sub> calculada para os mexilhões durante os 25 dias de armazenamento indica diferença nas taxas obtidas para os processos estudados (299,6 mg CO<sub>2</sub>.kg produto.h<sup>-1</sup> para o processo convencional e 266,37 mg CO<sub>2</sub>.kg produto.h<sup>-1</sup> para o processo alternativo). A taxa de absorção do CO<sub>2</sub> reduziu até o momento em que o pseudo equilíbrio foi atingido, e depois deste, a solubilização do CO<sub>2</sub> continuou a uma taxa mais baixa, de acordo com a Figura 2.9.



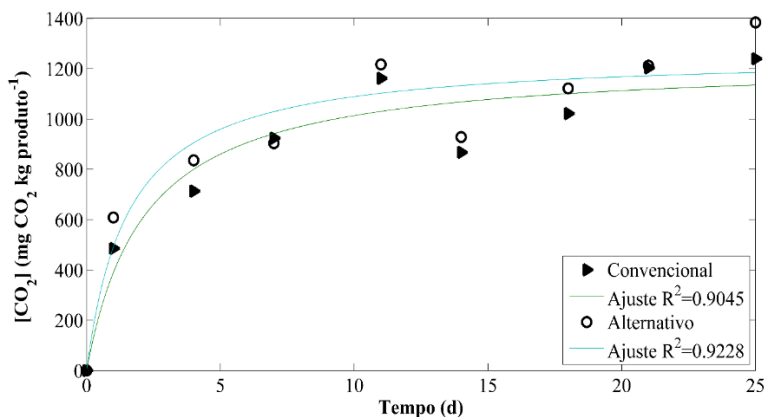
Figura 2.9 - Taxa de absorção de CO<sub>2</sub> nos mexilhões durante 25 dias.



ii) *Concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido nos mexilhões*

A média dos resultados para cada processo obtido para a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido nos mexilhões está apresentada na Figura 2.10. O volume médio de amostras foi de  $96,41 \pm 0,2$  cm<sup>3</sup> de mexilhões em um volume total médio de  $372,31 \pm 20,63$  cm<sup>3</sup> para as amostras do processo convencional e  $344 \pm 9,76$  cm<sup>3</sup> de volume total para o processo alternativo. Nos dois casos, as concentrações de CO<sub>2</sub> no produto aumentaram com o tempo de armazenamento, e durante as primeiras 24 horas foi encontrada  $638,36$  mg CO<sub>2</sub>.kg produto<sup>-1</sup> para o processo convencional e  $485,28$  mg CO<sub>2</sub>.kg produto<sup>-1</sup> para o processo alternativo, a temperatura de 3 °C. Os valores mais elevados de CO<sub>2</sub> dissolvido para o processo convencional (média de mais de  $125$  mg CO<sub>2</sub>.kg produto<sup>-1</sup> em relação ao processo alternativo para cada ponto experimental) pode ser explicado pelas diferenças na umidade entre os processos devido à alta solubilidade do CO<sub>2</sub> na água (SIVERTSVIK et al., 2000). Contudo, estas diferenças nas concentrações de CO<sub>2</sub> não comprometeram a efetividade bacteriostática do CO<sub>2</sub> para ambos os tratamentos.

Figura 2.10 Concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido em mexilhões cozidos, a 3 °C durante 25 dias.



A concentração final média de CO<sub>2</sub> para os mexilhões durante 25 dias foi de 1384,03 mg CO<sub>2</sub>.kg produto<sup>-1</sup> para o processo convencional e 1239,67 mg CO<sub>2</sub>.kg produto<sup>-1</sup> para o processo alternativo. Este aumento na quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido confirma o que também pode ser observado com a composição gasosa e análise do g/p, que mostraram decréscimo do volume nas embalagens e o percentual de CO<sub>2</sub> no *headspace* com o tempo de armazenamento, devido à solubilidade do CO<sub>2</sub> nos mexilhões. O uso de um apropriado g/p assegura a solubilização do CO<sub>2</sub> e se obtém uma boa concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido. Zhao et al. (1995) mostram o aumento da solubilidade de CO<sub>2</sub> em carne aumentando o *headspace* da embalagem. Devlieghere et al. (1998) mostram que os fatores mais importantes que determinaram a quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido no meio aquoso de caldo BHI inoculado com *Pseudomonas fluorescens* foram a relação gás/produto e a concentração inicial de CO<sub>2</sub> na fase gasosa.

Jakobsen & Bertelsen (2004) mostraram que a produção de ácido carbônico como consequência do CO<sub>2</sub> absorvido na carne promove uma tendência a reduzir o pH dos alimentos, quando comparado com o pH inicial. A concentração de CO<sub>2</sub> não influenciou o pH neste trabalho (Tabela 2.1) cujos valores não mudaram durante o tempo de armazenamento, embora a concentração de CO<sub>2</sub> tenha aumentado com o tempo.

A atmosfera modificada é uma proposta interessante para auxiliar no controle do crescimento microbiano para aumentar a vida útil dos mexilhões cozidos. Ulusoy & Özden (2011) aplicaram duas misturas gasosas (50% N<sub>2</sub>/50% CO<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) usadas como atmosfera modificada para o armazenamento resfriado a 4°C de mexilhões recheados e obtiveram 13 dias de vida útil. Contudo, não se sabe qual a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvida nos mexilhões. No presente estudo, os mexilhões tiveram uma vida útil mais longa, de 25 dias.

A absorção do CO<sub>2</sub> na água e nos lipídios mostra diferentes comportamentos de acordo com a temperatura (JAKOBSEN & BERTELSEN, 2004). Por causa disso, o CO<sub>2</sub> dissolvido nos mexilhões também depende da temperatura de armazenamento e de suas características, físico-químicas, pois os mexilhões são considerados um alimento com elevado teor de água e baixa gordura (LIMA et al., 2013).

### **2.2.3 Avaliação microbiológica das amostras de mexilhão submetidas ao processamento convencional e alternativo.**

A Tabela 2.8 mostra a contagem microbiana para as amostras de mexilhão para o processo de cozimento convencional e alternativo para cada etapa do processamento.

A contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos no decorrer das etapas do processamento pelo método convencional foi de  $5,1 \times 10^3$  UFC/g para  $1,0 \times 10^3$  UFC/g. A contagem se manteve, o que indica que não houve recontaminação nas etapas de processo. O processamento alternativo proporcionou redução na contagem total microbiana, de  $1,2 \times 10^2$  UFC/g para  $<1,0 \times 10^1$  UFC/g. Os valores são semelhantes aos obtidos por Cavalheiro et al. (2012), que avaliaram as contagens totais de mesófilos em mexilhões *in natura* e processados a vácuo e da forma convencional e obtiveram contagens de  $3,0 \times 10^2$  UFC/g nos mexilhões frescos e redução destes após os processamentos para  $2,2 \times 10^1$  UFC/g (batelada 1) e  $1,2 \times 10^2$  UFC/g (batelada 2) nas amostras processadas pelo método alternativo (cozimento a vapor e resfriamento a vácuo) e para  $2,9 \times 10^2$  UFC/g (batelada 1) e  $2,2 \times 10^2$  UFC/g (batelada 2) nas amostras processadas pelo método tradicional (cozimento a vapor e resfriamento imerso).

Tabela 2.8 – Contagem de aeróbios mesófilos e presença de *Vibrio sp* de mexilhões durante o processamento utilizando utilizando o método convencional e o método alternativo.

Etapa do processamento	Aeróbios mesófilos (UFC/g)		<i>Vibrio sp.</i>	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
<i>In natura</i>	5,1x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	Presença	Presença
Pré-cocção (3 min.)	-	2,0x10 <sup>1</sup>	-	Ausência
Cocção (6 min.)	1,0x10 <sup>2</sup>	-	Ausência	-
Resfriamento por imersão	1,0x10 <sup>2</sup>	-	Ausência	-
Cocção (3 min) e Resfriamento a vácuo	-	<1,0x10 <sup>1</sup>	-	Ausência
Tempo (dias)	Armazenamento			
Após os processos - 0	1,0x10 <sup>3</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	Ausência	Ausência
4	1,1x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>2</sup>	Ausência	Ausência
7	2,1x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>2</sup>	Ausência	Ausência
11	1,0x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>	Ausência	Ausência
14	3,0 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>2</sup>	Ausência	Ausência
18	9,0 x 10 <sup>2</sup>	2,8 x 10 <sup>2</sup>	Ausência	Ausência
25	5,0 x 10 <sup>2</sup>	4,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência	Ausência

O comportamento da microbiota das amostras durante o período de armazenamento apresentou-se estável até o 11º dia, após esse período observou-se uma redução para 5,0 x 10<sup>2</sup> UFC/g até o 25º dia no processamento convencional e no alternativo a contagem média foi na ordem de 10<sup>2</sup> UFC/g até o 18º dia, e após esse período houve uma redução para 4,0 x 10<sup>1</sup> UFC/g. Essa queda pode ser atribuída à inibição do grupo microbiano pela combinação da ação do CO<sub>2</sub> e a menor umidade consequente do processo alternativo.

Estes valores de contagem total estão dentro de uma faixa adequada para comercialização do produto, embora a Legislação Brasileira não mencione padrões microbiológicos para contagem total de mesófilos em mexilhão, contagens da ordem de 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup> UFC/g geralmente conferem excelentes condições microbiológicas para

produtos cárneos refrigerados, pois a probabilidade destes produtos se deteriorarem em curto período de tempo e/ou causarem toxinfecções alimentares é muito baixa (SPOTO et al., 1999). Seria preocupante se as contagens atingissem os níveis críticos totais estabelecidos para a degradação de carne, conforme Insausti et al. (2001), que encontraram contagem total limite de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g na degradação de carne.

A presença de *Vibrio* sp foi observada nos mexilhões *in natura*, nos lotes submetidos a ambos os processos. A presença de *Vibrio* sp no mexilhão *in natura* varia com o período de coleta. As temperaturas mais altas da água de cultivo proporcionam o crescimento deste micro-organismo, nativo da microbiota da água marinha, conforme mostrado por Lima et al. (2013) para mexilhões, De Mattos (2013) e Oliveira et al. (2011) para ostras. O *Vibrio* sp, em especial o *Vibrio parahaemolyticus*, está presente em peixes e frutos do mar, em quantidade inferior a  $10^3$  UFC/g, já em águas mornas a contagem atinge até  $10^6$  UFC/g. A proliferação desse micro-organismo está associada à refrigeração inadequada de frutos do mar contaminados. A cocção com temperatura maior do que  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  e resfriamento a temperatura inferior à  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  após a coleta são suficientes para seu controle. Os processos aplicados eliminaram este micro-organismo. Do contrário, o isolamento de qualquer espécie de *Vibrio* sp a partir de produtos cozidos indicaria práticas inadequadas de higiene, pois esse micro-organismo é destruído rapidamente pelo calor (FORSYTHE, 2002). Assim, a presença de *Vibrio* sp no mexilhão é mais frequente durante os meses mais quentes do ano, de forma que neste período devem ser reforçados os cuidados para evitar a ingestão deste produto na forma *in natura* ou pré-cozida pelo consumidor.

Os resultados mostram que o tratamento térmico foi efetivo para a eliminação de *Vibrio* sp. nos mexilhões contaminados, e que não houve contaminação cruzada durante o processamento. Isto indica que os procedimentos adotados são capazes de evitar os problemas de recontaminação no processo de mexilhões conforme relatadas por Lima et al. (2013), que encontrou recontaminação do mexilhão por *Vibrio* sp. após as operações de resfriamento e nos produtos pronto ao consumo em estudo realizado em uma indústria local. A eliminação de *Vibrio* sp neste trabalho é importante, por ser um requisito para que o produto tenha condições de comercialização, principalmente devido ao *Vibrio parahaemolyticus*, que tem causado gastroenterites agudas, conhecidas por sintomas desintéricos, especialmente depois do consumo de pescado, camarão e ostras frescas (SOCCOL & OETTERER, 2003). A contagem

de micro-organismos psicrófilos também foi avaliada durante as etapas de processamento e armazenamento, conforme apresenta a Tabela 2.9.

Os tratamentos térmicos de ambos os processos foram eficazes e reduziram a contagem de psicrotóxicos do mexilhão ( $1,2 \times 10^3$  para  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g). Esta baixa contagem é essencial para a conservação do produto, tendo em vista que o armazenamento ocorre à temperatura de refrigeração e esse grupo de micro-organismos é responsável por reações de degradação e representa uma ameaça à manutenção das suas características sensoriais. Durante o armazenamento, houve um aumento na contagem na ordem de  $10^2$  UFC/g, em relação ao período inicial de armazenamento, para o processo convencional. Para o processo alternativo, a contagem manteve-se na ordem de  $10^1$  UFC/g).

Com o conjunto de procedimentos adotados neste trabalho, o mexilhão cozido e resfriado atingiu uma vida útil de 25 dias, considerando suas características físico-químicas e microbiológicas, superior ao encontrado por Lima et al. (2013), que avaliou mexilhões pré-cozidos e resfriados em uma indústria de Santa Catarina, onde apresentaram condições de consumo apenas até o 12º dia de armazenamento. O processo alternativo associado às condições ótimas de condicionamento é um passo importante para a cadeia produtiva de mexilhão, porque possibilita o transporte e comercialização do produto em regiões distantes do litoral, o que no momento é inviável, visto que sua degradação é muito rápida quando estão presentes contagens microbianas mais elevadas, levando-se em conta que a velocidade da degradação depende do tipo de alimento, podendo ocorrer dentro de um dia ou dois para alimentos perecíveis, atingindo níveis de  $10^8$  UFC/g, o que deve ser evitado (FRANÇA FILHO et al., 2006).

Na literatura existem diversos estudos sobre a conservação do mexilhão fresco, com sua evolução durante o armazenamento e com uso de técnicas como atmosfera modificada na sua conservação (MASNIYOM et al. 2011; ERKAN, 2005; GOULAS et al., 2005; KHAN, PARRISH & SHAHIDI, 2005; HO, LEE & YAM, 1997). No entanto, existem poucas informações sobre a avaliação da qualidade de mexilhões cozidos e resfriados durante o armazenamento.

O uso de atmosfera modificada combinada com temperaturas de refrigeração tem se mostrado eficiente no controle da microbiota total de vários produtos marinhos, como o demonstrado por Chen & Xiong (2008), para lagostas de garra vermelhas pré-cozidas e acondicionadas sob atmosfera modificada a 2 °C, mantendo a contagem total em torno de  $10^3$

UFC/g, durante 21 dias. Outro detalhe observado pelos autores é que a atmosfera modificada foi mais efetiva no produto pré-cozido do que no produto *in natura*, utilizando uma relação g/p elevada (~20:1).

Tabela 2.9 – Contagem de micro-organismos psicrófilos em mexilhões durante o processamento utilizando o método convencional e o método alternativo acondicionado com atmosfera modificada.

Etapa do processamento	Micro-organismos psicrófilos (UFC/g)	
	Convencional	Alternativo
<i>In natura</i>	1,2x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>
Pré-cozido (3 min.)	-	6,7x10 <sup>3</sup>
Cocção (6 min.)	2,0x10 <sup>2</sup>	-
Resfriamento por imersão	<1,0x10 <sup>1</sup>	-
Resfriamento à vácuo	-	<1,0x10 <sup>1</sup>
Tempo (dias)	Armazenamento	
Após o processamento - 0	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>
4	1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>
7	1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>
11	4,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>
14	2,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>
18	2,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>
25	1,0x10 <sup>2</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>

No presente estudo, os resultados microbiológicos indicam que o produto tem condições sanitárias adequadas perante os processamentos testados. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho foram decorrentes da aplicação dos processos combinados com as Boas Práticas de Fabricação e das operações de higienização, além do monitoramento de condições estáveis de temperatura durante o armazenamento. O processamento alternativo foi efetivo para a manutenção das propriedades microbiológicas do mexilhão, combinado com a ação bacteriostática de CO<sub>2</sub> da atmosfera modificada durante o armazenamento do produto.

### 2.3 Conclusões

O processamento alternativo para mexilhões é uma possibilidade para resolver o problema com exsudação nas embalagens flexíveis, porque a CRA e a umidade foram reduzidas no mexilhão devido a aplicação do vácuo que abriam os poros e facilitaram a perda de água

durante o processo, sem afetar as características físico-químicas. Não houve recontaminação por *Vibrio* sp. e a contagem microbiana foi reduzida em virtude da baixa manipulação do produto e a ação do vácuo, que prejudicaram os micro-organismos. A concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido para as amostras sob atmosfera modificada contribuíram para as contagens mais baixas de bactérias mesófilas e psicrófilas durante o período de armazenamento. O processo alternativo combinado com a ação do envase sob atmosfera modificada demonstrou ser vantajoso por manter as características físico-químicas e microbiológicas do produto. Houve um ganho na vida útil de 15 dias, quando comparados a estudos prévios com o processo convencional.

Assim, o processo alternativo é uma proposta interessante para a indústria de processamento de mexilhão visto que essa técnica emprega cocção e resfriamento realizados no mesmo equipamento. O processo foi eficiente para controlar a exsudação e a recontaminação microbiana nos mexilhões, proporcionando um produto com características físico-químicas e microbiológicas mais estáveis do que o produto obtido pela maneira convencional.



## REFERÊNCIAS

- ABRIL, M.; CAMPO, M. M.; ONENC, A.; SANUDO, C.; ALBERTI, P.; NEGUERUELA, A. L. Beef color evolution as a function of ultimate pH. **Meat Science**, v. 58, n. 1, p. 69–78, 2001.
- ANDERSEN, H. J. What is pork quality? In Quality of meat and fat in pigs as affected by genetics and nutrition. **EAAP Publication, Zurich, Switzerland**, 100, 15–26, 2000.
- A.P.H.A. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Baltimore: Maryland. (2001).
- ASHIE, N. A.; SIMPSON, B. K. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. **Food Research International**, v. 29(5-6), p. 569-575, 1996.
- Brasil. Ministério da Agricultura. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. RIISPOA. Brasília, 1980.
- CAGLAK, E.; CAKLI, S.; KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1293-1299, 2008.
- CAVALHEIRO D.; SCHMIDT F. C.; RODRIGUES L. G. G.; SIGA C.; LEITEMPERGHER, F.; LAURINDO, J. B. Processing of *Perna perna* mussels using integrated process of cooking and vacuum cooling. **Journal of Food Process Engineering**, ISSN 1745-4530, 2012.
- CHAN, N. Y.; HOSSAIN, M. M.; BROOKS, M. S. A preliminary study of protein recovery from mussel blanching water by a foaming process. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 501–504, 2006.
- CHEN, G.; XIONG, Y. L. Shelf-stability enhancement of precooked red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) tails by modified CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> gas packaging. **LWT**, v. 41, p. 1431–1436, 2008.

CORDEIRO, D.; LOPES, T. G. G.; OETTERER, M.; PORTO, E.; GALVÃO, J. A. Qualidade do Mexilhão *Perna perna* Submetido ao Processo Combinado de Cocção, Congelamento e Armazenamento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n.1, p. 165-179, jan.-jun. 2007.

DE MATOS, K. H. O. **Inativação microbiana em ostras (*Crassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico**. 2013. 137 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2013.

DESMOND, E. M.; KENNY, T. A.; WARD, P.; SUN, D-W. Effect of rapid and conventional cooling methods on the quality of cooked ham joints. **Meat Science**, v. 56, p. 271 – 277, 2000.

DESMOND, E. M.; KENNY, T. A.; WARD, P. The effect of injection level and cooling method on the quality of cooked ham joints. **Meat Science**, v. 60, p. 271–277, 2002.

DEVLIEGHIERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 105-113, 1998.

ERDOGDU, F.; BALABAN, M.O.; OTWELL, W.S.; GARRIDO, L. Cook-related yield loss for Pacific white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 297–300, 2004.

ERKAN, N. Changes in quality characteristics during cold storage of shucked mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and selected chemical decomposition indicators. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2625–2630, 2005.

FERNÁNDEZ, K.; ASPE, E.; ROECKEL, M. Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. **Food Control**, v. 20, p. 1036–1042, 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 424 p, 2002.

FRANÇA FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7(3), p. 315-325, 2006.

GALVÃO, J. A.; FURLAN É. F.; SALÁN E. O.; PORTO E.; OETTERER, M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da Água e dos Mexilhões Cultivados na Região de Ubatuba, SP. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 30(6), p. 1124-1129, 2006.

GOULAS, A. E.; CHOULIARA, I.; NESSI, E.; KONTOMINAS, M. G.; SAWAIDIS, I. N. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 752-760, 2005.

HO, Y. C.; LEE, T-CH.; YAM, K. L. Respiration rates of live clams (*Mercenaria mercenaria*; Hard clams) in modified atmospheres at various temperatures. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 6(1), p. 37-51, 1997.

HUBER, E.; SOARES L. P.; LAURINDO, J. B. Vacuum cooling of pre-cooked mussels for small scale. **Alimentos e Nutrição de Araraquara**, v. 14(2), p. 165-170, 2003.

HUBER, E. **Resfriamento a vácuo de cortes de carnes após o cozimento**. Florianópolis, 2004. 85 p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo, 2009.

INSAUSTI, K.; BERIAIN, M. J.; PURROY, A.; ALBERTI, P.; GORRAIZ, C.; ALZUETA, M. J. Shelf life of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. **Meat Science**, v. 57, p. 273–281, 2001.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**, 68, 603 – 610, 2004.

JEREMIAH, L. E. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. **Food Research International**, v. 34, p. 749-772, 2001.

KHAN, M. A.; PARRISH, C. C.; SHAHIDI, F. Enumeration of total heterotrophic bacteria using different types of agar to evaluate the microbial quality of the blue mussels (*Mytilus edulis*) and sea scallops (*Placopecten magellanicus*). **Food Research International**, v. 38, p. 751–758, 2005.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. Trad. Jane Maria Rubensam. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384p

LIMA, M.; MELO, M. C. L.; MONTEIRO, A. R. Evaluation of the processing of *Perna perna* mussels: the influence of water quality involved in the cooling operations in the physico-chemical and microbiological characteristics of the product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93(13), p.3322-3329, 2013.

LIMA, M. **Avaliação das condições de processamento de mexilhões *Perna perna* pré-cozidos e resfriados**. 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LOUDA, J. W.; NETO, R. R.; MAGALHÃES, A. R. M.; SCHNEIDER, V. F. Pigment alterations in the brown mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. v. 150, p. 385-394, 2008.

- MANCINI, R. A.; HUNT, M. C. Review: Current research in meat color. **Meat Science**, v. 71, p. 100-121, 2005.
- MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Extending the shelf-life of refrigerated green mussel (*Perna viridis*) under modified atmosphere packaging. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 33(2), p. 171-179, 2011.
- MCDONALD, K.; SUN, D-W.; KENMY, T. The effect of injection level on the quality of a rapid vacuum cooled cooked beef product. **Journal of Food Engineering**, v. 47, p. 139–147, 2001.
- MCDONALD, K.; SUN, D-W.; KENNY, T. Comparison of the quality of cooked beef products cooled by vacuum cooling and by conventional cooling. **Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie**, v. 33, p. 21–29, 2000.
- MENDES, R.; SILVA, H. A.; ANACLETO, P.; CARDOSO, C. Effect of CO<sub>2</sub> dissolution on the shelf –life of ready-to-eat *Octopus vulgaris*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 551-561, 2011.
- NANNERUP, L. D.; JAKOBSEN, M.; BERG, F. V.; JENSEN, J. S.; MØLLER, J. K. S.; BERTELSEN, G. Optimizing colour quality of modified atmosphere packed sliced meat products by control of critical packaging parameters. **Meat Science**, v. 68, p. 577–585, 2004.
- OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J. L.; PEREIRA, M. J. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, p. 805-816, 2011.
- OTTO, G.; ROEHE, R.; LOOFT, H.; THOELKING, L.; HENNING, M.; PLASTOW, G. S.; KALM, E. Drip loss of case-ready meat and of premium cuts and their associations with earlier measured sample drip loss, meat quality and carcass traits in pigs. **Meat Science**, v. 72, p. 680–687, 2006.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição Centesimal e de Minerais de Mariscos Crus e Cozidos da Cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 21(2), p. 154-157, 2001.

PULGAR, J. S.; GÁSQUEZ, A.; RUIZ-CARRASCAL, J. Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time. **Meat Science**, v. 90, p. 828–835, 2012.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Solubility, absorption and desorption of carbon dioxide in chicken breast fillets. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 442-446, 2010.

ROTABAKK, B. T.; WYLLER, J.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008a.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14(2), p. 179-186, 2008b.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 43-50, 2007.

SALÁN, E. O. **Tratamento térmico de mexilhões *Perna perna* como forma de assegurar a qualidade: validação do crescimento de *Bacillus cereus* e de *Staphylococcus aureus***. Piracicaba, 2005. 88 p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo – USP.

SCHMIDT, F. C.; ARAGÃO, G. M. F.; LAURINDO, J. B. Integrated cooking and vacuum cooling of chicken breast cuts in a single vessel. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 219–224, 2010.

SIVERTSVIK, M. The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and 37ml/100ml carbon dioxide, **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p. 430-438, 2007.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilisation, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). **Food Science and Technology International**, v. 12(5), p. 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, K.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 107-127, 2002.

SOCCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, n.4, p.569-580, 2003.

SPOTO, M. H. F.; GALLO, C. R.; DOMARCO, R. E.; ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; BLUMER, L. Radiação gama na redução da carga microbiana de filés de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19(3), Campinas, Sept./Dec. 1999.

TAVARES, M.; MELLO, M. R. P.; CAMPOS, N. C.; MORAIS, C.; OSTINI, S. Proximate composition and caloric value of the mussel *Perna perna*, cultivated in Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 473-475, 1998.

SUN, D-W.; ZHENG, L. Vacuum cooling technology for the agri-food industry: Past, present and future. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 203–214, 2006.

TORRIERI, E.; CAVELLA, S.; VILLANI, F.; MASI, P. Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 1078–1086, 2006.

TORRIERI, E.; CAVELLA, S.; MASI, P. Modelling the respiration rate of fresh-cut *Annurca* apples to develop modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 890–899, 2009.

ULUSOV, S.; ÖZDEN, Ö. Preservation of stuffed mussels at 4°C in modified atmosphere packaging. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20 (3), p. 319–330, 2011.

ZHAO, Y. Y.; WELLS, J. H.; MCMILLIN, K. W. Dynamic changes of headspace gases in CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> packaged fresh beef. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 571–575, 1995.



### **CAPÍTULO 3:**

**APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> EM MEXILHÃO: AVALIAÇÃO DO  
MECANISMO DE ABSORÇÃO DURANTE O PROCESSO DE  
PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO (SGS).**



### **3 APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> EM MEXILHÃO *Perna perna*: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE ABSORÇÃO DURANTE O PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO (SGS).**

#### **3.1 Introdução**

O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), é um molusco bivalve conhecido internacionalmente como “*brown mussel*”. O cultivo do mexilhão tem uma alta produtividade devido aos baixos custos de produção, fácil manuseio, além do alto valor nutricional (DIAS et al. 2010). A costa do Estado de Santa Catarina tem condições climáticas e ambientais adequadas para o seu cultivo, resultando em uma atividade econômica em expansão que iniciou na década de 80 do século passado e ganhou espaço no cenário nacional, estabelecendo-se como o maior produtor de moluscos no Brasil. Com isso, há um interesse em melhorar toda a cadeia de produção, desde o acompanhamento do monitoramento do ambiente marinho, passando pela coleta até a obtenção do produto final (MARQUES et al., 1998; RESGALLA JR et al., 2007; SÁENZ et al., 2010; SILVA et al., 2010; LIMA et al., 2013).

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o gás mais importante em sistemas de atmosfera modificada, devido ao seu efeito bacteriostático. Sob altas concentrações, menor é a respiração e a velocidade de crescimento microbianas (SIMPSON et al., 2009). A solubilidade do CO<sub>2</sub> é potencializada com baixas temperaturas e também por altas pressões. Contudo, a pressão elevada não aumentará a velocidade difusional, porque o processo de difusão segue a 2ª Lei de Fick. A taxa de absorção do CO<sub>2</sub> não é afetada pela pressão total, mas, principalmente, dependente do nível de percentagem de CO<sub>2</sub>. (MENDES & GONÇALVES, 2008). O que significa que a mesma quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido pode ser obtida utilizando períodos de 3h a 100 % de CO<sub>2</sub> ou teor de 50 % CO<sub>2</sub> por 48 h. Isto ocorre por conta do que descreve a Lei de Henry, onde a quantidade de gás que dissolve em um líquido é proporcional à pressão parcial do gás sobre o líquido, ou seja, na fração líquida presente no alimento (SIVERTSVIK et al., 2004a).

A solubilização do CO<sub>2</sub> nos alimentos para ser efetiva necessita de uma certa quantidade de gás para reagir com o meio. Para isto, a relação g/p usada é que determina a relação entre o volume de gás e o volume de produto, aplicada em geral na proporção de 2:1 ou 3:1 (volume de gás duas ou três vezes maior que o volume de alimento). Esta elevada

relação g/p é necessária para prevenir o colapso da embalagem, devido ao CO<sub>2</sub> solubilizado ocupar menos volume do que a forma gasosa (SIVERTSVIK et al., 2004a). Para o envase de frutos do mar, uma relação g/p de 2:1 ou 3:1 é recomendado para um processo eficaz (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006).

O processo de pré-solubilização (SGS) do CO<sub>2</sub> em alimentos é um método alternativo ao envase tradicional sob atmosfera modificada, usado para assegurar a ação bacteriostática do CO<sub>2</sub>. Tem como objetivo reduzir o tamanho da embalagem evitando o problema de murchamento ou colapso nas mesmas, através da solubilização do CO<sub>2</sub> na água e no conteúdo lipídico do alimento antes do envase final. Este método avalia a influência de parâmetros extrínsecos (relação g/p, nível inicial de CO<sub>2</sub>, pressão total e temperatura no sistema embalagem-*headspace*-alimento) e também parâmetros intrínsecos como pH, água, sal e teor de lipídios (SIVERTSVIK et al., 2004a, SIVERTSVIK et al., 2004b; SIVERTSVIK & JENSEN, 2005; SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; ROTABAKK et al., 2008a, 2008b).

A absorção de CO<sub>2</sub> durante o processo SGS pode ser representado pela variação da massa no meio gasoso como função da variação da pressão em embalagens rígidas, ou variação de volume nas embalagens flexíveis (SIMPSON et al., 2009).

A preservação de moluscos cozidos com atmosfera modificada é ainda restrita, e especialmente para mexilhões, o mecanismo de absorção do CO<sub>2</sub> não está elucidado e depende de muitos fatores, incluindo a sua microestrutura. Este trabalho teve como objetivo avaliar a absorção de CO<sub>2</sub> em mexilhões desconchados (*Perna perna*) após o processo de pré-solubilização sob condições de volume constante.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Processamento dos mexilhões**

Os mexilhões frescos foram escovados sob água corrente para a remoção da sujeira da superfície das conchas. Após isso, os mexilhões foram submetidos ao tratamento térmico sob vapor, na temperatura de 100 °C durante 6 minutos para a abertura das conchas e para reduzir a microbiota presente. Após a pré-cocção, os mexilhões foram resfriados

em tanque com água e gelo à 10 °C durante 10 minutos. Os mexilhões foram manualmente descascados e a carne obtida submetida ao processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Caracterização do mexilhão

Foram realizadas análises para a caracterização macroscópica e microscópica das amostras de acordo com as seguintes análises:

i) *Massa específica real e massa específica aparente do mexilhão*

A massa específica real ( $\rho_r$ ) foi realizada em equipamento Accu Pyc II 1340 da Micromeritics, utilizando-se a técnica de picnometria em gás Hélio, de acordo com o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos. O mexilhão previamente desidratado foi utilizado nas análises, onde aproximadamente 4,7 g de amostra foram depositadas em uma cápsula metálica e inseridas no equipamento para a determinação da densidade real, expressa em  $kg.m^{-3}$ .

A massa específica aparente ( $\rho_a$ ) foi realizada pelo método de deslocamento de volume na proveta. Uma proveta contendo 300 mL água destilada, a temperatura ambiente, foi utilizada e aproximadamente 50 g de mexilhão desconchado inteiro, foi imerso e o volume deslocado era medido.

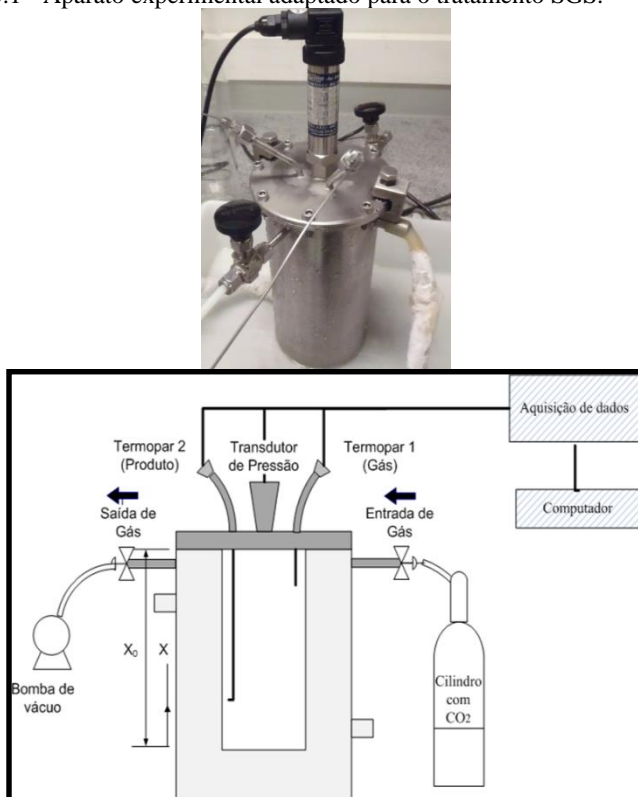
ii) *Caracterização microestrutural do mexilhão*

A superfície do mexilhão foi caracterizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC. As amostras foram obtidas através do corte de pequenas seções do manto do mexilhão com bisturi cirúrgico e submetidas ao processo de liofilização durante 24 horas para remover toda a umidade residual. As amostras foram montadas em placas de alumínio adicionais e revestida com ouro em equipamento recobridor-aniônico de ouro (LEICA, EM SCD500, Germany). As amostras foram posteriormente analisadas por um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390LV (Japão) operando a 10 kV.

### 3.2.3 Pré-solubilização do CO<sub>2</sub> em mexilhão *Perna perna* (método SGS – *Soluble Gas Stabilization*)

O processo de SGS dos mexilhões, bem como a solubilidade e da taxa de dissolução do CO<sub>2</sub> em água e no produto foi realizado usando aparato experimental descrito na Figura 3.1. O volume interno livre total do equipamento, que inclui o volume livre das válvulas e conexões, foi calculado para maior precisão dos resultados, e foi de 526 cm<sup>3</sup>, obtido através da medição das áreas internas de todas as partes do sistema. A Figura 3.1 apresenta o aparato experimental e o esquema representativo dos elementos que constituem o sistema.

Figura 3.1 - Aparato experimental adaptado para o tratamento SGS.



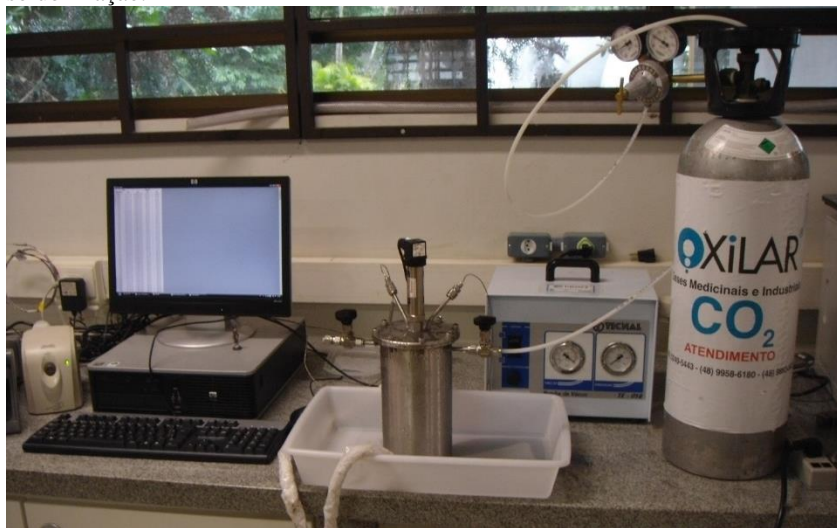
A unidade experimental consiste em um recipiente cilíndrico encamisado em aço inoxidável (316 L), com dimensões internas de 57 mm de diâmetro e 200,5 mm de altura. A temperatura do sistema foi mantida constante pela passagem de água na camisa conectada a um banho termostatzado (Quimis, 6214m2, Brasil).

A temperatura do gás e do produto foi registrada com o uso de dois termopares do tipo J (Salvi Casagrande – Brasil), que foram calibrados e instalados no interior do sistema. Para a vedação completa dos orifícios de entrada dos termopares, utilizaram-se conexões com vedação facial através de O-Ring VCO de diâmetro de cada termopar (Swagelok, Brasil).

A entrada e saída de gás do sistema foram equipadas com duas válvulas do tipo agulha (Swagelok, Brasil). A entrada é conectada ao cilindro com CO<sub>2</sub> (Linde, 99,9% de pureza, Brasil) através de um tubo de nylon, e após a válvula de saída de gás e alívio de pressão foi adaptada um sistema de encaixe para conectar ao analisador de gás (Checkmate II, PBI-Dansensor, Dinamarca), para determinação contínua da composição gasosa.

A pressão total do sistema foi medida por um transdutor de pressão relativa (Warme WTP-4010, 0-10V, Brasil). O transdutor de pressão e os termopares foram ligados a um sistema de aquisição de dados (Agilent, Data Acquisition 34970A, EUA), conectado ao computador com auxílio do *software* Benchlink Data Logger 3.0 (Agilent, 2009), como mostra a Figura 3.2. Os dados de pressão e temperatura foram coletados a cada 30 segundos durante todo o período de experimento.

Figura 3.2 - Conjunto de equipamentos para a execução dos tratamentos de pré-solubilização.



*i) Testes preliminares de vedação no aparato experimental*

O fechamento hermético do aparato foi verificado com a realização de testes de vedação em condições isotérmicas, onde o CO<sub>2</sub> foi injetado no recipiente vazio e mantido por aproximadamente 24 horas sob diferentes pressões (400; 500; 800 e 900 kPa) e temperatura média de 4 °C.

*ii) Validação do aparato experimental com água*

O aparato experimental foi validado com a realização da solubilização do CO<sub>2</sub> em água destilada, que foi previamente mantida em banho ultrassom durante 15 min, para a eliminação de gases dissolvidos. Os experimentos foram realizados em triplicata, e as condições de teste foram: pressão de 200 kPa, temperatura de 4 °C e relação gás/produto de 2:1. Para a obtenção da relação g/p desejada, o cálculo da massa de água necessária foi obtida a partir das Equações (3.1), (3.2) e (3.3) (ROTABAKK et al., 2008a).



A partir de:

$$g/p = \frac{V_g}{V_p} \quad (3.1)$$

Sabe-se que:

$$V_t = V_g + V_p \quad \rightarrow V_g = V_t - V_p \quad (3.2)$$

De forma que  $g/p$  é:

$$g/p = \frac{(V_t - V_p)}{V_p} \quad (3.3)$$

Com o rearranjo da Equação (3.3), isola-se a massa de água necessária para contemplar um  $g/p$  desejado, com a Equação (3.4):

$$m_p = \frac{V_t}{\left(\frac{g}{p} + \rho_p\right)} \quad (3.4)$$

Onde:  $\frac{g}{p}$  é a relação gás/produto do sistema,  $V_t$  são os volumes ( $m^3$ ) total,  $V_p$  do produto e  $V_g$  do gás, respectivamente,  $\rho_p$  é a massa específica aparente do produto ( $kg\ m^{-3}$ ) e  $m_p$  é a massa do produto ( $kg$ ).

### iii) *Determinação do $CO_2$ absorvido*

O balanço de massa adotado para a determinação do  $CO_2$  dissolvido na água foi realizado com as seguintes considerações:

- O sistema hermeticamente fechado, com volume e temperatura constantes;
- A dissolução de  $CO_2$  é o fenômeno dominante, desprezando-se as dissoluções de  $N_2$  e  $O_2$ , bem como o consumo ou produção de gases por reações bioquímicas e microbiológicas;
- Gás ideal para baixas pressões e não ideal para altas pressões. A pressão de vapor de água pode ser desprezada, (baixas temperaturas);
- A variação da pressão total do sistema fornece a informação da variação da massa de  $CO_2$  na fase gasosa (SIVERTISVIK et al., 2004a, 2004b, 2005).

Com base na dependência da solubilidade dos gases com a temperatura, Carroll et al. (1991) descreveu um modelo teórico para determinar a constante de Henry na água e foi utilizado por Sivertsvik et al. (2004a) para validar um sistema semelhante conforme a Equação 3.5:

$$\ln H = \sum_{i=0}^n A_i (1000/T)^i \quad (3.5)$$

Em que: H é a constante de Henry (Pa.PPM<sup>-1</sup>) e T é a temperatura (K).

Os coeficientes para o cálculo da constante de Henry do CO<sub>2</sub> em água são: A<sub>0</sub> = -7,72781, A<sub>1</sub> = 12,817, A<sub>2</sub> = -3,7668 e A<sub>3</sub> = 0,2997 e só podem ser utilizados para pressões abaixo de 1000 kPa e temperaturas até 79,85 °C (Sivertsvik et. al., 2004a).

A quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido no equilíbrio pode ser expressa pela lei de Henry:

$$P_{CO_2}^{t=\infty} = H_{CO_2,a} \cdot C_{CO_2}^{t=\infty} \quad (3.6)$$

Em que:  $P_{CO_2}^{t=\infty}$  é a pressão parcial de CO<sub>2</sub> no volume livre da embalagem, e  $H_{CO_2,a}$  é a constante de Henry do CO<sub>2</sub> no alimento.

A quantidade do CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> e/ou fração molar – X<sub>2</sub>) deve ser obtida a partir da quantidade de CO<sub>2</sub> em mols disponível no sistema. A partir da Equação (3.7) é possível obter o número de mols de CO<sub>2</sub> disponível dentro do sistema, no início do processo, e os mols de CO<sub>2</sub> que foram dissolvidos na água, através do seguinte balanço de massa, mostrado pela Equação (3.8).

$$PV^G = Zn_{CO_2}RT \quad (3.7)$$

$$n_{CO_2}^L = n_{CO_2}^i - n_{CO_2}^f \quad (3.8)$$

Onde P é a pressão do CO<sub>2</sub> (kPa), V<sup>G</sup> é o volume do gás em m<sup>3</sup>, Z é o fator de compressibilidade (adimensional), n<sub>CO<sub>2</sub></sub> é o número do mols do CO<sub>2</sub>, R é a constante universal dos gases (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) e T é a temperatura do sistema em K.

A variável  $n_{CO_2}^L$  corresponde ao número de mols de  $CO_2$  dissolvida na fase líquida do alimento, obtida pela diferença dos mols de  $CO_2$  no início do processo ( $n_{CO_2}^i$ ) e pelos mols de  $CO_2$  que permanecem dentro do sistema no final do processo ( $n_{CO_2}^f$ ).

Utilizando a Equação (3.8), é possível encontrar  $n_{CO_2}^i$  e  $n_{CO_2}^f$ , a partir dos dados de pressão registrados pelo sistema de aquisição de dados durante o período de processo.

O cálculo de  $n_{CO_2}$  envolve a consideração da faixa da idealidade ou não. Para sistemas que seguem a Lei dos Gases Ideais, o valor de  $Z$  é igual a 1 (SMITH & VAN NESS, 2009). Porém, quando o sistema opera em pressões mais elevadas,  $Z$  será diferente de 1. Neste caso, a quantidade de  $CO_2$  solubilizada em água foi expressa em termos de fração molar do gás na fase líquida e na fase vapor dentro do sistema, conforme calculado pela Equação (3.9).

$$y_1 \widehat{\phi}_1^V P = x_1 H_1 \quad (3.9)$$

Onde  $\widehat{\phi}_1^V$  representa o coeficiente de fugacidade na fase de vapor do componente 1 na solução,  $y_1$  e  $x_1$  são, respectivamente, o vapor e as frações da fase líquida molares de componente 1, o sistema  $P$  pressão e  $H_1$  é a constante de Henry.

A Equação 3.9 assume a validade da Lei de Henry para a solubilidade em um sistema de equilíbrio binário gás-líquido para o componente mais leve, e permite o uso de correlação correspondente ou equações de estado para descrever esse comportamento.

A fugacidade foi obtida a partir de cálculo iterativo para os sistemas binários baseado em Dalmolin et al. (2006). O programa consiste de uma rotina onde são calculadas a concentração de  $CO_2$  em PPM e em termos de fração molar ( $X_2$ ) com base no comportamento da solubilidade de gases em líquidos explicados pela Lei de Henry, de maneira que a constante de Henry para a água pura e para o mexilhão também foram determinados.

Os cálculos foram realizados através da determinação do volume parcial molar do  $CO_2$  em uma diluição infinita em água, bem como as constantes de Antoine para o cálculo da pressão de saturação da água. Com esses parâmetros determinados, os dados de pressão inicial e final do processo foram inseridos no programa para a obtenção dos dados de solubilidade do  $CO_2$ . Foi necessário realizar correção nos dados de pressão inicial do sistema, de acordo com o proposto por Cabral (2011), devido ao aumento de temperatura que ocorre no meio gasoso, pelo

aumento da pressão nos primeiros instantes da injeção da mistura do gás, assim haveria uma superestimativa a respeito do gás dissolvido no sistema devido ao rápido declínio de pressão com o retorno da temperatura do gás à temperatura do experimento, conforme a Equação (3.10).

$$P_{corrigida} = \frac{T_p}{T_g} \times P_{medida} \quad (3.10)$$

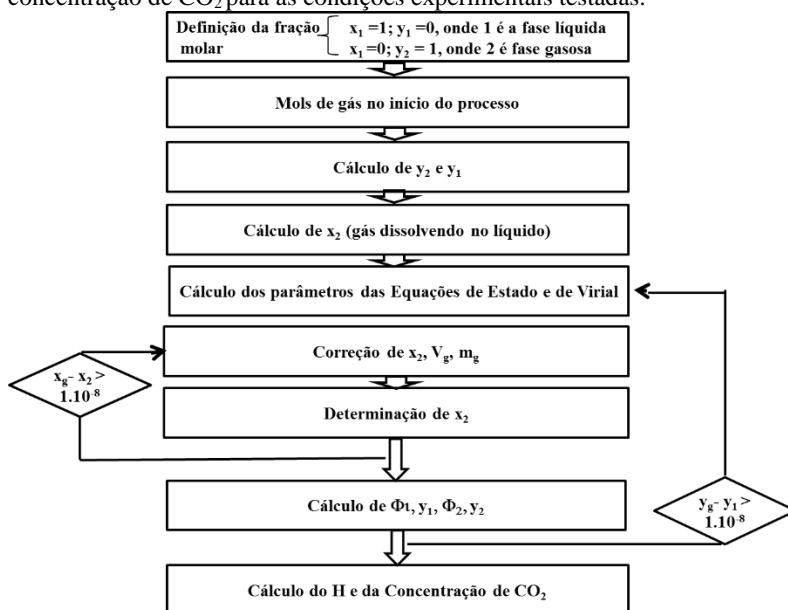
Para as determinações da solubilidade do CO<sub>2</sub>, foi utilizada a equação dos gases ideais (Equação 1.12) e quatro equações de estado (van der Waals, Virial, Soave-Redlich-Kwong e Peng Robinson – Equações (1.12, 1.18, 1.27 e 1.32) respectivamente, para contemplar a faixa fora da idealidade, a pressões mais elevadas. Para efeito de comparação com os modelos que segue gás ideal. Para o cálculo da constante de Henry, foi considerada a umidade média do mexilhão (antes e depois do tratamento de pré-solubilização, em base úmida (Equação 3.11), de acordo com Cabral (2011), Rotabakk et al. (2010) e Sivertsvik et al. (2004b).

$$X_{bu}(\%) = 100 * \frac{M_w}{M_T} \quad (3.11)$$

Onde:  $X_{bu}$  é a umidade expressa em base úmida (%);  $M_w$  é a massa de água no produto (g) e  $M_T$  é a massa total do produto (g).

A Figura 3.3 mostra o fluxograma da rotina do programa desenvolvido para esta finalidade.

Figura 3.3 - Fluxograma para determinação da constante de Henry e da concentração de CO<sub>2</sub> para as condições experimentais testadas.



Para a validação do sistema água, os dados obtidos com água pura foram comparados com a literatura.

A fim de confirmar a validação do comportamento do CO<sub>2</sub> em água através da constante de Henry, o erro percentual foi estimado a partir dos dados calculados pela Equação (3.5) e os valores preditos através da Equação (3.9), expressa pela Equação (3.12):

$$e(\%) = 100. \left| \frac{Var_{calc} - Var_{predito}}{Var_{calc}} \right| \quad (3.12)$$

Em que:  $e(\%)$  é o erro percentual,  $Var_{calc}$  é a variável calculada e  $Var_{predito}$  é a variável predita, de interesse.

### 3.2.4 Determinação do CO<sub>2</sub> absorvido no mexilhão

A solubilidade e a concentração de CO<sub>2</sub> absorvido no mexilhão foram investigadas no aparato experimental apresentado no item 3.2.2. Os cálculos foram realizados considerando-se apenas a solubilidade do gás na fração aquosa do alimento devido ao baixo teor de lipídios.

Nesta etapa, foi testada a influência da relação g/p, nível de pressão e da temperatura na solubilidade do CO<sub>2</sub> na fase aquosa do mexilhão, durante o período de 72 h, até que a concentração do gás atingisse o equilíbrio. As condições experimentais foram determinadas por um planejamento experimental 2<sup>3</sup>, com três pontos centrais, totalizando 11 experimentos, conforme apresentado na Tabela 3.1

Tabela 3.1 - Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento experimental 2<sup>3</sup> para o estudo da solubilidade do CO<sub>2</sub> no conteúdo aquoso em mexilhão *Perna perna*.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	0	3	6
Pressão (kPa)	200	400	600
Relação gás/produto*	1:1	3:1	5:1

\*relação v/v

Os dados de pressão inicial corrigido e final do processo foram inseridos no mesmo programa iterativo da seção 3.2.2 para a determinação da concentração de CO<sub>2</sub> dissolvida, da Constante de Henry e da solubilidade para o mexilhão.

#### *Avaliação do Mecanismo de Absorção*

As taxas de absorção de CO<sub>2</sub> nos mexilhões foram calculados a partir da diferença de concentração gasosa, massa de mexilhão e volume livre do aparato experimental na temperatura de processo, de acordo com as seguintes equações (TORRIERI et al., 2009):

$$R_{CO_2_{abs}} = \frac{dCO_2}{dt} \quad (3.13)$$

Onde:  $R_{CO_2_{abs}}$  é a taxa de absorção de  $CO_2$  (mg  $CO_2$ /kg produto h) e  $\frac{dCO_2}{dt}$  é a variação da concentração de  $CO_2$  com o tempo.

Equações de ajuste em relação aos dados experimentais foram utilizadas para determinar o comportamento da absorção de  $CO_2$  nos mexilhões, e calcular as respectivas taxas:

$$[CO_2] = \frac{t}{at + b} \quad (3.14)$$

Em que: P (kPa) é a pressão a cada ponto; t (h) é o tempo a cada ponto;  $[CO_2]$  é a concentração de  $CO_2$  (%) e a, b e c são os parâmetros de ajuste.

Derivando a equação (3.14), em relação ao tempo, temos que:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{at}{(t + b)^2} \quad (3.15)$$

Substituindo a equação (3.15), nas equações (3.13) e (3.14) é possível determinar as taxas de absorção e dessorção de  $CO_2$  no mexilhão.

Outro parâmetro de importância no processo SGS é o cálculo do tempo necessário para a concentração do  $CO_2$  dissolvido atingir 50%. Rearranjando a Equação (3.14) e considerando que  $[CO_2] = 0,5 C_{CO_2}^{t=\infty}$ , temos que:

$$t = \frac{0,5 b C_{CO_2}^{t=\infty}}{1 - 0,5 a C_{CO_2}^{t=\infty}} \quad (3.17)$$

A rotina computacional foi desenvolvida para o *software* Matlab (R2012a, MathWorks Inc, MA, USA), ajustando as Equações (3.16) e (3.17) aos dados experimentais através do método de regressão não-linear da função *nlinfit*.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Caracterização da matéria-prima

A massa específica real e a massa específica aparente do mexilhão, ambas em  $kg.m^{-3}$  estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Dados de massa específica real e aparente para o mexilhão *Perna perna* cozido e processado pelo método convencional e alternativo.

	Massa Específica ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	
	Convencional	Alternativo
Aparente	1040	1041
Real	1327	1331

Como as massas específicas oriundas dos dois processamentos são próximas entre si, a média das massas específicas foi utilizada. Para seguir a mesma convenção de cálculos para a solubilidade do  $\text{CO}_2$  em produtos que não respiram (SIVERTSVIK et al, 2004a), foi considerado o valor da massa específica aparente do mexilhão.

O mexilhão possui poros, que normalmente são ocupados por água e, para compreender de forma mais precisa a disponibilidade de água para a solubilização do  $\text{CO}_2$ , avaliar sua microestrutura tornou-se um estudo importante. As análises de MEV estão mostradas na Figura 3.4 (com aumento de 50 vezes) e em detalhe (aumento de 500 vezes) na Figura 3.5.

Figura 3.4 - Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV) para o mexilhão macho (a) e mexilhão fêmea (b), com aumento de 50 x.

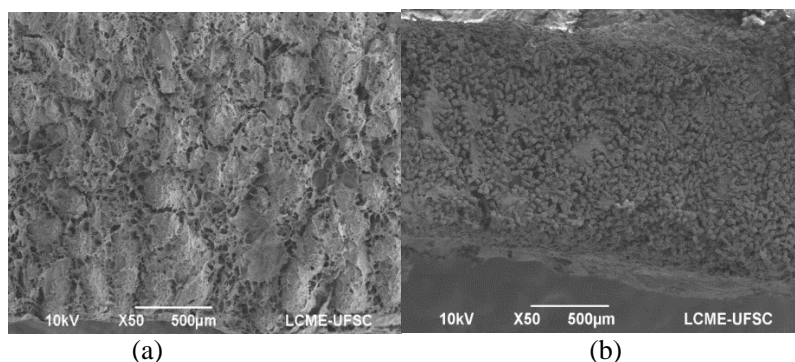
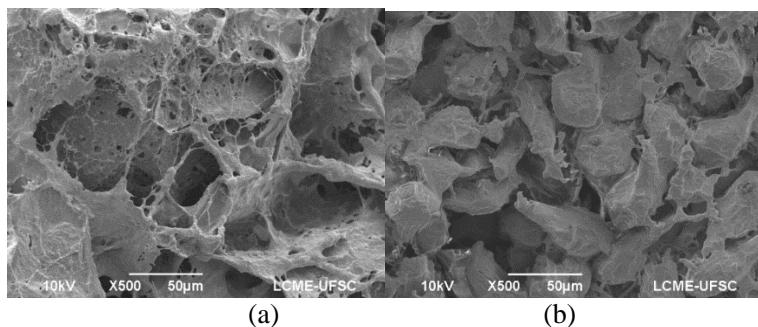




Figura 3.5 - Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV) para o mexilhão macho (a) e mexilhão fêmea (b), com aumento de 500 x.



Através da análise das figuras permite observar que o manto do mexilhão é constituído por diversos poros, formando uma espécie de rede de capilares, possibilitando a retenção de água ao longo de todo o seu manto. Esta água está livre e disponível, tanto para a atividade microbiana, quanto para outras reações degradativas, como as de oxidação ou enzimáticas.

A estrutura dos mexilhões *Amblema* mostrados por Petit et al. (1978) é semelhante as mostradas para o mexilhão estudado neste trabalho. A estrutura interna é complexa e composta por multicamadas formando o manto e é drasticamente diferente, tanto morfológicamente quanto funcionalmente. A superfície do mexilhão é uma estrutura complexa para se estudar porque a espécie sofre variações sazonais, em que a composição química e a estrutura do mexilhão também varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, período de reprodução, que também pode mudar a microestrutura, estudada e comprovada por diversos estudos (MARQUES et al., 1998; RESGALLA JR et al., 2007; VERNOCCHI et al., 2007; SOKOLOWSKI et al., 2010). As condições do ambiente de crescimento, como a temperatura da água, disponibilidade de alimento e o estágio de desenvolvimento influenciam a composição do manto (MARQUES et al., 1998) e conseqüentemente a organização da microestrutura. Através das imagens, é possível também ver algumas diferenças entre machos e fêmeas, onde a estrutura porosa parece estar formada em organizações distintas. Isto pode ser explicado considerando a reprodução dos mexilhões, que ocorre quase todo o ano, com algumas variações, que está associado com a fisiologia dos organismos, determinando a formação e liberação do material reprodutivo. Então a área inteira do manto pode formar gametas, que auxilia no peso da porção

comestível. As glândulas sexuais ou folículos estão distribuídos no manto, que armazena os óvulos e os espermatozoides produzidos pelas gônadas. Os gametas dão ao manto a coloração característica, com branco-leitoso nos machos e laranja-salmão nas fêmeas (LOUDA et al., 2008; MARENZI & BRANCO, 2006; MARQUES, 1998).

O perfil microestrutural encontrado para o mexilhão neste trabalho para machos e fêmeas é, de forma geral, com alta porosidade, onde a organização dos poros varia de acordo com o sexo e até mesmo existem diferenças individuais.

### 3.3.2 Validação do aparato experimental

Os testes de vedação foram realizados para assegurar de que não havia vazamento de gás, evitando assim, superestimar a quantidade de CO<sub>2</sub> solubilizado na água e no mexilhão. Desta forma, foi possível determinar a variação nas medições de pressão e temperatura com o tempo. Os testes de vedação demonstraram que o sistema não apresentava vazamento sob diferentes pressões (400; 500; 800 e 900 kPa), o que pode ser observado pelo baixo desvio padrão obtido para todos os testes (Tabela 3.3). Para a avaliação dos termopares, as temperaturas apresentaram variação de  $\pm 0,20$  °C.

Tabela 3.3 - Valores de médias e desvios padrão obtidos no teste de vedação do sistema em um período de 24h.

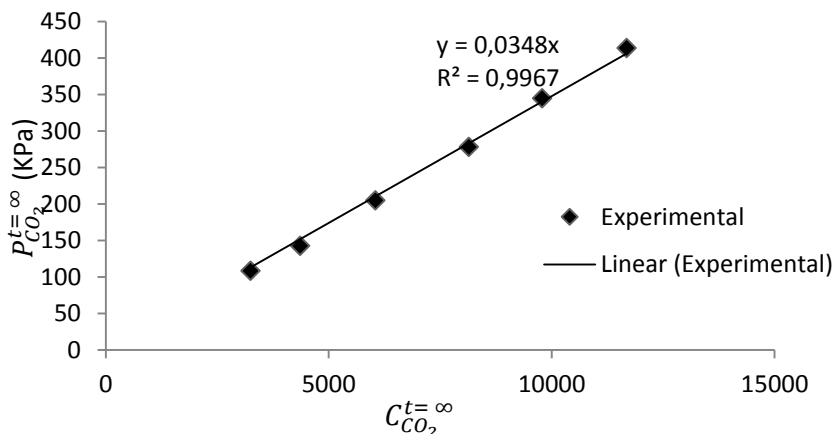
Pressão (kPa)		Pressão (V) *	
Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
401,77	0,3394	1,8763	0,0016
562,73	1,7185	2,6786	0,0082
831,91	2,0677	3,9100	0,0097
894,54	2,0235	4,2580	0,0096

\*A medida em V(volts) é a diferença de potencial dada pelo transdutor de pressão conectado ao sistema de aquisição de dados.

A validação do sistema com água destilada foi determinada através do cálculo da constante de Henry, baseada na evolução dos dados de pressão (150kPa – 600kPa) com o tempo em uma temperatura de 3 °C  $\pm 0,4$ °C e relação g/p de 3:1. A constante de Henry calculada pela Equação (1.7) foi de 33,85 Pa.PPM<sup>-1</sup>, calculada através da equação de Peng-

Robinson (Equação 1.32) foi de  $34,8 \text{ Pa.PPM}^{-1}$  para faixa de pressão de 200 a 600 kPa, conforme apresentado na Figura 3.6.

Figura 3.6 - Constante de Henry do  $\text{CO}_2$  em água destilada calculada a partir da equação de Peng-Robinson.  $T = 3^\circ\text{C}$ ,  $G/P = 3$ , a diferentes pressões.



O aparato experimental foi validado para estudos com alimentos, visto que o erro relativo calculado foi de 2,81 %. Cabral (2011) encontrou erros relativos entre 0,24 – 0,87 com pressões de 201,7 kPa e 78,9 kPa, temperatura de  $2,2^\circ\text{C}$  e relação g/p de 1,0. A utilização de condições de processos diferentes, como pressões mais elevadas neste trabalho pode explicar a diferença encontrada. Para a validação do aparato também foram consideradas os cálculos com o auxílio de outras equações de estado, mostradas na Tabela 3.4.

As constantes de Henry encontradas para a água pura dentro do sistema são comparáveis ao obtido por Sivertsvik et al. (2004a), que obtiveram valores de  $35,06$  e  $36,1 \text{ Pa.PPM}^{-1}$  para água destilada a  $277,15 \text{ K}$  e pressão de 200 kPa. Cabral (2011) obteve valores de  $32,96$ ;  $33,01$  e  $32,74 \text{ Pa.PPM}^{-1}$  para água destilada a  $275 \text{ K}$ , com a relação volumétrica g/p = 1:1 e pressão de 201,7 kPa. Os resultados obtidos por este trabalho foram compatíveis com a literatura e validam o aparato experimental para ensaios com alimentos.

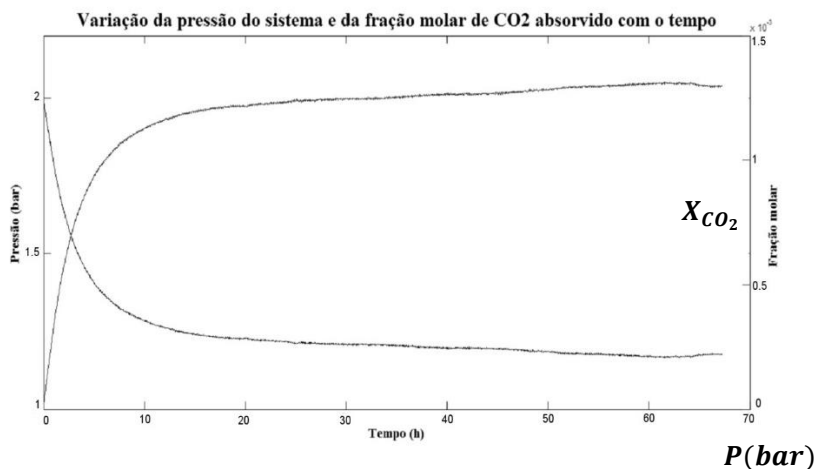
Tabela 3.4 - Constantes de Henry para água obtida através dos dados experimentais e dos cálculos baseados na solubilidade para a validação do aparato experimental com água destilada.

<b>Experimento</b>	<b>Constante de Henry (Pa.PPM<sup>-1</sup>)</b>	<b>Gás Ideal</b>	<b>van der Waals</b>	<b>Sivertsvik et al. (2004a)</b>	<b>Soave-Redlich-Kwong</b>	<b>Peng Robinson</b>	<b>Carroll et al. (1991)</b>
<b>150 kPa/ 3 °C</b>	<b>Henry Experimental</b>	34,34	32,68	34,15	32,80	32,74	33,36
	<b>Variação (%)<sup>1</sup></b>	2,95	2,02	2,38	1,67	1,86	0
<b>200 kPa/ 3 °C</b>	<b>Henry Experimental</b>	33,75	31,97	33,63	32,13	32,06	33,27
	<b>Variação (%)<sup>1</sup></b>	1,42	3,92	1,09	3,42	3,65	0
<b>300 kPa/ 3 °C</b>	<b>Henry Experimental</b>	35,15	32,84	35,10	33,10	32,99	33,44
	<b>Variação (%)<sup>1</sup></b>	5,81	1,80	4,98	1,01	1,32	0
<b>400 kPa/ 3 °C</b>	<b>Henry Experimental</b>	35,66	32,72	35,68	33,08	32,96	33,38
	<b>Variação (%)<sup>1</sup></b>	6,87	1,98	6,89	0,89	1,26	0
<b>500 kPa/ 3 °C</b>	<b>Henry Experimental</b>	37,21	33,49	37,28	33,94	33,80	34,52
	<b>Variação (%)<sup>1</sup></b>	7,79	2,97	7,99	1,69	2,10	0
<b>600 kPa/ 3 °C</b>	<b>Henry Experimental</b>	37,89	33,49	38,02	34,03	33,88	33,90
	<b>Variação (%)<sup>1</sup></b>	11,77	1,20	12,14	0,39	0,05	0

<sup>1</sup> Variação calculada com referência no valor obtido pela Equação de Carroll et al. (1991)

A Figura 3.7 mostra a relação entre o declínio de pressão com o tempo e a evolução da concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido em água destilada expressa em fração molar ( $X_2$ ), até atingir o equilíbrio, nas condições experimentais de pressão parcial de CO<sub>2</sub> inicial de 200 kPa e final de 117,83 kPa, temperatura de 3 °C com relação volumétrica g/p = 1:1, respectivamente. O equilíbrio foi atingido provavelmente após 48 horas de experimento.

Figura 3.7 - Cinética de absorção do CO<sub>2</sub> em água (expressa em fração molar –  $X_2$ ) conforme a variação de pressão do sistema para água pura, P=200 kPa, T = 3 °C, g/p= 2:1.



### 3.4 Influência da pressão, da relação gás/produto e da temperatura na qualidade do CO<sub>2</sub> dissolvido em mexilhões

A Tabela 3.5 apresenta a o planejamento da matriz experimental com os valores codificados, reais e as respostas sobre a influência no CO<sub>2</sub> dissolvido.

Um modelo empírico codificado foi construído para os resultados na Tabela 3.5 para a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido em função da pressão, temperatura e relação gás/produto. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para validar o modelo, apresentado na Tabela 3.6.

Tabela 3.5 - CO<sub>2</sub> dissolvido obtido de acordo com a matriz experimental, com os valores codificados e reais de acordo com o planejamento experimental 2<sup>3</sup> com 3 pontos centrais.

	<b>P (kPa)</b>	<b>g/p (v/v)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>[CO<sub>2</sub>] (mg CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>[CO<sub>2</sub>] predito (mg CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>50 % (h)*</b>	<b>Erro relativo (%)**</b>
1	-1 (200)	-1 (1:1)	-1 (0)	2640,81	2391,5	0,78	9,44
2	-1 (200)	-1 (1:1)	1 (6)	3056,33	3265,3	1,12	6,83
3	1 (600)	-1 (1:1)	-1 (0)	9230,26	9439,22	1,02	2,26
4	1 (600)	-1 (1:1)	1 (6)	7478,87	7229,58	1,71	3,33
5	-1 (200)	1 (5:1)	-1 (0)	7940,67	8149,64	1,34	2,63
6	-1 (200)	1 (5:1)	1 (6)	6526,32	6277	1,51	3,82
7	1 (600)	1 (5:1)	-1 (0)	22411,64	22162,32	0,77	1,11
8	1 (600)	1 (5:1)	1 (6)	16997,28	17206,24	1,36	1,22
9	0 (400)	0 (3:1)	0 (3)	9988,87	9515,1	2,13	4,74
10	0 (400)	0 (3:1)	0 (3)	9280,88	9515,1	1,54	2,52
11	0 (400)	0 (3:1)	0 (3)	9114,13	9515,1	1,39	4,39

\* O tempo para alcançar 50 % de CO<sub>2</sub>. \*\* Erro calculado da Equação (3.12).

Tabela 3.6 - ANOVA para validação do modelo matemático empírico que descreve a concentração de CO<sub>2</sub> no equilíbrio.

<b>Fonte da variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F-calculado</b>	<b>Valor-P</b>
Regressão	326491027	6	54415171	252,1027	0,00004
Resíduo	863381	4	215845,22		
Total	327354408	10			

R<sup>2</sup> = 0,997; F<sub>tabelado</sub> (0,95 %) = 6,16

A equação gerada pelo modelo é mostrado como:

$$\begin{aligned}
 \text{CO}_2^{\text{f}=\infty} = & 9515,10 + (4494,24 \times P) + (3933,70 \times \frac{\text{g}}{\text{p}}) - \\
 & (1020,57 \times T) + (1741,24 \times P \times \frac{\text{g}}{\text{p}}) - \\
 & (770,86 \times P \times T) - (686,61 \times \frac{\text{g}}{\text{p}} \times T)
 \end{aligned}
 \tag{3.18}$$

Onde:  $CO_2^{t=\infty}$  é a concentração do  $CO_2$  dissolvido no equilíbrio; P é a pressão (KPa), g/p é a relação gás/produto e T é a temperatura ( $^{\circ}C$ ).

O modelo (Equação 3.18) foi capaz de prever os dados experimentais da concentração de  $CO_2$  em mexilhões, considerando os resultados encontrados para o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), F-calculado e F-tabelado, permitindo a construção da curva de contorno apresentada na Figura 3.8, Figura 3.9 e Figura 3.10, para a concentração de  $CO_2$  em função da pressão, relação gás/produto e temperatura. O modelo empírico representou o processo, de acordo com o mostrado pela concentração de  $CO_2$  predita e o erro relativo (Tabela 3.6).

As concentrações mais altas de  $CO_2$  foram encontradas sob condições de alta pressão (600 kPa) e usando maior quantidade de  $CO_2$  dentro da câmara (relação g/p de 5:1) durante 5 horas. Os parâmetros pressão e relação gás/produto apresentaram um efeito significativo positivo ( $p < 0.05$ ) bem como a interação destas variáveis com relação à concentração de  $CO_2$  dissolvido. Os maiores teores de  $CO_2$  dissolvido nos mexilhões foram obtidos sob a relação g/p mais alta (5:1) 22411,64 mg  $CO_2 \cdot kg^{-1}$ , a  $0^{\circ}C$  e 16997,28 mg  $CO_2 \cdot kg^{-1}$  a  $6^{\circ}C$  na mesma pressão (600 kPa) conforme os tratamentos 7 e 8 (Tabela 3.5). Observando o efeito nos parâmetros, a temperatura foi a variável com menor influência entre os estudados, e teve efeito negativo significativo em relação à pressão ( $P < 0,05$ ) e relação g/p ( $P = 0,013$ ). Contudo, foi observado que quanto menor a temperatura do processo, mais altas foram as concentrações de  $CO_2$  dissolvido obtido nos mexilhões, seguindo o comportamento da solubilidade do  $CO_2$  na fase aquosa, que aumenta sob baixas temperaturas (JAKOBSEN & RISBO, 2009; SIMPSON et al., 2001) e foi influenciado pela estrutura porosa dos mexilhões.

O comportamento da pré-solubilização do  $CO_2$  em alimentos foi relatado por alguns estudos, porém é necessário considerar que a comparação da solubilidade em produtos diferentes é difícil, porque é dependente da composição gasosa inicial no *headspace* e da relação gás/produto (ROTABAKK et al., 2010). Soares (2013) realizou o processo SGS em ostras avaliando as mesmas faixas de pressão, temperatura e relação g/p e obteve resultados semelhantes, como o aumento da quantidade de  $CO_2$  dissolvido em alta pressão e alta relação g/p.

Al-Nehlawi et al. (2013) aplicaram o processo SGS em coxas de frango sob pressão atmosférica, g/p 3:1 e temperatura de  $3^{\circ}C$  durante 3 h e obtiveram uma dissolução em torno de 567 mg  $CO_2 \cdot kg^{-1}$  no produto.

Sivertsvik & Jensen (2005) submeteram linguças a diferentes pressões (100 kPa, 150 kPa, 200 kPa), relação g/p diferentes (1.7:1 – 3.9:1) e temperaturas (0 °C, 4 °C e 8 °C) e encontraram a concentração média de 1533 mg CO<sub>2</sub>.kg produto<sup>-1</sup>.

Figura 3.8 Curva de contorno para a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido em mexilhões em função da pressão e relação gás/produto.

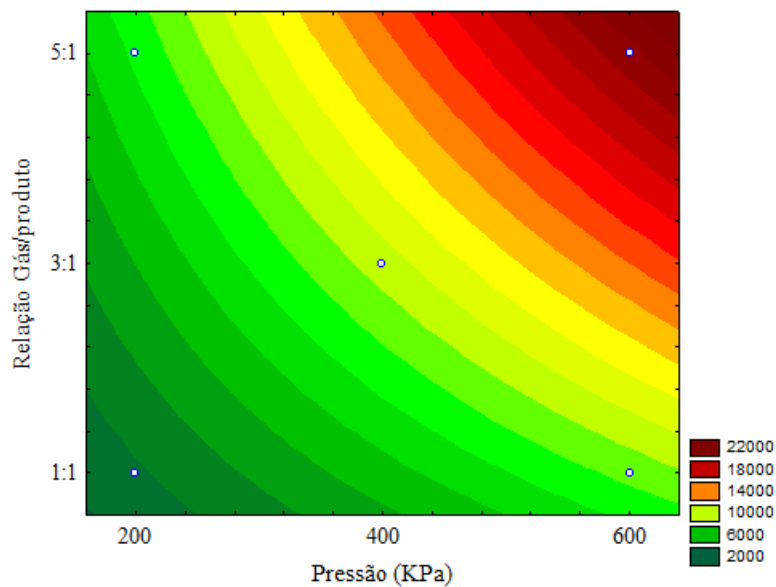




Figura 3.9 Curva de contorno para a concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido em função da pressão e temperatura.

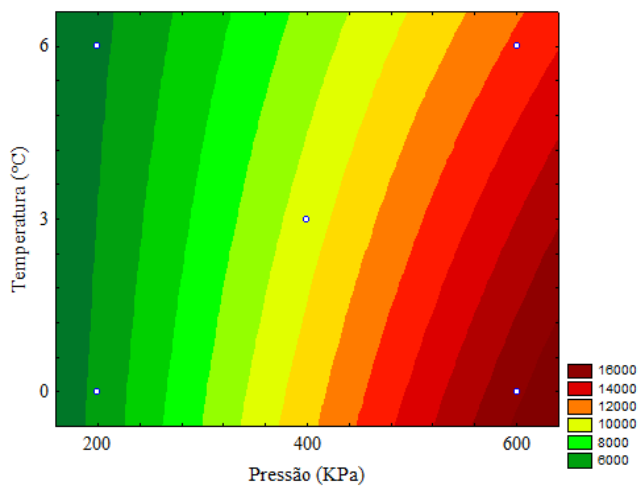
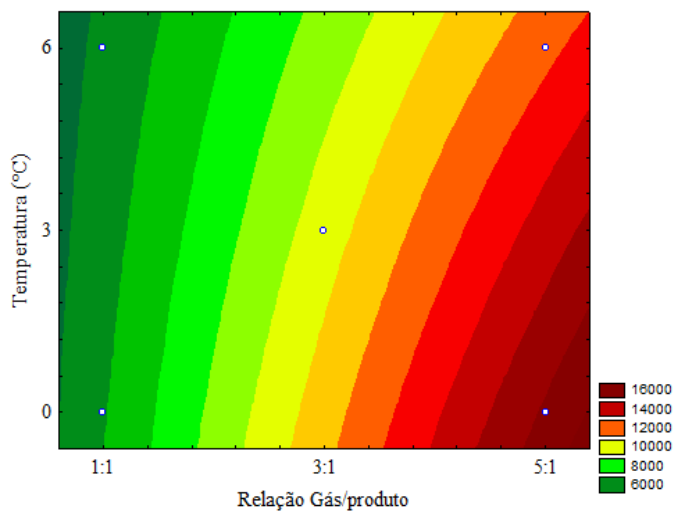


Figura 3.10 Curva de contorno para a concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido em função da relação gás/produto e temperatura.



O tempo necessário para solubilizar 50 % da concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido (Tabela 3.5) variou entre 0,77 h (200 kPa,  $g/p = 1:1$ ,  $T = 0^\circ\text{C}$ ) e 2,13 h ( $P = 400$  kPa,  $g/p = 3$  e  $T = 3^\circ\text{C}$ ). A temperatura influenciou no tempo necessário para atingir 50 % do  $\text{CO}_2$  total dissolvido, independente das pressões e das relações  $g/p$  aplicadas, em outras palavras, todas as condições experimentais realizadas em temperaturas mais altas (3 e  $6^\circ\text{C}$ ) requeriram maior tempo do que as condições a  $0^\circ\text{C}$ . Soares (2013) relatou o período entre 1,32 h at  $0^\circ\text{C}$  e 2,77 h a  $6^\circ\text{C}$  para alcançar 50 % do  $\text{CO}_2$  dissolvido em ostras; Cabral (2011) relatou o período de 6,8 h a  $4^\circ\text{C}$  e 7,7 h a  $10^\circ\text{C}$  em queijo minas frescal; Sivertsvik; Jensen (2005) relataram o período de 4,6 h e 5,2 h para linguças. Sivertsvik et al. (2004b) relataram que um filé de peixe exposto durante 4,6 h em  $\text{CO}_2$  puro tem a mesma quantidade de  $\text{CO}_2$  dissolvido exposto a 50%  $\text{CO}_2$  durante 3 dias.

i) *Absorção do  $\text{CO}_2$  em mexilhões*

A evolução da concentração de  $\text{CO}_2$  e a taxa de absorção dentro das primeiras 24 horas do período total de experimento conforme as condições do planjamento experimental estão apresentadas na Figura 3.11 e Figura 3.12, respectivamente. A absorção de  $\text{CO}_2$  é uma consequência da variação da pressão com um determinado tempo e os parâmetros que interferem na taxa de absorção são a pressão, temperatura e relação  $g/p$ .

Figura 3.11 Evolução da concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido durante 24 h.

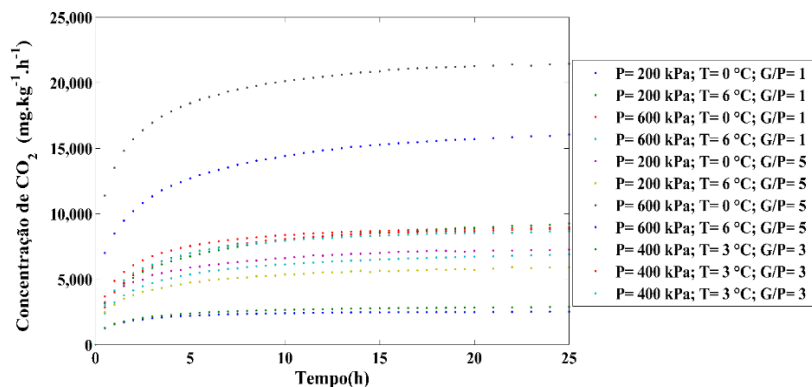
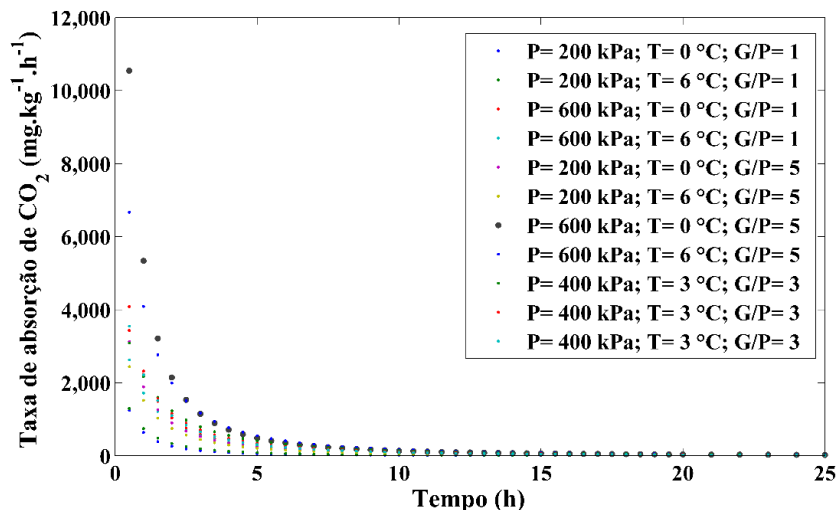


Figura 3.12 Evolução da taxa de absorção de CO<sub>2</sub> nos mexilhões dentro de 24 h.



Como pode ser visto na Figura 3.11, quando a pressão do sistema diminui, a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido aumenta até alcançar o equilíbrio. O sistema SGS foi realizado em um período de 65 h para assegurar que a condição de equilíbrio fosse alcançada. Para os mexilhões, o equilíbrio foi alcançado na faixa 20 a 25 horas de processo, conforme mostrado na Figura 3.11 e nesse mesmo período, a taxa de absorção de CO<sub>2</sub> se aproximou de zero para todas as condições. O tempo para atingir o equilíbrio, mudou possivelmente devido à área de exposição à atmosfera modificada, e pode mudar também de acordo com o tipo de alimento. Soares (2013) encontrou o equilíbrio para ostras no tempo similar aos mexilhões, entre 20 e 24 h. Sivertsvik et al. (2004b) encontraram 97 % do CO<sub>2</sub> dissolvido em files de peixe depois de 24 h de processo e o equilíbrio após 68,9 h de processo. Jakobsen & Bertelsen (2004) encontraram o equilíbrio em 12 h para carne de porco. Sivertsvik et al. (2005) encontraram 68,9 h para presunto cozido e 76,1 h para linguiça.

Tabela 3.7 mostra a taxa média de absorção calculada para todos os tratamentos, que apresentou um coeficiente de correlação R<sup>2</sup> acima de

0,96 para todas as condições estudadas com bom ajuste aos dados experimentais.

Tabela 3.7 - Taxas de absorção do CO<sub>2</sub> durante as primeiras 24 h de processo.

Tratamento	P (kPa)	g/p (v/v)	T (°C)	Taxa de absorção média (mg CO <sub>2</sub> . kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	a	b
1	-1 (200)	-1 (1:1)	-1 (0)	81,62	0,988	3,83.10 <sup>-4</sup>	2,92.10 <sup>-4</sup>
2	-1 (200)	-1 (1:1)	-1 (0)	100,22	0,983	3,34.10 <sup>-4</sup>	3,59.10 <sup>-4</sup>
3	1 (600)	1 (5:1)	-1 (0)	308,89	0,993	1,07.10 <sup>-4</sup>	1,10.10 <sup>-4</sup>
4	1 (600)	1 (5:1)	-1 (0)	256,83	0,982	1,37.10 <sup>-4</sup>	2,23.10 <sup>-4</sup>
5	-1 (200)	-1 (1:1)	1 (6)	261,83	0,960	1,30.10 <sup>-4</sup>	1,62.10 <sup>-4</sup>
6	-1 (200)	-1 (1:1)	1 (6)	215,33	0,966	1,61.10 <sup>-4</sup>	2,19.10 <sup>-4</sup>
7	1 (600)	1 (5:1)	1 (6)	678,86	0,977	4,57.10 <sup>-5</sup>	3,35.10 <sup>-5</sup>
8	1 (600)	1 (5:1)	1 (6)	575,35	0,969	5,99.10 <sup>-5</sup>	7,85.10 <sup>-4</sup>
9	0 (400)	0 (3:1)	0 (3)	352,29	0,974	1,01.10 <sup>-4</sup>	2,10.10 <sup>-5</sup>
10	0 (400)	0 (3:1)	0 (3)	330,23	0,995	1,06.10 <sup>-4</sup>	1,68.10 <sup>-4</sup>
11	0 (400)	0 (3:1)	0 (3)	316,37	0,993	1,09.10 <sup>-4</sup>	1,52.10 <sup>-4</sup>

As taxas de absorção mais altas foram obtidas à maiores pressões e menor quantidade de produto (g/p mais alto), indicando que o equilíbrio foi alcançado rapidamente nessas condições.

Soares (2013) relatou a importância de observar um conjunto de fatores ao escolher as condições mais apropriadas para um processo industrial. É interessante que uma quantidade maior de gás possa ser solubilizada em um período mais curto, fornecendo taxas de absorção maiores, mas também taxas maiores de dessorção deverão ocorrer e necessitarão ser combatidas. O mesmo autor encontrou maiores taxas de dessorção sob altas concentrações de CO<sub>2</sub> dissolvido e recomenda cautela

na escolha da melhor condição. Assim, antes de indicar a melhor condição para a indústria de mexilhões, é importante estudar o processo de dessorção, porque os resultados da caracterização mostraram uma estrutura porosa nos mexilhões, que pode conter gás sem necessariamente este estar dissolvido, o que pode potencializar a dessorção. O uso de menores relações g/p para ter maior quantidade de produto submetido ao processo SGS deve também ser considerado.

### *Solubilidade do CO<sub>2</sub> em mexilhão*

A Tabela 3.8 apresenta os valores da constante de Henry do CO<sub>2</sub> em mexilhão *Perna perna*, determinada pela razão entre a pressão parcial de CO<sub>2</sub> no equilíbrio (após 65 horas) e a concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido nas amostras, calculada pela Equação (1.8).

Tabela 3.8 – Solubilidade do CO<sub>2</sub> no mexilhão *Perna perna* em diferentes pressões, relações gás/produto e temperaturas.

Condição	H (Pa.PPM <sup>-1</sup> )
(200 kPa, 0 °C, g/p=1)	54,40
(200 kPa, 6 °C, g/p =1)	36,03
(600 kPa, 0 °C, g/p=1)	36,74
(600 kPa, 6 °C, g/p=1)	47,63
(200kPa, 0 °C, g/p=5)	20,79
(200 kPa, 6 °C, g/p=5)	27,64
(600 kPa, 0 °C, g/p=5)	24,05
(600 kPa, 6 °C, g/p=5)	31,51
(400 kPa, 3 °C, g/p=3)	33,41
(400 kPa, 3 °C, g/p=3)	36,88
(400 kPa, 3 °C, g/p=3)	38,99

Os menores valores de H (por consequência maior solubilidade) foram obtidos nos Experimentos 5, 6 e 7 (médias de 20,43; 26,89 e 23,22 Pa.PPM<sup>-1</sup>), respectivamente. Para ambas as condições experimentais, a relação gás/produto (g/p) foi de 5:1.

Não há na literatura valores de H para o mexilhão *Perna perna* processado. Porém, comparando os dados com outros produtos cárneos, esses valores são inferiores aos obtidos por Sivertsvik et al. (2004b), que reportam valores da constante de Henry a 4°C para bacalhau (54,3 Pa.PPM<sup>-1</sup>) e salmão (57,9 Pa.PPM<sup>-1</sup>). Enquanto para produtos cozidos,

Sivertsvik et al. (2005) reportam valores da constante de Henry a 4 °C para produtos cárneos cozidos, 64,9 Pa.PPM<sup>-1</sup>, 87,5 Pa.PPM<sup>-1</sup> e 82,4 6,5 Pa.PPM<sup>-1</sup>, para presunto cozido, salsicha tipo I e tipo II, respectivamente. Rotabakk et al. (2010) reportam a constante de Henry para filés de frango com 78% de umidade, a 2 °C, igual a 42,8 Pa.PPM<sup>-1</sup>. Essa diferença nos valores pode ser atribuída à composição e estrutura distinta de cada alimento, além das diferenças nas condições experimentais, como pressão e relação g/p.

### 3.5 Conclusões

A microestrutura encontrada nos mexilhões foi porosa e muito complexa, com variações entre os mexilhões machos e fêmeas. A aplicação de CO<sub>2</sub> e uma microestrutura altamente porosa acarretam baixa solubilidade do gás no conteúdo de água e / ou lipídios. Porém a rede de capilares no mexilhão possui elevada quantidade de água o que permite a solubilização do CO<sub>2</sub> e a retenção do mesmo na estrutura porosa do mexilhão.

Foi possível obter uma quantidade grande de CO<sub>2</sub> dissolvido nos mexilhões, principalmente influenciados pela pressão e pela relação g/p aplicadas. As taxas mais altas de absorção foram obtidas nas condições de maior pressão e menor temperatura. Este efeito pode ser explicado pelo efeito de impregnação. Por outro lado, para selecionar as melhores condições de processo para a indústria é necessário avaliar o processo de dessorção e a quantidade de CO<sub>2</sub> solubilizado capaz de estender a vida útil dos mexilhões.

## REFERÊNCIAS

AL-NEHLAWI, A.; SALDOB, J.; VEGA, L.F.; GURIA, S. Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks. **Meat Science**. v. 94. p. 1–8, 2013.

CABRAL, G. J. **Determinação experimental da solubilidade e do coeficiente de difusão efetivo do CO<sub>2</sub> em queijo tipo Minas Frescal e simulação de embalagem sob atmosfera modificada**. 90 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

CARROLL, J.; SLUPSKY, J.; MATHER, A. The solubility of carbon dioxide in water at low pressure. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 20(6), p. 1201-1209, 1991.

DALMOLIN, I.; SKOVROINSKI, E.; BIASI, A.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. Solubility of carbon dioxide in binary and ternary mixtures with ethanol and water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 245, p. 193-200, 2006.

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; MARIN, V. A. Evaluation of antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* strains isolated from mussels (*Perna perna* linnaeus 1758). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 329-324, abr-jun, 2010.

GILL, C.O. The solubility of carbon dioxide in meat. **Meat Science**, v. 22, p. 61-71, 1988.

JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified by semihard cheese. **Journal of Food Engineering**. v. 92, p 285-290, 2009.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**. v. 68, p. 603-610, 2004.

LOUDA, J. W.; NETO, R. R.; MAGALHÃES, A. R. M.; SCHNEIDER,

V. F. Pigment alterations in the brown mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. v. 150, p. 385-394, 2008.

MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. **O cultivo do mexilhão *Perna perna* no município de Penha, SC**. In: BRANCO, J.; MARENZI, A. W. C. (Org.). Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC. 291. Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. p. 227-244, 2006.

MARQUES, H. L. A. **Criação Comercial de Mexilhões**. São Paulo: Nobel, 1998, 109 p.

MARQUES, H. L. A.; PEREIRA, R. T. L.; CORREA, B. C. Seasonal variation in growth and yield of the brown mussel *Perna perna* (L.) cultured in Ubatuba, Brazil. **Aquaculture**, v. 169, p. 263–273, 1998.

MENDES, R.; PESTANA, C.; GONÇALVES, A. The effects of soluble gas stabilisation on the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2000-2009, 2008.

PENG, D. Y.; ROBINSON, D. B. A new two-constant equation of state. **Industrial Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 15, p. 59-64, 1976.

PETIT, H.; DAVIS, W.L.; JONES, R.G. Morphological studies on the mantle of the fresh-water mussel *Amblema* (UNIONIDAE): Scanning electron microscopy. **Tissue and Cell**, v.10 (4), p. 619-627, 1978.

REGALLA JR, C.; BRASIL, E. S.; LAITANO, K. S.; REIS FILHO, R. W. Physioecology of the mussel *Perna perna* (*Mytilidae*) in Southern Brazil. **Aquaculture**, v. 270, p. 464-474, 2007.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Solubility, absorption and desorption of carbon dioxide in chicken breast fillets. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 442-446, 2010.

ROTABAKK, B. T.; WYLLER, J.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for



non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008a.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14(2), p. 179-186, 2008b.

SÁENZ, L. A.; SEIBERT, E. L.; ZANETTE, J.; FIEDLER, H. D.; CURTIUS, A. J.; FERREIRA, J. F.; ALMEIDA, E. A.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 796–804, 2010.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A.; JÚNIOR, A. B. C.; ROHERS, F. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes da região litorânea da ilha de Santa Catarina. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053-1058, 2010.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO<sub>2</sub> in MAP systems: Advances for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 233–239, 2009.

SIMPSON, R.; ALMONACID, S.; ACEVEDO, C. Development of a Mathematical Model for MAP Systems Applied to Nonrespiring Foods. **Journal of Food Science**, v. 66, n.4, 2001.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilisation, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). **Food Science and Technology International**, v. 12(5), p. 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JENSEN, J. S. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 3: Cooked meat products. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 499-505, 2005.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; VAGANE, A.; ROSNES, J. T. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods.

Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61(3), p. 449-458, 2004a.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 451-458, 2004b.

SMITH, J. M.; VANNESS, H.; ABBOTT, M. **Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics**. 7<sup>o</sup> Ed., Editora: McGraw-Hill Companies, Incorporated, 840 p., 2004.

SOARES, L.S. **Estudo da absorção e desorção de CO<sub>2</sub> em ostras (*Crassostrea gigas*) durante a pré-solubilização**. 79 p. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SOKOLOWSKI, A.; BAWAZIR, A. S.; SOKOLOWSKA, E.; WOŁOWICZ, M. Seasonal variation in the reproductive activity, physiological condition and biochemical components of the brown mussel *Perna perna* from the coastal waters of Yemen (Gulf of Aden). **Aquatic Living Resources**, v. 23, p. 177-186, 2010.

TORRIERI, E.; CAVELLA, S.; VILLANI, F.; MASI, P. Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 1078–1086, 2006.

VERNOCCI, P.; MAFFEI, M.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GARDINI, F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). **Food Control**, v. 18, p. 1575-1583, 2007.

ZHAO, Y. Y.; WELLS, J. H.; MCMILLIN, K. W. Dynamic changes of headspace gases in CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> packaged fresh beef. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 571–575, 1995.



## **CAPÍTULO 4:**

### **EFEITO DO PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) NA QUALIDADE DE MEXILHÕES AZUIS COZIDOS (*Mytilus edulis*)**



## 4 EFEITO DO PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) NA QUALIDADE DE MEXILHÕES AZUIS COZIDOS (*Mytilus edulis*)

Este estudo foi desenvolvido durante o estágio doutoral no Processing and Technology Laboratory, no Norwegian Institute of Food, Fishery and Aquaculture (NOFIMA), em Stavanger, Noruega, sob a supervisão dos Drs. Morten Sivertsvik e Bjørn Tore Rotabakk. Para a execução desta etapa o mexilhão da espécie *Mytilus edulis*, conhecido como “blue mussel”, foi utilizado (por indisponibilidade da espécie *Perna perna* nessa região) na aplicação do processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> da embalagem durante o armazenamento.

### 4.1 Introdução

O mexilhão azul (*Mytilus edulis*) é um molusco bivalve importante no setor de frutos do mar europeu e norueguês, apresentado na Figura 4.1. O cultivo do mexilhão é uma das modalidades mais produtivas, devido ao baixo custo de produção e a facilidade no manejo, além do apelo nutricional (DIAS et al., 2010). Os mexilhões são conhecidos como um alimento saudável, por ter alto valor nutricional, sendo rico em proteína, similar àquela encontrada em leite e ovos, teores baixos de gordura e colesterol e uma excelente fonte de Ômega-3 (OLIVEIRA et al., 2011).

Figura 4.1 Mexilhões da espécie *Mytilus edulis*, conhecido como mexilhão azul, prontos para o consumo.



A produção do mexilhão azul na Europa é em torno de 700.000 a 800.000 t por ano. As fazendas de cultivo na Noruega produzem em torno de 2.000 t por ano em cultivo suspenso, porém as atividades estão expandindo a cada ano. Para atingir este objetivo, o desenvolvimento de novos produtos com o aumento da vida útil em relação aos produtos frescos tradicionais aumentará a flexibilidade em relação ao transporte e manipulação dos produtos (SSB, 2013; SANDBERG et al., 2007).

Uma boa alternativa de consumo dos mexilhões seria na forma cozida e pronta para o consumo, com a manutenção de suas características. Para isto, a preservação dos mexilhões depende das técnicas que podem aumentar a vida útil de alimentos associado com a manutenção de suas características sensoriais. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é um gás que tem sido extensivamente estudado para uso em alimentos, especialmente em sistemas de embalagem com atmosfera modificada (LAMBERT et al., 1991; HOTCHKISS & LANGSTON, 1995; SIVERTSVIK et al., 2002). A atmosfera modificada é uma mistura de gases aplicada ao alimento na etapa de envase, sem necessariamente o controle da atmosfera no interior da embalagem durante o armazenamento do produto. O CO<sub>2</sub> não é tóxico e tem efeito bacteriostático, porém a efetividade do envase sob AM em frutos do mar é dependente da combinação de alguns fatores, como a condição da matéria prima, a quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido no produto (dado pela mistura gasosa, relação gás/produto e a quantidade de água e lipídios no produto), controle rigoroso da temperatura e o uso de material para embalagem com baixa permeabilidade gasosa (LÓPEZ-VÁSQUEZ & VANACLOCHA, 2004; SIVERTSVIK et al., 2002; SIMPSON et al., 2009).

A eficiência do envase sob atmosfera modificada pode ser aumentada em alimentos que não respiram, especialmente em frutos do mar, adotando uma relação gás/produto adequada para garantir a disponibilidade do CO<sub>2</sub> e para evitar o colapso da embalagem (ou efeito de murchamento) devido à alta solubilidade do CO<sub>2</sub>. Para frutos do mar, é recomendado uma relação gás/produto de 2:1 ou 3:1 (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006) e métodos alternativos para reduzir o volume necessário no *headspace* poderiam contribuir para maior quantidade de embalagens transportadas, com maior eficiência no ambiente.

Sivertsvik et al. (2003) desenvolveram um método para reduzir o tamanho de embalagem necessária para o envase, pela dissolução do CO<sub>2</sub> no produto antes do envase. A solubilidade do CO<sub>2</sub> aumenta sob baixas

temperaturas e pelo aumento da pressão parcial e total (SIVERTSVIK et al. 2004); uma quantidade suficiente de CO<sub>2</sub> pode ser dissolvida dentro do período de 1-2 horas antes do envase. Este método de pré-solubilização é conhecido como *Soluble Gas Stabilization* (SGS) capaz de prevenir o colapso da embalagem, possibilitando utilizar baixas relações g/p, e como consequência um menor volume de embalagem é necessário em relação ao envase tradicional sob atmosfera modificada (ROTABAKK et al., 2008a, 2008b; SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; SIVERTSVIK et al., 2004). O tratamento SGS tem mostrado resultados promissores em vários alimentos, como peito de frango, camarão, queijo, bacalhau, entre outros (ROTABAKK et al., 2010, SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; JAKOBSEN & RISBO, 2009; SIVERTSVIK, 2007).

A preservação dos mexilhões frescos pelo uso de atmosfera modificada combinada com a refrigeração tem sido estudada por vários autores (PASTORIZA et al., 2004; GOULAS et al., 2005; CAGLAK et al., 2008; MASNIYOM et al., 2011), contudo, a informação é limitada em relação ao papel da AM e o CO<sub>2</sub> no mexilhão cozido.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso da atmosfera modificada combinada com o uso do CO<sub>2</sub> pré solubilizado na vida útil de mexilhões da variedade azul.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Matéria-prima, processamento e amostragem**

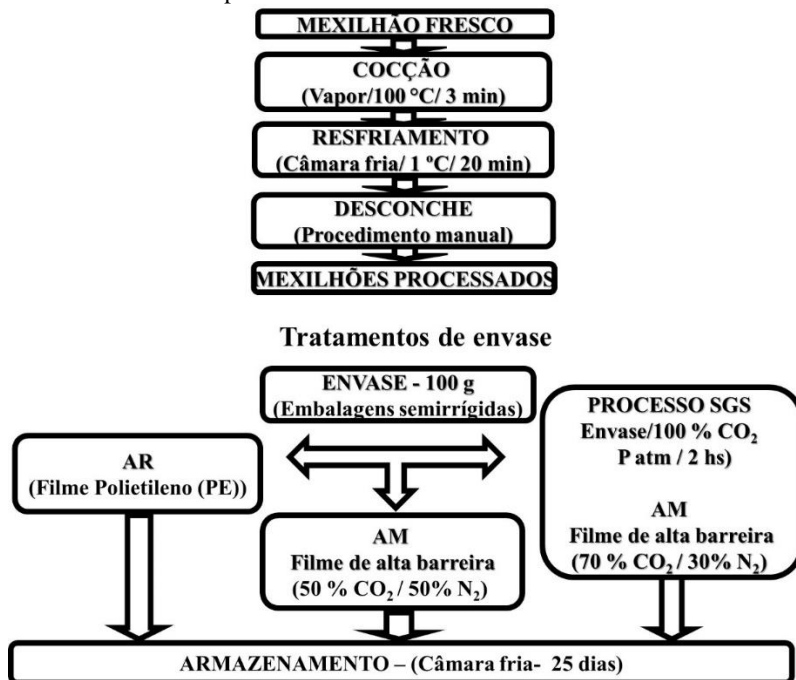
Os mexilhões azuis (*Mytilus edulis*) vivos cultivados na região Central da Noruega foram entregues durante a noite para o laboratório e armazenados em uma câmara fria a  $1 \pm 1$  °C até o processamento no dia seguinte.

Os mexilhões foram processados de acordo com o fluxograma demonstrado na Figura 4.1. Primeiramente, os mexilhões foram selecionados, onde foram descartados os mortos e com as conchas danificadas, seguido pela limpeza e remoção do bisso antes do cozimento a 100 °C em 3 minutos, usando um forno de convecção de vapor (Zanussi FCV/E10L, Pordenone, Itália). As amostras foram resfriadas em uma câmara fria (Metos BC161, Metos Norway, Oslo, Noruega) à temperatura de 1° C por 20 minutos com ar em alta velocidade antes da carne ser



removida manualmente das conchas. Os mexilhões desconchados foram aleatoriamente selecionados para os diferentes tratamentos.

Figura 4.1 - Fluxograma do procedimento adotado para o processamento e tratamentos de envase sob ar, atmosfera modificada e SGS combinado com atmosfera modificada para o mexilhão azul.



#### 4.2.2 Perfil de temperatura durante o tratamento térmico

O perfil de temperatura durante o tratamento térmico foi coletado a cada 10 segundos usando termopares do tipo K (PR. Electronics Inc., San Diego, EUA) conectados ao sistema de aquisição de dados (Ellab, Denmark). Os termopares foram posicionados dentro da carne contida na concha, e para assegurar que o termopar estivesse em contato direto com a carne dos mexilhões, as conchas foram abertas o suficiente para o posicionamento dos termopares, seguidos pelo fechamento natural pelo músculo adutor do mexilhão vivo. Outro termopar foi posicionado dentro do forno para medir a temperatura na mistura ar/vapor.

Os parâmetros calculados foram a letalidade do processo (valor F) e a inativação requerida (tempo necessário para atingir o nível de reduções log da população microbiana até um nível desejado). Com estes valores, foi escolhido calcular o número de reduções decimais requeridas para um grupo de micro-organismos, que podem estar presentes nos mexilhões. *Clostridium botulinum* foi escolhido, porque é o mais resistente ao processamento de mexilhões (LIMA et al., 2013). *Listeria monocytogenes* foi considerada devido à ocorrência de surtos em mexilhões (OVISSIPOUR et al., 2013). *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos tem também potencial para intoxicação alimentar, enquanto a ocorrência de *Staphylococcus aureus* está associada com as condições de higiene do produto durante o processamento (FORSYTHE, 2002). *Pseudomonas fluorescens* foi incluída porque estas bactérias são parte da microflora natural de moluscos marinhos e se desenvolvem sob temperaturas de refrigeração, sendo a principal bactéria deteriorante (LEBERT et al., 1998). A Tabela 4.1 apresenta os parâmetros de resistência ao tratamento térmico usados para calcular o processo de letalidade dos micro-organismos e as equações que descrevem os cálculos de letalidade dos micro-organismos (Mafart et al., 2010) são apresentadas abaixo:

$$F = \int_0^t L(t) dt \quad (4.1)$$

onde

$$L = 10^{-\frac{(T_K - T)}{z}} \quad (4.2)$$

Em que:

F = Letalidade do processo

T = Temperatura de exposição do alimento

T\* = temperaturas de referência para os valores D para os micro-organismos usados (Tabela 4.1)

L(t) = Fator de letalidade

z = é a mudança de temperatura requerida para aumentar a inativação microbiana em 10 vezes (um ciclo log)

Tabela 4.1 - Resistência térmica para os micro-organismos usados neste estudo, onde D representa o tempo de redução decimal, o Z é a mudança de temperatura requerida para aumentar a taxa microbiana em 10 vezes, de acordo com o obtido através da literatura.

Micro-organismo	D (min)	Z (°C)	Temperatura de referência (°C)	Fonte
<i>Clostridium botulinum</i> não proteolítico Tipo E	1,5	10	90	ECFF (1996)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.3	7.0	70	ECFF (1996)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2	7.5	60	Tucker; Featherstone, (2010)
<i>Salmonella</i> spp	0.98	9.1	60	Adams (1995)
<i>Escherichia coli</i>	0.1	10.6	65	Adams (1995)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5.0	8.5	60	Adams (1995)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	8.8	60	Adams (1995)

Calculando F torna-se a soma dos valores de mortalidade obtida para cada faixa de temperatura alcançada durante todo o tratamento térmico, de acordo com o apresentado na Equação (4.3).

$$F = \sum_0^t L(t) \quad (4.3)$$

Onde:

L(T) = fator de letalidade, na faixa de 0 até  $t_{\text{final}}$ , durante o período de tratamento térmico

z = é a mudança de temperatura requerida para aumentar a taxa de inativação microbiana em 10 vezes (um ciclo log)

Com o tempo de redução decimal (D) na temperatura de processo, foi calculado o número de reduções decimais obtidas para cada tipo de micro-organismo no processo foi calculada a partir da Equação (4):

$$F = \gamma \cdot D * \quad (4.4)$$

### 4.2.3 Envase

Porções de  $100 \pm 2$  g de mexilhões processados foram colocados em bandejas de Polipropileno - Álcool vinílico de etileno - Polipropileno (PP-EVOH-PP) (Tray E1540, volume de 380 mL, EDV soluções em embalagens, Barcelona, Espanha). As amostras foram posteriormente embaladas em ar, em AM (atmosfera modificada) e outra parte das amostras submetidas ao processo SGS antes do envase sob AM. Os mexilhões controle (AP) foram envolvidos em filme de polietileno (PE) aderente aplicado em dupla camada ao redor de cada embalagem.

Para o envase sob atmosfera modificada, o ar atmosférico foi evacuado duas vezes (98 % vácuo) e o recipiente posteriormente lavado com uma mistura de gasosa de  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$  (50/50 %), antes da selagem a quente com filme de alta barreira ao  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  no topo da bandeja (90  $\mu\text{m}$  Poliamida/polipropileno, NOP101, Cryovac). A taxa de transmissão de  $\text{O}_2$  para o filme de cobertura foi  $40 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ , e para a bandeja  $0,004 \text{ cm}^3 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ . A taxa de transmissão de  $\text{CO}_2$  para o filme foi de  $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ . Todas as taxas de transmissão foram mensuradas a  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ , 0 % UR. Os gases de uso alimentício  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$  (AGA, Linde Gas, Stavanger, Noruega) foram misturados em um misturador de gás (Witt KM 100-2m, Witt Gasetechnik, Witten, Alemanha) que foram usados para obter a mistura gasosa desejada.

Os tratamentos SGS (2 h a  $1 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foram realizados em lotes de 6 bandejas dentro de um saco selado a quente de 20- $\mu\text{m}$  de poliamida (PA) /70- $\mu\text{m}$  polietileno (PE) - (700  $\times$  500 mm, Star-pack produktie B.V., Waalwijk, Holanda), onde a atmosfera foi evacuada duas vezes (95% vácuo, CVP Fresh Vac Model A-600, Downers Grove, IL, EUA) e lavados com 100 % de  $\text{CO}_2$  de grau alimentício. A composição gasosa sob o tratamento SGS, foi  $97,0 \pm 0,13 \%$   $\text{CO}_2$  e a pressão total foi equivalente à pressão atmosférica. A taxa de transmissão de  $\text{O}_2$  para o saco foi de  $30 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ . Os sacos com SGS eram grandes o suficiente para garantir o excesso de disponibilidade de  $\text{CO}_2$  (grau de enchimento de aproximadamente 7,0% [mL produto / mL de volume da embalagem]). Imediatamente após o tratamento SGS, os produtos foram embalados sob AM como descrito acima, usando uma mistura gasosa de  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$  (70/30 %). Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração ( $3 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até a realização de análises físico-químicas e das embalagens (após 3, 10, 15, 19 e 22 dias), e microbiológica (depois de 4, 11, 16, 19 e 22 dias) de armazenamento.

#### 4.2.4 Análise das embalagens

O volume no *headspace* das embalagens foram determinados pela imersão da embalagem sob água e medindo a força resultante por um analisador de textura (Stable Micro System Ltd., TAXT plus Godalming, Inglaterra), conforme já descrito em detalhes no item 2.2.6 do Capítulo 2, seguindo a metodologia de Rotabakk et al. (2007). As medidas da Força de Buoyancy foram feitas a 26 s, 28 s e 30 s. Uma media das três medições foram usadas para a análise estatística dos dados.

A composição gasosa no *headspace* das embalagens foi realizada em duplicata em cada bandeja pelo uso do analisador de oxigênio e dióxido de carbono (Analisador Checkmate 9900, PBI-Dansensor, Ringsted, Dinamarca). A coleta das amostras de gás foi realizada através de um septum de borracha (Nordic Supply, Skodje, Noruega), adaptado na parte externa do filme de cobertura e injetada em analisador de gás pra obtenção da concentração de CO<sub>2</sub>.

##### *Análises físico-químicas*

O pH foi medido em triplicata, diretamente nos mexilhões com um pHmetro (Orion 420 A-plus Benchtop, Thermo Electron Cooperation, Cambridgeshire, Reino Unido) utilizando um eletrodo do tipo “ponta de lança” (Thermo, Thermo Electron Cooperation).

O conteúdo de água foi medido em duplicata pela secagem em estufa a 105 °C durante 18 h de acordo com Skipnes et al. (2007).

A capacidade de retenção de água foi calculada em duplicata através da pesagem das amostras antes e após a centrifugação a 1800 rpm durante 15 minutos a 4 °C como descrito em detalhes por Skipnes et al. (2007).

A análise instrumental da textura (firmeza) foi realizada uma vez em cada embalagem, medindo a força máxima de cisalhamento, utilizando uma célula de cisalhamento de Kramer (KSC) acoplada ao texturômetro (Stable Micro System Ltd., TAXT plus Godalming, Inglaterra), com uma célula de carga de 500 N. Aproximadamente 50 g de mexilhões de cada embalagem foram submetidos ao teste com velocidade de 3 mm.s<sup>-1</sup> e os resultados de firmeza expressos como N.g<sup>-1</sup>.

A perda de água foi medida gravimetricamente, como a diferença de massa entre o mexilhão inteiro cru (a água livre acumulada dentro da

concha foi removida pelo estímulo à abertura da concha dos mexilhões vivos) e mexilhão cozido, em triplicata, usando a Equação (4.5).

$$\% PA = \frac{X_1 - X_2}{X_1} * 100 \quad (4.5)$$

Onde  $PA$  é a perda de água em cada etapa do processamento,  $X_1$  é a massa inicial do mexilhão inteiro e  $X_2$  é a massa após a etapa de cocção (%).

#### 4.2.5 Contagens microbiológicas

A avaliação microbiológica foi feita através da contagem total de mesófilos viáveis e contagem de psicrotróficos, nos mexilhões crus e cozidos. Amostras de  $\approx 10$  g de mexilhões foram homogeneizadas com água peptonada na proporção 1:10 (1% NaCl (m/v) e 0,1% de peptona (m/v) durante 120 s em um homogeneizador 400 Laboratory Blender (AJ Steward Company LTD, Londres, Inglaterra). Para o material cru as contagens de mesófilos e psicrotróficos foram realizadas em alíquotas, a partir de diluições apropriadas foram adicionados ao agar ferro derretido e temperado ( $45^\circ\text{C}$ ) com uma sobreposição (Agar Ferro Lyngby, Oxoid CM 964, Basingstoke, Inglaterra).

O agar foi suplementado com 0,04% de L-cisteína, e incubado a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 3 dias para contagem de mesófilos, enquanto para contagem de psicrotróficos, foram incubados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 10 dias. As colônias pretas foram contadas como bactérias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$  e os mesófilos totais foram contados como a soma total das colônias pretas com as demais colônias.

Para os mexilhões cozidos, avaliados durante todo o período de armazenamento (0, 4, 11, 16, 19 e 22 dias), as contagens de mesófilos e de psicrotróficos foram determinadas pelo método de espalhamento em placas com agar (PCA, Merck, Darmstadt, Alemanha) adicionado com 1% NaCl, a fim de suprir o crescimento de algumas espécies de bactérias que necessitam de sal para o seu desenvolvimento, pelo fato do mexilhão ser proveniente do ambiente marinho. As placas foram incubadas para a contagem de mesófilos a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 3 dias, e para as contagens de psicrotróficos, a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 10 dias. As duplicatas foram preparadas para cada embalagem analisada (4 para cada ponto experimental) e os resultados médios das medidas estão apresentados como o logaritmo das

unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de carne e usado para análise estatística dos dados.

#### 4.2.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados considerando cada embalagem analisada em cada ponto experimental do armazenamento. Para isto, foi usada a análise de variância de uma via (ANOVA) e modelo linear geral (MLG) foram realizados com o *software* Minitab 14.13 (Minitab, Coventry, Reino Unido.) usando o teste de Tukey com significância  $P < 0,05$  (95%), para verificar se existem diferenças significativas entre os processos testados e as mudanças nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos durante o período de armazenamento.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Caracterização dos mexilhões crus e cozidos

As amostras cruas foram analisadas no mesmo dia do processamento e apresentaram as seguintes características iniciais: a média do pH para o mexilhão cru foi de  $6,8 \pm 0,12$ ; conteúdo de água de  $82,8 \pm 1,3$  % e Capacidade de Retenção de Água (CRA) de  $66,1 \pm 1,9$  %. Os níveis microbiológicos para os mexilhões crus foram  $4,07 \pm 0,56$  log (UFC/ g) para bactérias produtoras de  $H_2S$ ,  $5,81 \pm 0,78$  log (UFC/ g) para contagem total de mesófilos e  $5,01 \pm 0,41$  log (UFC/ g) para contagem de psicrotróficos, respectivamente. Estes resultados são típicos para mexilhões crus que normalmente possuem uma carga microbiana alta devido à sua atividade filtrante, onde matéria orgânica e inorgânica é retida. Isto reflete as características microbiológicas do seu *habitat*, e principalmente a qualidade da água (LIMA et al., 2013). O tratamento térmico é importante não somente para remover a carne das conchas, mas também para reduzir a contagem microbiana no produto cozido e eliminar os patógenos. O produto cozido apresentou aproximadamente 4 reduções decimais para a contagem de mesófilos ( $1,32 \pm 0,5$  log UFC/g) e  $1,08 \pm 0,45$  log UFC/g para psicrotróficos, enquanto as bactérias produtoras de  $H_2S$  não foram detectadas. Mendes et al. (2011) detectou bactérias produtoras de  $H_2S$  depois de 3 dias em polvo armazenado com ar e uma

quantidade desprezível em amostras tratadas com SGS depois de 13 dias, e atribuíram esta baixa contagem como resultado da inibição por *Pseudomonas* spp. Neste estudo, as bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S não foram detectadas após o tratamento térmico e tampouco durante o armazenamento.

#### **4.3.2 Perda de água após o processamento**

A média da perda de água durante o processo de cocção e após o resfriamento foi de  $30,53 \pm 0,72$  % resultando em um produto cozido com conteúdo de água em torno de 76,2%. Este parâmetro varia com o tempo e método de cocção e resfriamento, e tem influência direta nas outras propriedades sensoriais, em especial a textura. Cavalheiro et al. (2012) avaliou a perda de peso durante a cocção de mexilhões sob vapor e resfriamento imerso (6 min); cocção a vapor e resfriamento a vácuo (8 min) e cocção imersa e resfriamento a vácuo (8 min) e obtiveram perdas de água de 39,1%, e 39,6%. A diminuição da perda de água durante o processo poderia potencialmente aumentar o rendimento, e portanto, pode ser benéfico ao processo.

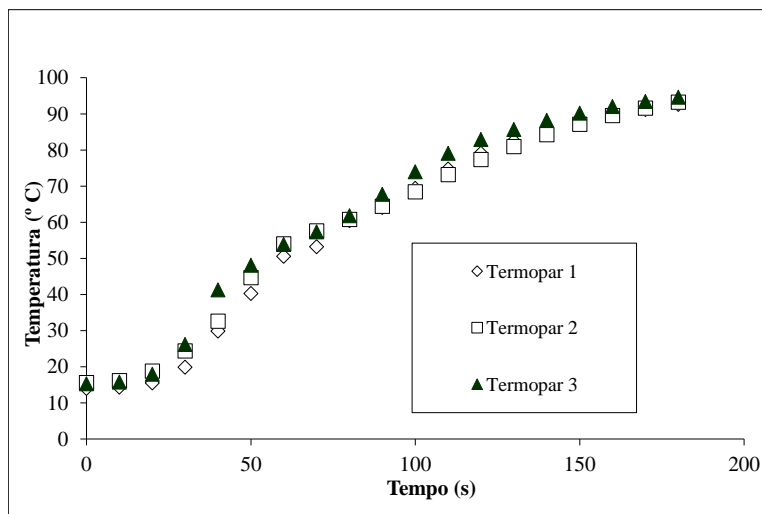
#### **4.3.3 Perfil do tratamento térmico**

O perfil de temperatura dentro dos mexilhões durante a cocção é mostrado pela Figura 4.2.

. Os três minutos de tempo de tratamento térmico foram determinados durante os ensaios iniciais testando diferentes tempos de processo tendo como parâmetro a facilidade de remoção da carne da concha sem que provocasse excesso de cocção. Azanza et al. (2005) obtiveram 100% de abertura das conchas em mexilhão usando ar saturado com água a 100 °C durante 3 minutos. O curto período de cocção pode evitar mudanças indesejáveis nas frações protéicas e lipídicas e devem assegurar que os micro-organismos alvo sejam eliminados e/ou reduzidos.



Figura 4.2 - Perfil de temperatura dos mexilhões durante o processo de cozimento.



A Tabela 4.2 mostra os resultados encontrados para a letalidade calculada durante o processo de cocção. Todos os micro-organismos seriam totalmente inativados, tendo em vista o histórico de temperatura obtido, onde o F do processo teve altos valores comparando com o F requerido para o processo para cada micro-organismo alvo. Contudo, para o *Clostridium botulinum* não-proteolítico Tipo E, a carga térmica foi menor do que a requerida, com redução decimal de apenas 0,59. Este resultado é esperado, visto que esta bactéria requer uma redução de 6 ciclos log, com uma carga térmica correspondente a 90 °C durante 10 min (EUROPEAN COMMISSION, 1997).

Tabela 4.2 - Perfil de temperatura dos mexilhões durante o processo de cozimento.

Micro-organismo	F (letalidade do processo - min)		Avaliação**	Número de reduções decimais ( $\gamma$ )***
	F processo	F requerido*		
<i>Clostridium botulinum</i> não-proteolítico Tipo E	1,1	9,00	$F_p < F_R$	0,59
<i>Listeria monocytogenes</i>	931,64	1,80	$F_p > F_R$	2217,76
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3949,26	19,20	$F_p > F_R$	603,88
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12410,75	5,88	$F_p > F_R$	2842,98
<i>Salmonella</i> spp.	2251,38	0,60	$F_p > F_R$	1792,53
<i>Staphylococcus aureus</i>	2952,26	30,00	$F_p > F_R$	152,07
<i>Escherichia coli</i>	248,85	90,00	$F_p > F_R$	2020,58

\* Calculado com base nas temperaturas reais de referência, e Z para cada micro-organismo. Para todos os micro-organismos, 6 reduções decimais foram consideradas.

\*\* Para os processos de pasteurização, uma redução decimal igual a 6 é suficiente; foram utilizados os menores valores encontrados para o F do processo nos cálculos.

Quando  $F_p > F_R$  existe letalidade alta para o processo aplicado;

Quando  $F_p < F_R$  tem-se letalidade insuficiente comparando com o tratamento térmico nos experimentos.

O tempo de processo térmico aplicado resultou em reduções decimais entre 152,07 até 2842,98 para os outros microorganismos alvo que poderiam estar presentes em mexilhões, principalmente para *Listeria monocytogenes* e *Vibrio spp.*, comumente encontrado nesses moluscos, e também para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (KOLODZIESKA et al., 2002). Também *Pseudomonas sp.*, considerada como a principal bactéria deteriorante para moluscos refrigerados (HUSS, 1997) deve ser diminuída consideravelmente pelo processo.

Para aumentar ainda mais a vida útil, a cocção deve ser combinada com outros métodos de preservação não severos, como atmosferas protetoras (SGS, AM) e refrigeração (ROSNES et al, 2011).

#### **4.3.4 Avaliação da composição gasosa dos mexilhões envasados durante o armazenamento sob atmosfera modificada e SGS.**

A evolução do CO<sub>2</sub> e do O<sub>2</sub> (%) no *headspace* da embalagem está mostrado na Figura 4.3 e na Figura 4.4, respectivamente. A concentração de CO<sub>2</sub> mudou significativamente ( $P < 0,001$ ) durante o armazenamento e também entre os tratamentos. Para o tratamento SGS + AM, foi observado um pequeno decréscimo no CO<sub>2</sub> (70,3 % - 68,0 %, no equilíbrio), e permaneceu praticamente constante durante o armazenamento. Para as embalagens com AM, CO<sub>2</sub> diminuiu durante os primeiros 4 dias (52,3 % para 34,5 %). Depois de 10 dias, CO<sub>2</sub> aumentou (de 44,19 % até 55,38 % no 22° dia), resultando em embalagens infladas, provavelmente associado com o aumento da população microbiana e reações enzimáticas (mostradas posteriormente). Bono & Badalucco (2012) observaram o mesmo aumento de CO<sub>2</sub> em salmonete listrado armazenados sob AM depois de 3 dias e atribuíram este comportamento às atividades microbiana e enzimática. Para o acondicionamento em AR atmosférico, houve aumento na concentração de CO<sub>2</sub> durante o armazenamento com pico de 13,25 % no 16° dia de armazenamento. O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> foi devido ao aumento da contagem microbiana, que provocou deterioração em um curto período, principalmente pelos microorganismos do grupo psicotróficos que produzem CO<sub>2</sub> através de sua atividade metabólica.

O aumento da vida útil de mexilhões utilizando o CO<sub>2</sub> em AM de mexilhões crus foi relatada por Masnyiom et al. (2011), que obtiveram aumento da vida útil para 9 e 12 dias; e por Goulas et al. (2005), que obtiveram 14 dias de vida útil a 4 °C. Entretanto, não há estudos prévios que descrevam a aplicação do tratamento SGS em mexilhões.

Figura 4.3 - CO<sub>2</sub> no *headspace* das embalagens submetidas aos tratamentos com envase em AR, SGS + AM e AM durante o período de armazenamento.

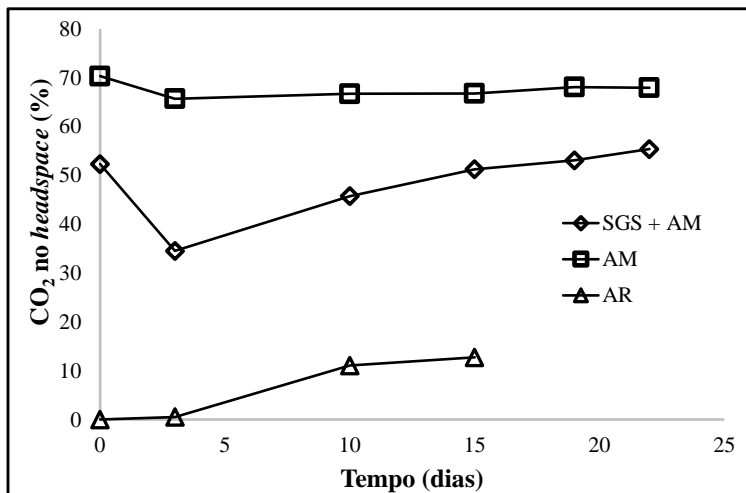
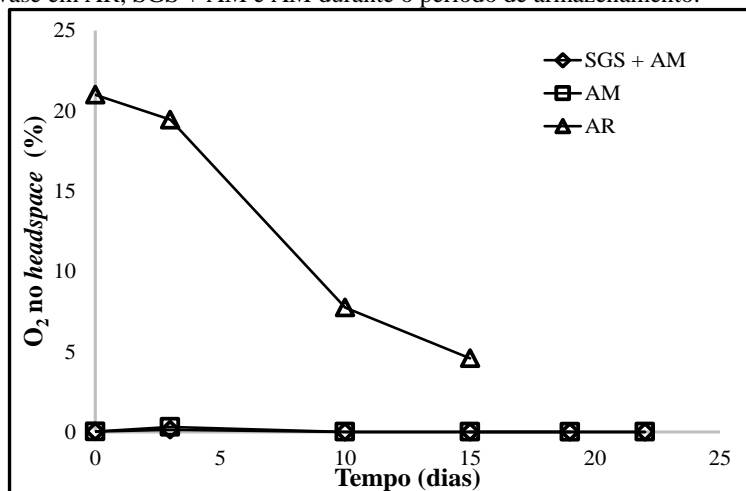


Figura 4.4 - O<sub>2</sub> no *headspace* das embalagens submetidas aos tratamentos com envase em AR, SGS + AM e AM durante o período de armazenamento.

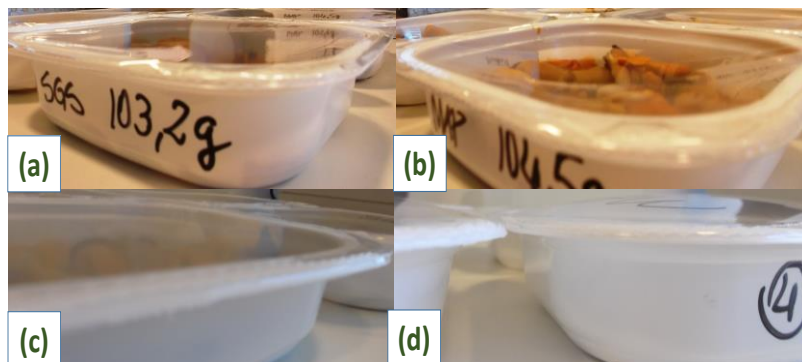


A composição de O<sub>2</sub> mudou significativamente durante o armazenamento ( $P < 0,001$ ). As amostras acondicionadas em AR tiveram

uma redução da composição de O<sub>2</sub> (≈21 %) até 5 %. A redução de O<sub>2</sub> dentro das embalagens durante o armazenamento está relacionado ao aumento da atividade microbiana. Para os tratamentos SGS + AM e AM, a composição do O<sub>2</sub> esteve em torno de 0 % durante todo o período de armazenamento.

O volume total (mL) nas embalagens mudou significativamente ( $P < 0,001$ ) durante o armazenamento e entre os tratamentos devido à absorção de CO<sub>2</sub> pelos mexilhões. No início do armazenamento, o tratamento SGS combateu o fenômeno de contração no filme de cobertura das embalagens ( $227,75 \pm 4,30$  mL), proporcionando uma superfície praticamente plana, enquanto que para as amostras sob AM o decréscimo de CO<sub>2</sub> causou o efeito de colapso nas embalagens ( $183,24 \pm 4,36$  mL). Comportamento semelhante foi obtido em outros estudos (AL-NEHLAWI et al., 2013; ROTABAKK et al., 2010; ROTABAKK et al., 2006; SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; JAKOBSEN & RISBO, 2009; SIVERTSVIK, 2007). A Figura 4.5 mostra a diferença visual entre os tratamentos SGS + AM e AM nas embalagens com mexilhão. Houve aumento de 134, 20 mL no SGS + AM (de  $240,42 \pm 10,31$  para  $374,62 \pm 46,49$ ) no final do armazenamento. Sivertsvik & Birkeland (2006) observaram o mesmo comportamento nas embalagens com camarão tratado com SGS e atribuíram a ligeira inflação do filme de cobertura para a liberação excessiva de CO<sub>2</sub> dissolvido no camarão durante o tratamento SGS em alto teor de CO<sub>2</sub>, quando submetido a uma baixa pressão parcial de CO<sub>2</sub> (30%) na embalagem com aplicação de AM, de acordo com a Lei de Henry. Possivelmente ocorreu a mesma situação neste estudo, devido às baixas contagens microbianas nas amostras tratadas com SGS + AM. Para as embalagens AM, em 10 dias, o colapso foi substituído pela inflação da embalagem, com o aumento significativo de volume ( $P = 0,007$ ) para  $245,57 \pm 27,62$  mL; e alcançou o maior volume aos 22 dias ( $414,95 \pm 11,20$  mL), acompanhada de deterioração evidente do produto a nível visual e de odor pungente.

Figura 4.5 - Grau de enchimento (tempo inicial e final) entre as embalagens com AM (deflação tampa em (b) e inchaço em (d)) e do processo de SGS + AM (sem colapso durante o armazenamento) (a) e (c).



#### 4.3.5 Propriedades físico-químicas

A Tabela 4.3 apresenta os principais efeitos para o pH, conteúdo de água (%), Capacidade de Retenção de Água (CRA - %), e Firmeza ( $N.g^{-1}$ ). Em relação ao produto recém-processado ( $pH = 6,46$ ) e o mesmo produto algumas horas após o envase o pH foi mais elevado nos mexilhões em contato com o ar (6,69) comparado com os tratamentos AM e SGS + AM (6,34 e 6,46), respectivamente, provavelmente causada pelo efeito da acidificação pelo  $CO_2$  absorvido (ZHAO & WELLS, 1995).

O pH foi significativamente diferente ( $P < 0,001$ ) entre os tratamentos durante o armazenamento, influenciado pelo crescimento microbiano e pelo  $CO_2$  absorvido. Durante o armazenamento, o pH decresceu significativamente ( $P = 0,006$ ) para todos os tratamentos, atingindo valores de 6,51 para as embalagens AR, 6,07 para AM e 6,42 para SGS + AM, respectivamente. O decréscimo de pH nos mexilhões durante o armazenamento tem sido relatado em mexilhão cru armazenado sob atmosfera modificada (MASNIYOM et al., 2011; CAGLAK et al., 2008). Mudanças *post-mortem* no músculo adutor e na carne dos mexilhões promove a queda do pH devido ao acúmulo de ácido lático gerado em condição anóxica de glicogênio após o armazenamento refrigerado (PACHECO-AGUILLAR et al., 2008; DE VIDO et al., 2001).

Os mexilhões apresentaram valores elevados de conteúdo de água (em torno de 76 %). Normalmente, alimentos com elevado conteúdo de água são mais perecíveis em virtude da alta atividade de água e pelo típico pH alto (6,7 – 7,1) (GOULAS et al, 2005).

O conteúdo de água depende do tipo de processo empregado para separar a carne da concha. Lima et al. (2013) encontraram 76,9 % de conteúdo de água em mexilhões prontos para consumo; por outro lado, tem sido mostrados altos valores (81%) usando resfriamento imerso (CORDEIRO et al., 2007).

O conteúdo de água permaneceu estável durante o armazenamento ( $P = 0,631$ ). Visualmente foi possível perceber algum exsudado no interior das embalagens. Os tratamentos de embalagem influenciaram significativamente ( $P = 0,003$ ) no conteúdo de água. Mexilhões embalados com AR apresentaram maior conteúdo de água ( $\approx 77$  %) quando comparado com AM e SGS + AM ( $\approx 76$  %) provavelmente associado com a influência do  $\text{CO}_2$  visto que o  $\text{CO}_2$  dissolvido pode aumentar a perda por gotejamento nas embalagens (SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006). Contudo, não houve influência do tempo de armazenamento ( $P = 0,087$ ) ou tratamento ( $P = 0,108$ ) na capacidade de retenção de água. Uma alta retenção de água é desejada nos produtos de pescado, porque resulta em melhores características de textura, suculência, cor e sabor. Os produtos com baixa CRA acumulam exsudado que se tornam um critério de rejeição pelo consumidor (SKIPNES et al., 2007). Um estudo com mexilhão cru mostrou maior quantidade de exsudado em altas concentrações de  $\text{CO}_2$  e os autores atribuíram este efeito devido a redução de pH causado pelo  $\text{CO}_2$ , reduzindo a CRA (MASNIYOM et al., 2011). Torrieri et al. (2006) descrevem que a maior perda da CRA da proteína muscular ocorre em valores de pH mais baixos. Contudo, neste estudo, o decréscimo observado no pH não influenciou a CRA e observou-se um efeito menor sobre o teor de água.

Tabela 4.3 - Efeito<sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e tratamentos de envase nas propriedades físico-químicas<sup>2</sup> (pH, conteúdo de água (%), Capacidade de Retenção de Água (CRA - %), e firmeza (N.g<sup>-1</sup>).

	<b>pH</b>	<b>Conteúdo de água (%)</b>	<b>CRA (%)</b>	<b>Firmeza (N.g<sup>-1</sup>)</b>
<b>Armazenamento (dias)</b>	(n=36)	(n=24)	(n=24)	(n=12)
0	6,49 <sup>a</sup>	76,16	72,52	3,11
3	6,49 <sup>a</sup>	76,03	77,63	2,74
10	6,50 <sup>a</sup>	76,00	77,57	3,48
15	6,37 <sup>ab</sup>	75,74	78,22	3,31
19	6,34 <sup>b</sup>	76,33	76,15	3,35
Efeito do tempo (valor P)	0,006	0,631	0,087	0,213
<b>Tratamento</b>	(n=60)	(n=40)	(n=40)	(n=20)
AR	6,60 <sup>a</sup>	76,67 <sup>a</sup>	75,02	3,19 <sup>ab</sup>
AM	6,30 <sup>b</sup>	75,91 <sup>b</sup>	76,56	2,80 <sup>a</sup>
SGS + AM	6,42 <sup>c</sup>	75,57 <sup>b</sup>	77,68	3,60 <sup>b</sup>
Efeito do tratamento (Valor P)	< 0,001	0,003	0,108	0,025

<sup>1</sup> Efeito do tratamento (valor P), análise de variância (ANOVA) (MLG) e teste de comparação múltipla de Tukey.

<sup>2</sup>Valores são dados como média dos mínimos quadrados. Médias com diferentes letras sobscritas em cada coluna são significativamente diferentes pela ANOVA (MLG) e teste de comparação média de Tukey.

A firmeza do mexilhão não apresentou mudanças significativas ( $P= 0,213$ ) (N.g<sup>-1</sup>) durante o armazenamento. Entretanto, a firmeza foi significativamente ( $P = 0,025$ ) aumentada no tratamento SGS + AM (3,60 N.g<sup>-1</sup>) quando comparada ao tratamento AM. Este efeito pode ser atribuído à elevada quantidade de CO<sub>2</sub> presente dentro das embalagens, juntamente com o conteúdo de água mais baixo apresentado pelos mexilhões embalados com AM e SGS + AM, tornando o mexilhão com textura mais firme do que os outros tratamentos. Embora a textura esteja intimamente correlacionada com o teor de água do músculo, quando este possui um maior teor de água, percebe-se maior maciez (SKIPNES et al., 2011). Neste estudo, entretanto, a combinação dos resultados para SGS + AM indicam que a CRA e firmeza foram mais elevadas na presença de altas concentrações de CO<sub>2</sub>, em comparação com o tratamento com AM. Comportamento oposto ao observado em produtos de pescado por



Sivertsvik et al. (2002) que relatou que altas concentrações de CO<sub>2</sub> podem promover amolecimento no tecido, sem efeitos negativos na carne. Por outro lado, Sivertsvik et al. (2004) relataram que as propriedades de suculência pode ser afetadas pela solubilização do CO<sub>2</sub> em tecidos, que promove a redução da retenção de água.

#### **4.3.6 Avaliação microbiológica**

A análise estatística ( Tabela 4.4) revelou efeito dos tratamentos ( $P < 0,001$ ) e armazenamento ( $P < 0,001$ ) para os micro-organismos mesófilos e psicrotróficos. A Figura 4.6 mostra a evolução das contagens microbianas para os mesófilos e a Figura 4.7 a evolução para os psicrotróficos em mexilhões cozidos. As contagens iniciais foram baixas (1,32 log UFC/g para os mesófilos e 1,09 log UFC/g para psicrotróficos). No 4º dia, a contagem de mesófilos apresentou aumento significativo no crescimento ( $P = 0,0167$ ) (Mesófilos: 3,32 log UFC/g e Psicrotróficos: 3,40 log UFC/g) quando comparado com outros tratamentos (AM: 2,52 log UFC/g para mesófilos e 2,43 log UFC/g para Psicrotróficos e SGS + AM: 1,53 log UFC/g e 0,94 log UFC/g respectivamente). O crescimento mais pronunciado para mesófilos é justificada pelas mudanças da microflora devido à diferentes capacidades dos micro-organismos a tolerar as condições de acondicionamento e armazenamento (GRAM & DALGAARD, 2002). Neste caso, a presença de elevada quantidade de CO<sub>2</sub> no tratamento SGS + AM retardou o crescimento microbiano para os mesófilos e psicrotróficos, comparando com os outros tratamentos (Figura 4.6 e Figura 4.7). O envase com AM também reduziu o crescimento de Mesófilos: 3,12 log UFC/g e Psicrotróficos: 2,76 log UFC/g. O tratamento SGS também causou decréscimo nas contagens totais de mesófilos em camarão pronto para consumo em 1,0 log UFC/g e psicrotróficos em 0,9 log UFC/g e em alabote do Atlântico em 0,4 log UFC/g comparado com AM (SIVERTSVIK; BIRKELAND, 2006; ROTABAKK et al., 2007).

Figura 4.6 - Contagem microbiológica para mesófilos em mexilhões cozidos.

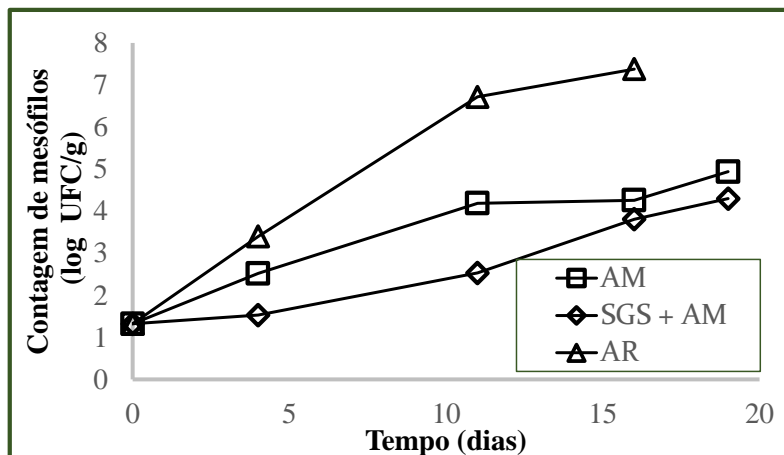
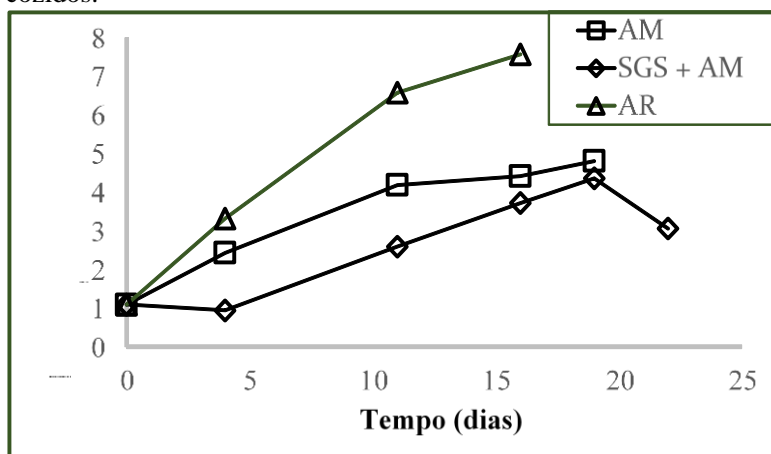


Figura 4.7 - Contagem microbiológica para psicrotórficos em mexilhões cozidos.



Aos 11 dias as amostras com AR alcançaram 6,72 log UFC/g de mesófilos e 6,58 log UFC/g para a contagem de psicrotórficos. Para os produtos de pescado, a contagem de mesófilos para rejeição sensorial é

de 7–8 log UFC/g e o limite de aceitabilidade é de 6 log UFC/g para bactérias aeróbias mesófilas. A contagem de bactérias aeróbias nem sempre representa deterioração, porém as análises de bactérias psicrotróficas fornece melhores resultados sobre os mecanismos de deterioração para estimar a qualidade de pescado (MOL et al., 2007). Para o mexilhão cozido armazenado em ar neste estudo, foi visível a presença de colônias e mudança na estrutura (carne mais mole e escura). No 16º dia de armazenamento, as amostras com AR alcançaram 7,57 log UFC/g, estágio de deterioração completa. A mesma evolução nas contagens microbianas foram encontradas por Masnyiom et al. (2011) (4 to 7 log UFC/g) para mesófilos em 15 dias de armazenamento para mexilhão cru armazenado em ar, contagem superior às encontradas em mexilhões mantidos sob atmosferas ricas em CO<sub>2</sub>.

Contagens de mesófilos e psicrotóxicos podem ser usadas para estimar a vida útil de frutos do mar, porém devem ser avaliados juntamente com determinações químicas, bioquímicas e sensoriais (KHAN et al., 2005). Para cada dia de amostragem, algumas amostras com AR foram abertas para verificar os aspectos sensoriais e foi concluído que as amostras com AR apresentaram boas características para consumo até o máximo de 5 dias, e também, colônias microbianas visíveis na carne apareceram depois de 7 dias de armazenamento.

Tabela 4.4 - Efeito<sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e tratamentos de envase nas contagens microbiológicas<sup>2</sup> (micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em mexilhões cozidos (*Mytilus edulis*)).

	Mesófilos	Psicrotróficos
<b>Armazenamento (dias)</b>	(n=24)	(n=24)
0 (n=4)	1,31 <sup>a</sup>	1,08 <sup>a</sup>
4 (n=12)	2,48 <sup>b</sup>	2,23 <sup>b</sup>
11 (n=12)	4,41 <sup>c</sup>	4,45 <sup>c</sup>
16 (n=12)	5,15 <sup>c</sup>	5,24 <sup>d</sup>
19 (n=12)	5,21 <sup>c</sup>	5,27 <sup>c</sup>
22 (n=12)	4,38 <sup>c</sup>	3,86 <sup>c</sup>
Efeito do tempo (valor P)	< 0,001	< 0,001
<b>Tratamento</b>	(n=48)	(n=48)
AR	5,13 <sup>a</sup>	5,07 <sup>a</sup>
AM	3,53 <sup>b</sup>	3,36 <sup>b</sup>
SGS + AM	2,81 <sup>b</sup>	2,63 <sup>c</sup>
Efeito do tratamento (valor P)	< 0,001	< 0,001

<sup>1</sup> Efeito do tratamento (valor P), análise de variância (ANOVA) (MLG) e teste de comparação múltipla de Tukey.

<sup>2</sup> Valores são dados como média dos mínimos quadrados. Médias com diferentes letras sobscritas em cada coluna são significativamente diferentes pela ANOVA (MLG) e teste de comparação média de Tukey.

Ambos os tratamentos AM (Mesófilos: 4,94 log UFC/g e Psicrotróficos: 4,81 log UFC/g) e SGS + AM (Mesófilos: 4,30 log UFC/g e Psicrotróficos: 3,06 log UFC/g) não alcançaram níveis microbianos muito elevados no final da vida útil. Entretanto, o odor dos mexilhões no momento da abertura das embalagens indicou que o produto estava com deterioração aparente no último dia de armazenamento. A elevada atividade microbiana também pode ser vista como resultado do consumo de O<sub>2</sub> (Figura 4.3 e Figura 4.4) indicando a presença de bactérias respiratórias deteriorantes, frequentes em produtos de pescado, como *Shewanella* e do grupo *Pseudomonas* (GRAM & DALGAARD, 2002). Nos tratamentos AM e SGS + AM, O<sub>2</sub> desapareceu completamente (0,02 % - 0,00 %) assumindo que foi consumido pelo metabolismo bacteriano e processos bioquímicos oxidativos, como relatado em sardinha armazenada sob ar em estudo testando SGS, vácuo e AM por Mendes et al. (2008).

Entretanto, a combinação dos resultados microbianos com características indesejáveis para consumo foram considerados para determinar o tempo de armazenamento dos mexilhões, como *off-flavors* e alterações visuais como consequência da liberação de compostos voláteis e reações enzimáticas. Gram & Dalgaard (2002) relataram que a formação de aminas, sulfuretos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos com *off-flavor* desagradável e inaceitável é uma consequência da deterioração de alimentos, devido a crescimento microbiano e metabolismo. As amostras com AM apresentaram odor aceitável durante a abertura das embalagens até o 11º dia, e embora a contagem microbiana tenha permanecido baixa, o odor foi inaceitável aos 19 dias de armazenamento, por isso não recomendado para consumo

Os mexilhões tratados com SGS + AM apresentaram boas características sensoriais até o 19º dia. Depois desse período, houve uma inflação no interior das embalagens e para verificar se a razão era o crescimento microbiano, as embalagens foram abertas para realizar os experimentos microbiológicos. A inflação de gás provavelmente foi causada pela produção de metabólitos primários indesejáveis como trimetilamina e óxido de trimetilamina, outras aminas e amônia. Lu (2009) relatou a importância de observar que, mesmo em ambiente com concentrações de CO<sub>2</sub>, há a possibilidade para a proliferação de micro-organismos psicrotróficos, anaeróbios facultativos ou patógenos estritamente anaeróbios, tais como *Clostridium botulinum* não proteolítico e *Listeria monocytogenes* em frutos do mar. Novos estudos com a preservação de mexilhões cozidos evitando esses micro-organismos patogênicos devem ser realizados.

#### 4.4 Conclusões

O tratamento SGS influenciou no volume total da embalagem, promovendo a estabilidade do produto durante o armazenamento, sem alterações no teor de CO<sub>2</sub> e no filme de cobertura, enquanto as embalagens com AM apresentaram colapso visível, resultado da absorção do CO<sub>2</sub> do *headspace* até o equilíbrio, demonstrando claramente a necessidade de se pré-solubilizar o CO<sub>2</sub> no produto para evitar o problema. A presença de CO<sub>2</sub> nos mexilhões reduziu o conteúdo de água e o pH, aumentou a firmeza e não influenciou a CRA, quando comparados com o envase com ar.

O aumento da contagem total de mesófilos e psicrotróficos foi inibida pelo tratamento SGS + AM, em relação aos demais tratamentos. No produto com AR, houve aparecimento de colônias visíveis aos 13 dias, com aproximadamente 7 ciclos log UFC/g.

A aplicação do tratamento SGS nos mexilhões resultou em um efeito bacteriostático, comparado com o envase em AR e foi mais efetivo que o envase em AM contribuindo para a melhora da qualidade microbiológica e extensão da vida útil do mexilhão cozido.

Assim, foram obtidas vida útil de 19 dias para o tratamento SGS + AM, 11 dias para o tratamento AM e apenas 5 dias para os mexilhões acondicionados com ar.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food Microbiology**, 4<sup>th</sup> edition, New Age International (P) Limited Publishers, New Delhi, India, 1995.

AL-NEHLAWI, A.; SALDO, J.; VEGA, L. F.; GURI, S. Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pretreatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks, **Meat Science**, (2012), doi: 10.1016/j.meatsci.2012.12.008

AZANZA, M. P. V.; AZANZA, R. V.; VENTURA, S. Heat shocking of Philippine green mussels, *Perna viridis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 689-694, 2005.

BONO, G.; BADALUCCO, C. Combining ozone and modified atmosphere packaging (MAP) to maximize shelf-life and quality of striped red mullet (*Mullus surmuletus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 500-504, 2012.

CAGLAK, E; CAKLI, S.; KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1293-1299, 2008.

CAVALHEIRO, D.; SCHMIDT, F. C.; RODRIGUES, L. G. G.; SIGA, C.; LEITEMPERGHER, F.; LAURINDO J.B. Processing of *Perna perna* mussels using integrated process of cooking and vacuum cooling. **Journal of Food Process Engineering**, 2012.

CORDEIRO, D.; LOPES, T. G. G.; OETTERER, M.; PORTO, E. GALVÃO, J. A. Qualidade do Mexilhão *Perna perna* submetido ao Processo Combinado de Cocção, Congelamento e Armazenamento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n.1, p. 165-179, jan.-jun. 2007.

DE VIDO, D. M. N.; PAREDI, M. E.; CRUPKIN, M. Postmortem changes in the adductor muscle of scallop (*Chlamys tehuatlensis*) in chilled and frozen storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 10, p. 49-59, 2001.

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; MARIN, V. A. Evaluation of antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* strains isolated from mussels (*Perna perna* linnaeus 1758). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 329-324, abr-jun, 2010.

ECFF. **Report: Guideline for the hygienic manufacture of chilled foods**. European chilled food federation, 1996.

EUROPEAN COMMISSION. **Harmonization of safety criteria for minimally processed foods**. Martens, T. and Luchetti, A. European Commission. Report: FAIR Concerted action CT96-1020, p. 36-37, 1997.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre :Artmed, 424 p. 2002.

GOULAS, A. E.; CHOULIARA, I.; NESSI, E.; KONTOMINAS, M. G.; SAWAIDIS, I. N. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal of Applied Microbiology**, n. 98, p. 752-760, 2005.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p 262-266, 2002.

HOTCHKISS, J. H.; LANGSTON, S. W. **MAP of cooked meat and poultry products**. Em: Farber JM, Dodds KL, editors. Principles of modified-atmosphere and sous vide product packaging. Lancaster, Pa.: Technomic Publishing Co. p. 137-152. 1995.

HUSS. H. H. **Quality assurance for the products of fishing**. FAO Technical document about the fishing. n. 334. Roma, FAO. 1997. 176p.

JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified by semihard cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p 285-290, 2009.



KHAN, M. A.; PARRISH, C. C.; SHAHIDI, F. Enumeration of total heterotrophic and psychrotrophic bacteria using different types of agar to evaluate the microbial quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) and sea scallops (*Placopecten magellanicus*). **Food Research International**, v. 38, p. 751-758, 2005.

KOŁODZIEJSKA I.; NIECIKOWSKA C.; JANUSZEWSKA E.; SIKORSKI, Z. E. The microbial and sensory quality of mackerel hot smoked in mild conditions. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v. 35:87, 2002.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf-life extensions and microbiological safety of fresh meat – a review. **Food Microbiology**, v. 8 (4), p.267-297, 1991.

LEBERT, I.; BEGOT, C.; LEBERT, A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97– 1.00) and temperature (7–25°C). **International Journal of Food Microbiology**, v. 39 p. 53–60, 1998.

LIMA, M.; MELO, M. C. L.; MONTEIRO, A. R. Evaluation of the processing of *Perna perna* mussels: the influence of water quality involved in the cooling operations in the physico-chemical and microbiological characteristics of the product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93(13), p. 3322-3329, 2013.

LÓPEZ-VÁSQUEZ, R.; VANACLOCHA, A. **Tecnología de Mataderos**. Ediciones Mundi-Prensa, 2004.

LU, S. Effects of bactericides and modified atmosphere packaging on shelf-life of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p.286–291, 2009.

MAFART, P.; LEGUÉRINEL, I.; COUVERT, O.; COROLLER, L. Quantification of spore resistance for assessment and quantification of heating processes: A never-ending story. **Food Microbiology**, v. 27, p. 568 – 572, 2010.

MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Extending the shelf-life of refrigerated green mussel (*Perna viridis*) under modified

atmosphere packaging. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.33, n.2, 171-179, Mar. - Apr. 2011.

MENDES, R.; SILVA, H. A.; ANACLETO, P.; CARDOSO, C. Effect of CO<sub>2</sub> dissolution on the shelf life of ready-to-eat *Octopus vulgaris*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 551–561, 2011.

MENDES, R.; PESTANA, C.; GONÇALVES, A. The effects of soluble gas stabilisation on the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2000-2009, 2008.

MOL. S.; ERKAN, N.; ÜÇÖK, D.; TOSUN, Y. Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. **Journal of Muscle Foods**, v. 18, p. 120-128, 2007.

OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J. L.; PEREIRA, M. J. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, p. 805-816, 2011.

OVISSIPOUR, M.; RASCO, B.; TANG, J.; SABLANI, S. S. Kinetics of quality changes in whole blue mussel (*Mytilus edulis*) during pasteurization. **Food Research International**, v. 53, p. 141–148, 2013.

PACHECO-AGUILAR, R.; MARQUEZ-RIOS, E.; LUGO-SANCHEZ, M.; GARCIA-SANCHEZ, G.; MAEDA-MARTINEZ, A. N.; OCANO-HIGUERA, V. M. Postmortem changes in the adductor muscle of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) during ice storage. **Food Chemistry**, v. 106, p. 253-259, 2008.

PASTORIZA, L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA, J. J. R. Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussel stored refrigerated. **European Food Research Technology**, v. 218, p. 415-419, 2004.

ROSNES, J. T.; SKÅRA, T.; SKIPNES, D. Recent Advances in Minimal Heat Processing of Fish: Effects on Microbiological Activity and Safety. **Food Bioprocessing Technology**, v. 4, p. 833–848, 2011.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Solubility, absorption and desorption of carbon dioxide in chicken breast fillets. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 442-446, 2010.

ROTABAKK, B.T; WYLLER, J.; LEKANG, O.I; SIVERTSVIK, M. A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 479-490, 2008a.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, S.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14(2), p. 179-186, 2008b.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, 82, 43-50, 2007.

ROTABAKK, B. T.; BIRKELAND, W. K.; JEKSRUD, W. K.; SIVERTSVIK, M. Effect of modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization on the shelf life of skinless chicken breast fillets. **Journal of Food Science**, v. 71, n.2, 2006.

SANDBERG, M.G.; OLAFSEN, T.; TANGEN, K. The blue mussel industry in central Norway. **SINTEF Fisheries and Aquaculture**, SFH80 A076039 – Open report, 2007.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO<sub>2</sub> in MAP systems: Advances for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 233–239, 2009.

SIVERTSVIK, M. The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and

37ml/100ml carbon dioxide, **LWT-Food Science and Technology**, 40, 430-438, 2007.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilization, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). **Food Science and Technology International**, 12(5), 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; VAGANE, A.; ROSNES, J. T. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61(3), p. 449-458, 2004.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled stored on the microbial and sensory quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 1467-1472, 2003.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, K.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 107-127, 2002.

SKIPNES, D.; JOHNSEN, S. O.; SKARA, T.; SIVERTSVIK, M.; LEKANG, O. Optimization of heat processing of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) muscle with respect to cook loss, water holding capacity, color, and texture. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, p. 331–340, 2011.

SKIPNES, D.; ØSTBY, M. L.; HENDRICKX, M. E. A method for characterising cook loss and water holding capacity in heat treated cod (*Gadus morhua*) muscle. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1078–1085, 2007.

SSB. Statistics Norway. **Aquaculture 2012, preliminary figures**. Available in: <<http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-foreloepige/2013-06>>

06?fane=tabell&sort=nummer&tabell=117237> Access in: 13 dec 2013.

TORRIERI, E.; CAVELLA, S.; VILLANI, F.; MASI, P. Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 1078–1086, 2006.

TUCKER, G. S.; FEATHERSTONE, S. **Essentials of thermal processing**. 1<sup>st</sup> ed. USA: Blackwel. 2010. 264 p.

ZHAO, Y. Y.; WELLS, J. H.; MCMILLIN, K. W. Dynamic changes of headspace gases in CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> packaged fresh beef. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 571–575, 1995.



## **CAPÍTULO 5:**

**APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH)  
COMBINADA COM A PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub>  
(SGS) EM MEXILHÕES AZUIS COZIDOS (*Mytilus edulis*)**





## **5 APLICAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH) COMBINADA COM A PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO DE CO<sub>2</sub> (SGS) EM MEXILHÕES AZUIS (*Mytilus edulis*) COZIDOS**

Este capítulo apresenta a segunda parte do trabalho desenvolvido durante o estágio doutoral no *Processing and Technology Laboratory, Norwegian Institute of Food, Fishery and Aquaculture (NOFIMA)*, em Stavanger, Noruega, sob a supervisão dos Drs. Morten Sivertsvik e Bjørn Tore Rotabakk. Nesta etapa foi realizado um estudo combinando o processo de pré-solubilização do CO<sub>2</sub> (SGS) seguido da aplicação de alta pressão hidrostática em mexilhão azul *Mytilus edulis*, conhecido como “*blue mussel*”. Foram avaliadas as características físico-químicas e microbiológicas dos mexilhões durante 23 dias de armazenamento a 3°C.

### **5.1 Introdução**

O cultivo do molusco bivalve mexilhão azul (*Mytilus edulis*) está distribuído nas águas Europeias, estendendo-se desde o Mar Branco na Rússia até regiões como a costa do Atlântico, no sul da França (FAO, 2004). O mexilhão azul tem sido considerado um produto com potencial para a indústria na Noruega, devido ao litoral norueguês ser adequado para o cultivo desse molusco, com águas produtivas e protegidas. Cerca de 2.000 toneladas por ano são produzidas nas fazendas da Noruega, e há interesse em expandir a produção (ZIEGLER et al., 2012; SSB, 2013).

Moluscos bivalves, especialmente mexilhões, tem as mesmas características que os demais frutos do mar, cuja composição é rica em proteínas, vitaminas e minerais. São animais filtrantes das águas que os circundam, e por isso retém micro-organismos e outras partículas que os tornam extremamente perecíveis (LIMA et al., 2013, ERKAN, 2005). Existem várias técnicas capazes de garantir a segurança do produto, mas essas técnicas provocam um prejuízo na característica sensorial. Por este motivo, é necessário o desenvolvimento de outras técnicas.

A alta pressão hidrostática (APH) é um processo não-térmico que tem sido investigado como um método alternativo para a preservação de alimentos, capaz de inativar micro-organismos patogênicos e deteriorantes bem como enzimas endógenas, ao mesmo tempo que mantém as propriedades sensoriais e nutricionais, prolongando a vida útil dos alimentos. A principal aplicação desta técnica em produtos oriundos de frutos do mar tem sido em ostras, para as operações de desconche ou

abertura, com várias vantagens ao tratamento, como o aumento da segurança e da vida útil. Também é aplicado em outros grupos de alimentos comercializados, como pescado, produtos cárneos, como presunto cozido ou curado, guacamole, geleias e sucos. A observação das mudanças na qualidade visual e de textura como consequência do tratamento com alta pressão aplicados em frutos do mar é pouco relatado em estudos nessa área (KOVÁČ et al., 2010; MURCHIE et al., 2005). Outras aplicações potenciais na indústria de frutos do mar são a remoção da carne de carapaças de crustáceos como lagosta, caranguejo e camarão, e também para a produção de surimi e para a preparação de pescado defumado a frio (TERIO et al., 2010; AUBOURG et al., 2010).

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é um gás que está sendo estudado para uso em alimentos, para inativação de micro-organismos e para estender a vida útil de muitos produtos, através da propriedade do  $\text{CO}_2$  ser solúvel na água e nos lipídios do alimento, sendo o principal responsável pelo efeito bacteriostático (LAMBERT et al. 1991; HOTCHKISS & LANGSTON, 1995; SIVERTSVIK et al., 2002). Em produtos de pescado, alguns estudos mostram o efeito do  $\text{CO}_2$  em retardar a fase exponencial de crescimento microbiano, e como consequência, inibindo as reações de oxidação e crescimento bacteriano (SOCCOL et al, 2003). O mecanismo de ação do  $\text{CO}_2$  em alimentos que não respiram e com elevado conteúdo de água é através da dissolução na água para formar ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que se dissocia em bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), espécies iônicas de acordo com uma série de equilíbrios (KNOCHE, 1980). Para os valores de pH menores que 8, como os moluscos, a concentração de íons carbonato deve ser negligenciada (DIXON & KELL, 1989).

Sivertsvik et al. (2003) desenvolveram um método onde o  $\text{CO}_2$  é dissolvido no produto antes do envase, conhecido como SGS (*Soluble Gas Stabilization*), com potencial para prevenir o colapso da embalagem, mesmo com baixa relação gás/produto (g/p) em relação à embalagem tradicional sob atmosfera modificada. O tratamento SGS tem demonstrado resultados promissores em diversos alimentos, como peito de frango, camarão, queijo, bacalhau e outros (ROTABAKK et al., 2010, SIVERTSVIK & BIRKELAND, 2006; JAKOBSEN & RISBO, 2009; SIVERTSVIK, 2007). O dióxido de carbono é também usado em sistemas de alta pressão. Na técnica do Dióxido de Carbono à Alta Pressão, o alimento é posto em contato direto com o  $\text{CO}_2$  pressurizado, em condições sub ou supercríticas usando método estático ou dinâmico, para inativar as

bactérias através da ação bacteriostática de CO<sub>2</sub> pressurizado (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007).

Alguns estudos sugerem a combinação de técnicas sinérgicas para aumentar a inativação microbiana e melhorar a qualidade de alimentos, em particular, a combinação de APH com tecnologias de envase ou a APH com um tratamento térmico suave pode ter aplicações práticas no processamento de alimentos (MURCHIE et al., 2005; GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). A combinação da atmosfera modificada usando gases pressurizados com APH, a baixas temperaturas, foi usada para a preservação de salmão (AMANATIDOU et al., 2000).

Entretanto, o uso do processo SGS em alimentos antes da APH não é relatado pela literatura. Na combinação entre o SGS e o processo APH ocorre a solubilização do CO<sub>2</sub> no mexilhão à pressão atmosférica, e durante a aplicação de APH, o CO<sub>2</sub> solubilizado deverá ter sua ação intensificada pela influência da pressão elevada. A combinação do SGS como um pré-tratamento pode contribuir para manutenção da qualidade dos mexilhões cozidos e aumentar sua vida útil devido ao efeito bacteriostático do CO<sub>2</sub>. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da pré-solubilização de CO<sub>2</sub> (SGS) e do uso da alta pressão hidrostática (APH) na vida útil de mexilhões cozidos.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Testes preliminares**

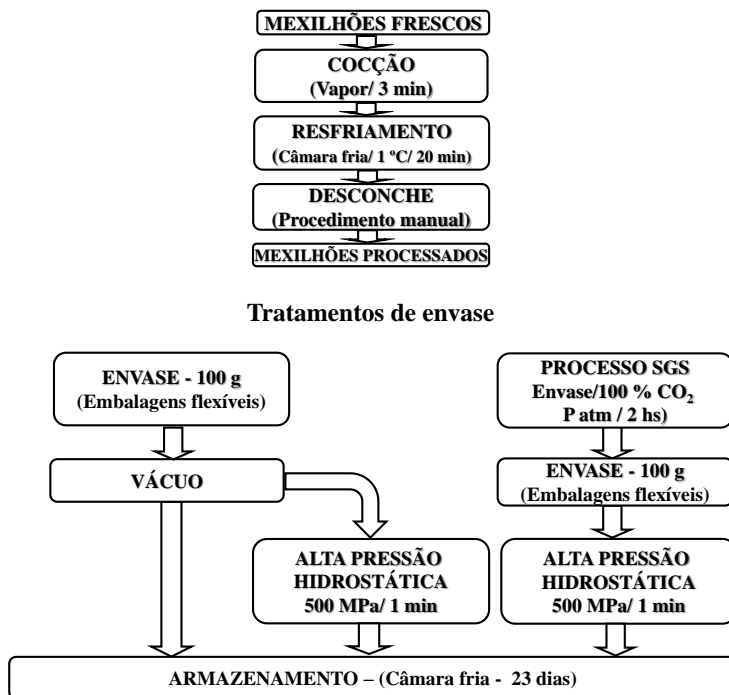
Alguns testes preliminares foram realizados com os mexilhões para definir as condições operacionais a serem empregadas e a forma como as amostras seriam utilizadas no processo a alta pressão hidrostática. Para isso, mexilhões com casca limpos foram acondicionados em embalagens flexíveis com água do mar, onde se avaliou a abertura das conchas e aparência da carne mediante a aplicação da alta pressão. Também foram submetidos ao mesmo tratamento os mexilhões sem concha crus e pré-cozidos e foram avaliados quanto ao aspecto visual da carne e a perda de água. As condições experimentais testadas foram: 100 MPa, 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa e 500 MPa durante 1 min, a 20 °C.

### **5.2.2 Material cru, processamento e amostragem**

Os mexilhões crus eram oriundos da região Central da Noruega e foram entregues a partir de um fornecedor local para o laboratório do Nofima AS. Os mexilhões foram armazenados numa câmara refrigerada a  $1 \pm 1$  °C até serem processados.

Os mexilhões foram processados de acordo com o fluxograma na Figura 5.1. Inicialmente os mexilhões foram limpos em água corrente e o bisso removido antes da cocção a 100 °C por 3 minutos, usando um forno de convecção (Zanussi FCV/E10L, Pordenone, Itália). As amostras foram resfriadas em uma câmara fria (Metos BC161, Metos Noruega, Oslo, Noruega) a uma temperatura de 1 °C por 20 minutos com a velocidade do ar elevada antes da carne ser removida manualmente das conchas. Os mexilhões descascados foram selecionados aleatoriamente para os diferentes tratamentos.

Figura 5.1 - Fluxograma do procedimento adotado para o processamento e envase dos mexilhões.



### *Envase a vácuo*

Este procedimento foi adotado para dois tratamentos: o controle – mexilhões não tratados (VAC – embalagens a vácuo) e para os mexilhões a serem submetidos ao processamento a alta pressão (tratamento APH). Porções de  $100 \pm 5$  g de mexilhões cozidos foram envasados em embalagens flexíveis em uma máquina automática de envase a vácuo (Supermax C, Webomatic, Bochum, Alemanha) em embalagens com  $80\mu\text{m}$  Poliamida - Álcool vinílico de etileno - Polietileno - PA/EVOH/PE (Pentafilm 200 B, Nordpak OY, Valkeoski, Finlândia). A taxa de transmissão de  $\text{O}_2$  para as embalagens foi de  $3 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ .

### *Processo a alta pressão*

As embalagens direcionadas ao processo a alta pressão foram colocadas em um recipiente cilíndrico à temperatura ambiente em uma unidade piloto de alta pressão com capacidade de 2 L, (QFP 2L-700 - Avure Technologies Inc., Columbus, EUA), usando água como meio pressurizante, com tempo de elevação da pressão de aproximadamente 80 s, conforme mostra a Figura 5.2. A condição de APH usada foi a selecionada nos testes preliminares (500 MPa/ 1 min a 20 °C). O processo foi aplicado em bateladas usando duas amostras de 100 g embaladas separadamente em embalagem sobreposta composta de 80µm Poliamida - Álcool vínlico de etileno - Polietileno - PA/EVOH/PE (Pentafilm 200 B, Nordpak OY, Valkeasoki, Finlândia) para evitar danos devido ao contato direto com o meio pressurizante. Após o processo, as embalagens foram removidas e as amostras armazenadas a 3 °C.

Figura 5.2 - Equipamento utilizado para o processo a alta pressão hidrostática.



### *Processo SGS + APH*

Para os tratamentos com SGS (2 hs a  $1 \pm 1$  °C) 100 g de mexilhões foram adicionados em embalagens flexíveis compostas de 20µm de poliamida (PA) e 70 µm de polietileno (PE) medindo 700 × 500 mm (Star-pack produktie B.V., Waalwijk, Holanda), e em seguida selados a quente.

Antes da injeção do gás a atmosfera interna da embalagem foi evacuada (95% vácuo, CVP Fresh Vac Model A-600, Downers Grove, IL, EUA) duas vezes e lavadas com 100 % de CO<sub>2</sub> de grau alimentício (AGA, Linde Gas, Stavanger, Noruega). A composição gasosa para o tratamento SGS, foi de  $96,6 \pm 0,16$  % CO<sub>2</sub>, e a pressão total foi equivalente à pressão atmosférica. A taxa de transmissão de O<sub>2</sub> das embalagens eram de  $30 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ . As embalagens usadas para o SGS foram grandes o suficiente para assegurar a disponibilidade do CO<sub>2</sub> (grau de enchimento de aproximadamente 7,0% [mL produto/mL volume da embalagem]). Após 2 horas, os mexilhões tratados com SGS foram removidos da embalagem e imediatamente acondicionados e submetidos ao tratamento APH como descrito anteriormente

As amostras foram armazenadas sob refrigeração ( $3 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas durante os dias 0, 1, 7, 13, 20 e 23 do armazenamento.

### 5.2.3 Análises físico-químicas

Para cada ponto experimental, foram usadas replicatas das quatro embalagens de cada tratamento, totalizando 12 embalagens.

O pH foi medido em triplicata, diretamente nos mexilhões, com um pHmetro (Orion 420 A-plus Benchtop, Thermo Electron Cooperation, Cambridgeshire, Reino Unido) utilizando um eletrodo do tipo “ponta de lança” (Thermo, Thermo Electron Cooperation).

O conteúdo de água foi expresso em (%) e as amostras em duplicata foram encaminhadas a uma estufa a  $105^\circ\text{C}$  durante 18 h, de acordo com Skipnes et al. (2007).

Para a Capacidade de Retenção de Água (CRA), as amostras em duplicata foram pesadas antes e após a centrifugação, onde as amostras foram colocadas em uma centrífuga durante 15 min a  $1800 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $4^\circ\text{C}$  e a CRA foi calculada de acordo com o descrito em detalhes por Skipnes et al. (2007).

O exsudado nas embalagens individuais foi quantificado gravimetricamente nas análises dos lotes ao longo do armazenamento. A massa do exsudado (g) foi dividida pela massa inicial do produto (P) e relatado como uma percentagem (%), conforme descrito por Sivertsvik & Birkeland, (2006).

A análise instrumental de textura (firmeza) foi realizada através da medição da força máxima à resistência ao cisalhamento usando uma célula Kramer (KSC) acoplada ao texturômetro (Stable Micro System

Ltd., TAXT plus Godalming, Reino Unido), com uma célula de carga de 500 N. Aproximadamente 50 g de mexilhões de cada embalagem foram submetidos ao teste com uma taxa de 3 mm.s<sup>-1</sup> e os resultados de firmeza foram expressos em N.g<sup>-1</sup>.

#### 5.2.4 Contagens microbiológicas

A avaliação microbiológica das amostras foi realizada através da contagem total de micro-organismos mesófilos e contagem total de psicotróficos, nos mexilhões crus e cozidos. Amostras de aproximadamente 10 g de mexilhões foram homogeneizadas na proporção 1:10 com água peptonada (1% NaCl (m/v) e 0.1% peptona (m/v) durante 120 s em um homogeneizador 400 Laboratory Blender (AJ Steward Company LTD, Londres, Inglaterra). Para o material cru as contagens de mesófilos e de psicotróficos foram realizadas em alíquotas, a partir de diluições apropriadas foram adicionados ao ágar ferro (45 ° C) com uma sobreposição (Agar Ferro Lyngby, Oxoid CM 964, Basingstoke, Inglaterra). O agar foi suplementado com 0,04% de L-cisteína, e incubado a 20 ± 1 ° C durante 3 dias para contagem de mesófilos, enquanto para contagem de psicotróficos, foram incubados a 7 ± 1 ° C durante 10 dias. As colônias pretas foram contadas como bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S e os mesófilos totais foram contados como a soma total das colônias pretas com as demais colônias.

Para os mexilhões cozidos, avaliados durante todo o período de armazenamento (0, 7, 13, 20, e 23 dias), as contagens de mesófilos e de psicotróficos foram determinadas pelo método de espalhamento em placas com agar (PCA, Merck, Darmstadt, Alemanha) adicionado com 1% NaCl, a fim de suprir o crescimento de algumas espécies de bactérias que necessitam de sal para o seu desenvolvimento, pelo fato do mexilhão ser proveniente do ambiente marinho. As placas foram incubadas para a contagem de mesófilos a 20 ± 1 ° C durante 3 dias, e para as contagens de psicotróficos, a 7 ± 1 ° C durante 10 dias. As duplicatas foram preparadas para cada embalagem analisada (4 para cada ponto experimental) e os resultados médios das medidas estão apresentados como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de carne e usado para análise estatística dos dados.

Algumas observações foram realizadas nos mexilhões no momento da abertura das embalagens para verificar o comportamento do produto submetido aos diferentes tratamentos de envase durante o



armazenamento. Para tal, cinco pessoas treinadas fizeram a verificação e os resultados foram descritos em termos de aparência e odor dos mexilhões.

### **5.2.5 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados considerando cada embalagem analisada em cada ponto experimental do armazenamento. Para isto, foi usada a análise de variância de uma via (ANOVA) e modelo linear geral (MLG) foram realizados com o *software* Minitab 14.13 (Minitab, Coventry, Reino Unido.) usando o teste de Tukey com significância  $P < 0,05$  (95%), para verificar se existem diferenças significativas entre os processos testados e as mudanças nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos durante o período de armazenamento.

## **5.3 Resultados e discussão**

### **5.3.1 Testes preliminares**

Os testes preliminares mostraram que o mexilhão com casca apresentou maior capacidade para abertura das conchas à pressões mais altas, de 300 MPa até 500 MPa quando comparados a baixas pressões. He et al. (2002), obtiveram 100 % de eficiência para desconchar ostras acima de pressões de 310 MPa/2 min, enquanto 88% das ostras foram desconchadas com 241 MPa/ 2 min. Hsu et al. (2010) obtiveram 100 % de desconche em ostras usando tratamentos de 250 e 300 MPa por 2 min e zero min e mantiveram as ostras intactas em termos de aparência. Yi et al. (2013a) usaram APH com níveis de 150 a 400 MPa para descascar vieiras e obtiveram 100% de descolamento do músculo adutor, quando vieiras foram tratadas a 200 MPa/3 min e 350 MPa/0 min. Sobre a influência da APH no desconche de mexilhões não há informações na literatura, contudo, os mexilhões desconchados neste trabalho apresentaram a mesma tendência observada para ostras e vieiras.

A aparência visual foi semelhante ao produto cozido, com o descolamento da carne da casca e posterior encolhimento, como pode ser observado pela Figura 5.3. A aparência de “cozido” é dependente das condições de processamento, como consequência da desnaturação proteica, especialmente acima de 300 MPa (KARIM et al., 2011).

Alterações do volume e uma aparência ligeiramente mais suculenta também foi observado em ostras tratadas com APH (MURCHIE et al., 2005; LÓPEZ-CABALLERO et al., 2000). Entretanto, o mexilhão cru desconchado não apresentou boa aparência dentro das embalagens, devido à exsudação promovida pela aplicação de alta pressão, enquanto que o mexilhão cozido e desconchado apresentou melhor aparência e menor perda de água comparado ao produto cru. A avaliação visual da aparência é um dos fatores mais importantes que afetam a aceitabilidade do consumidor de frutos do mar (HSU et al., 2010). Por esta razão, optou-se em utilizar os mexilhões cozidos e desconchados sob APH a 500 MPa/1 min, como mostra a Figura 5.4.

Figura 5.3 - Ação da APH na abertura de mexilhões crus e aparência visual do produto após o processo.



Figura 5.4 - Aspecto visual das embalagens com o mexilhão cozido após a APH.



### 5.3.2 Caracterização do material cru

Todos os mexilhões estavam vivos no início dos experimentos e apresentaram boa aparência para o processamento. A qualidade global dos mexilhões depende de alguns critérios, como: biológicos (contagem microbiana, ausência de micro-organismos patogênicos e vírus, ausência de toxinas de algas, ausência de parasitas), químicos (reduzida presença de radionuclídeos e metais) e propriedades sensoriais, tais como o aspecto de conchas e da carne, rendimento e sabor e aroma típicos, ausência de componentes indesejáveis (VERNOCCHI et al., 2007). O pH para o mexilhão cru que foi usado nos experimentos foi de  $6,66 \pm 0,14$  e conteúdo de água de  $80,75 \pm 1,61$ . Estes valores estão em concordância com outros estudos com mexilhões crus (FUENTES et al., 2009; TAVARES et al. 1997). O pH e conteúdo de água são dependentes da espécie de mexilhão, e também é influenciado pela variação sazonal, que afeta a composição centesimal, que é dependente do alimento (fitoplâncton) da área de cultivo (SALÁN et al., 2008; TAVARES et al., 1997).

As contagens microbianas antes do processamento foram variáveis entre os diferentes lotes. Os mexilhões *in natura* apresentaram a seguinte contagem total de micro-organismos: para os mesófilos; os valores obtidos foram entre 2,21 e 4,07 log UFC/g, enquanto para os micro-organismos psicrotróficos os valores foram mais elevados entre 4,44 – 5,23 log UFC/g. Para as bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S, os valores foram mais altos para os mesófilos (5,29 – 8,29 log UFC/g) e psicrotróficos (4,82 – 5,56 log UFC/g). As altas contagens microbianas eram esperadas para mexilhões crus, devido à sua capacidade de filtrar pequenas partículas de fitoplâncton, zooplâncton, vírus, bactérias e matéria inorgânica, que depende da água circundante (OLIVEIRA et al., 2011). Os altos níveis de contaminação proporcionam a rápida deterioração desses alimentos, mesmo quando expostos sob temperatura de refrigeração. Por isso, o processamento de mexilhões através dos tratamentos de cocção num curto intervalo de tempo entre a coleta e envase são imprescindíveis para reduzir a contagem microbiana e aumentar sua vida útil. O produto cozido não apresentou crescimento de bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S. Sivertsvik (2007) verificou a influência da temperatura de armazenamento na ausência de bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S em filetes de bacalhau de cultivo.

### 5.3.3 Avaliação do armazenamento dos mexilhões processados e envasados

#### *Propriedades físico-químicas*

A Tabela 5.1 apresenta os principais efeitos para o pH, conteúdo de água (%), exsudação (%), Capacidade de Retenção de Água (CRA) e Firmeza ( $\text{N.g}^{-1}$ ). O pH aumentou ligeiramente ( $6,89 \pm 0,05$ ) nos mexilhões processados no dia do envase, para todos os tratamentos aplicados comparados com o material cru ( $6,66 \pm 0,14$ ). A desnaturação proteica durante o tratamento térmico favorece as mudanças no pH. Masnyiom et al. (2011) também observou o comportamento de mexilhões crus tratados com  $\text{CO}_2$  e após serem submetidos à cocção, onde o  $\text{CO}_2$  influenciou a desnaturação proteica juntamente com o tratamento térmico. Depois de 24 horas de armazenamento, foi possível verificar que os mexilhões submetidos ao tratamento SGS apresentaram um leve decréscimo no pH ( $6,51 \pm 0,04$ ) sem diferenças significativas entre os outros tratamentos ( $P= 0,4933$ ). Esta mudança é provavelmente resultante da solubilização do  $\text{CO}_2$  no conteúdo aquoso e lipídico durante a etapa do SGS, que promove a redução no pH (SIVERTSVIK et al., 2004). Durante a aplicação da APH, o  $\text{CO}_2$  remanescente possivelmente penetrou nos mexilhões devido às condições de alta pressão. Garcia-Gonzalez et al. (2007) relataram que o pH do produto pode influenciar na APH quando o  $\text{CO}_2$  no estado supercrítico está envolvido, principalmente em pH mais baixos, com absorção mais efetiva no alimento. No caso deste estudo, o  $\text{CO}_2$  aplicado na etapa do SGS não está em condições supercríticas, mas foi suficiente para reduzir o pH dos mexilhões, facilitando a penetração deste no interior das células e após a APH, a redução foi mais acentuada. Para os mexilhões tratados apenas com APH, ocorreu um aumento para  $6,99 \pm 0,04$  do pH após o processo quando comparado aos mexilhões não tratados e embalados a vácuo (VAC –  $6,86 \pm 0,02$ ). Alguns estudos mostram que os tratamentos a APH podem aumentar o pH em ostras e outros produtos de pescado devido à desnaturação proteica e a auto ionização da água com pressões crescentes (MONTIEL et al., 2012; HSU et al., 2010; CRUZ-ROMERO et al., 2004; SCHUBRING et al., 2003; LÓPEZ-CABALLERO et al., 2000; ANGSUPANICH & LEDWARD, 1998; SAREEVORAVITKUL et al., 1996). Por outro lado, não foram

observadas diferenças no pH causadas por APH comparando a lula não tratada e salmão cozido ao modo “*sous-vide*” no primeiro dia após o processo apenas durante o armazenamento, houve aumento nos valores de pH (GOU et al., 2010; PICOUEt et al., 2011).

Tabela 5.1 - Efeito<sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e tratamentos de envase nas propriedades físico-químicas<sup>2</sup> (pH, conteúdo de água (%), Capacidade de Retenção de Água (CRA - %), exsudação (%) e firmeza (N.g<sup>-1</sup>)).

	pH	Conteúdo de água (%)	CRA (%)	Exsudação (%)	Firmeza (N.g <sup>-1</sup> )
<b>Armazenamento (dias)</b>	(n=36)	(n=24)	(n=24)	(n=12)	(n=12)
0	6,89 <sup>a</sup>	77,55 <sup>abc</sup>	n.d <sup>3</sup>	5,08 <sup>ab</sup>	2,97 <sup>a</sup>
1	6,78 <sup>a</sup>	76,73 <sup>a</sup>	79,59 <sup>ab</sup>	n.d <sup>3</sup>	n.d <sup>3</sup>
7	6,84 <sup>a</sup>	76,87 <sup>a</sup>	82,66 <sup>a</sup>	3,89 <sup>b</sup>	2,99 <sup>a</sup>
13	6,37 <sup>b</sup>	78,15 <sup>bc</sup>	80,50 <sup>ab</sup>	5,47 <sup>b</sup>	3,29 <sup>a</sup>
20	6,20 <sup>c</sup>	77,06 <sup>ac</sup>	77,00 <sup>bc</sup>	6,45 <sup>ac</sup>	2,78 <sup>a</sup>
23	6,09 <sup>c</sup>	78,29 <sup>bc</sup>	74,03 <sup>c</sup>	7,50 <sup>c</sup>	2,77 <sup>a</sup>
Efeito do tempo (valor P)	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,110
<b>Tratamento</b>	(n=72)	(n=48)	(n=48)	(n=24)	(n=24)
APH	6,50 <sup>a</sup>	77,75 <sup>a</sup>	78,34 <sup>a</sup>	6,39 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup>
SGS + APH	6,48 <sup>a</sup>	77,88 <sup>a</sup>	78,13 <sup>a</sup>	6,40 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>
VAC	6,60 <sup>b</sup>	76,69 <sup>b</sup>	79,79 <sup>a</sup>	4,25 <sup>b</sup>	3,17 <sup>a</sup>
Efeito do tratamento (valor P)	0,001	0,001	0,207	0,001	0,146

<sup>1</sup> Efeito do tratamento (valor P), análise de variância (ANOVA) (MLG) e teste de comparação múltipla de Tukey.

<sup>2</sup> Valores são dados como média dos mínimos quadrados. Médias com diferentes letras sobscritas em cada coluna são significativamente diferentes pela ANOVA (MLG) e teste de comparação média de Tukey.

<sup>3</sup> não determinado

Durante o armazenamento, o pH não mudou significativamente até o 7º dia de armazenamento (P = 0,9614). Entretanto, um decréscimo significativo no pH ocorreu depois de 13 dias de armazenamento para

todos os tratamentos ( $P < 0,001$ ). Este comportamento é típico de produtos ricos em carboidratos em forma de glicogênio, como mexilhões e ostras, quando comparado à maioria dos produtos marinhos (JAY, 2005). A deterioração é normalmente associada ao processo fermentativo e ocorre um decréscimo gradual no pH, como relatado por He et al., (2002), cujas amostras submetidas a APH apresentaram decréscimo de menos uma unidade após 4 semanas. Neste estudo, as amostras APH alcançaram redução de 1 unidade no pH em 23 dias. As amostras VAC diminuíram 0,8 unidades e SGS + APH diminuíram 0,4 unidades. A variação menor das amostras SGS + APH podem ser atribuídas ao efeito da estabilidade do  $\text{CO}_2$  no pH do músculo, e ao mesmo tempo está relacionada com uma deterioração mais lenta, observada também pelo bom aspecto visual apresentado nos mexilhões durante um maior tempo quando comparado com outros tratamentos.

Os tratamentos influenciaram ( $P = 0,001$ ) os valores de conteúdo de água. Foram observadas ligeiras reduções para mexilhões tratados com SGS + APH (1,19%) e VAC (2,14%) após 24 hs. Para amostras APH, o teor de água aumentou (1,06%). A APH pode influenciar na hidratação das proteínas, devido a absorção de água por estes componentes (CRUZ-ROMERO et al., 2008). O aumento resultante no conteúdo de água é mencionado por outros estudos como por exemplo em camarão tratado com APH que após o processo apresentou umidade significativamente (68,98 %) maior e pH menor (6,10) do que camarão tratado termicamente (66,62 % para umidade e 6,16 para valores de pH) (YI et al., 2013b). As ostras tratadas com APH apresentaram aumento no conteúdo de água após o tratamento (CRUZ-ROMERO et al., 2008).

O conteúdo de água apresentou variação com os dias de armazenamento ( $P = 0,001$ ), porém não foi possível descrever um perfil definido para cada tratamento e entre cada dia de armazenamento (comportamento de aumento ou de redução). O conteúdo de água variou de 75,97 % até 79,06 % durante o armazenamento. A diferença inicial que ocorreu após os tratamentos desapareceram. O conteúdo de água pode influenciar na inativação microbiana com  $\text{CO}_2$  pressurizado, devido à sua capacidade de solubilidade na água, e maiores quantidades de  $\text{CO}_2$  podem ser solubilizadas em produtos de elevado teor de água (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). O alto teor de água no mexilhão neste estudo contribuiu para a absorção de  $\text{CO}_2$  durante a etapa do SGS e estendeu o efeito do  $\text{CO}_2$  durante o tratamento a APH e também durante o armazenamento. Normalmente, o teor de água está relacionado com as

características de textura. Cruz-Romero et al. (2004) encontraram aumento do teor de água em ostras pressurizadas. Neste estudo, no entanto, não foi possível correlacionar a influência da alta pressão no teor de água dos mexilhões.

A CRA alta apresentada pelos mexilhões para todos os tratamentos está relacionada com a alta suculência da carne do produto (FUENTES et al., 2009). Não houve influência do tratamento ( $P = 0,207$ ) aplicado. Para Gómez-Estaca et al. (2007), a CRA em filetes de dourado foi similar no lote despressurizado e nas amostras pressurizadas 200 e 300 MPa, porém houve um decréscimo significativo a 400 MPa. Neste estudo, talvez o tempo de (1 min) embora a uma pressão mais alta (500 MPa) não foi suficiente para promover diferenças na CRA dos mexilhões.

A CRA mudou significativamente durante o período de armazenamento ( $P < 0,001$ ), porém foi observado o mesmo comportamento aleatório presente no conteúdo de água, na faixa de 73,03 até 85,37 %, provavelmente devido ao fato de que o conteúdo de água e a CRA são dependentes da desintegração do tecido muscular, o que resulta na liberação de água.

A exsudação dentro das embalagens foi dependente do tratamento aplicado ( $P = 0,001$ ). As amostras VAC apresentaram baixa exsudação (4,25 %) quando comparado às amostras tratadas a APH (6,39 %) e SGS + APH (6,40 %). O período de armazenamento também apresentou efeito significativo ( $P < 0,001$ ). A exsudação mais alta foi alcançada no final do armazenamento para APH (8,32 %) e (8,12 %) para SGS + APH, enquanto o VAC apresentou 4,41 % no 20º dia de armazenamento. Sivertsvik & Birkeland (2006) encontraram aumento na perda por gotejamento por dissolução do  $\text{CO}_2$  em camarão sob tratamento SGS. Neste estudo, a maior perda de água dentro das embalagens por exsudação ocorreu devido ao efeito da APH e devido à combinação do SGS com a APH. Entre esses dois tratamentos não houve diferença significativa ( $P = 0,9993$ ), o que indica que o  $\text{CO}_2$  não teve influência no processo de exsudação.

A firmeza ( $\text{N.g}^{-1}$ ) não apresentou mudanças significativas durante o armazenamento ( $P = 0,110$ ) e entre os tratamentos ( $P = 0,146$ ). Os valores médios foram de  $2,84 \pm 0,11 \text{ N.g}^{-1}$  para APH;  $2,86 \pm 0,11 \text{ N.g}^{-1}$  para SGS + APH e  $3,17 \pm 0,13 \text{ N.g}^{-1}$  para VAC. A textura normalmente é o parâmetro mais afetado pelos tratamentos com alta pressão, porque apresenta texturas mais rígidas (MURCHIE et al., 2005). A textura está intimamente correlacionada com o teor de água do músculo, que com um maior teor de água, fica mais macia (SKIPNES et al., 2011). Entretanto

isso não aconteceu com os mexilhões tratados neste estudo. Outros estudos relataram não ocorrer mudanças na textura em amostras pressurizadas durante o armazenamento, tal como o dourado defumado a frio (GÓMEZ-ESTACA et al., 2007); polvo (HURTADO et al., 2001) e camarão (LÓPEZ-CABALLERO et al., 2000).

Kovač et al. (2010) relataram que a influência da APH na presença de gases pode mudar a textura e o formato, levando a uma distorção do material, como encolhimento físico, e finalmente compressão irreversível de alimentos integrais devido ao deslocamento do gás e infiltração de líquidos em alimentos de baixa umidade, enquanto a estrutura física de alimentos de alta umidade permanece inalterado. Neste estudo, no entanto, o CO<sub>2</sub> foi aplicado na etapa do SGS, antes da APH, de modo que o CO<sub>2</sub> não estava em estado supercrítico para promover alterações na textura.

### 5.3.4 Avaliação microbiológica

A contagem inicial baixa encontrada neste produto justifica a utilização de valores de pressão na faixa de 500 MPa. Embora a sensibilidade ao tratamento seja diferente entre os tipos de micro-organismos, muitos estudos têm demonstrado que as pressões na faixa de 300–600 MPa, pode inativar fungos e células vegetativas (SMELT, 1998).

A Figura 5.5 mostra a evolução das contagens microbianas para os micro-organismos mesófilos e a Figura 5.6 mostra a mesma evolução para os micro-organismos psicotróficos em mexilhões cozidos. As contagens iniciais foram baixas (0,17 log UFC/g para mesófilos e 0,1 log UFC/g para psicotróficos). No sétimo dia foi possível perceber maior crescimento nas embalagens a VAC (Mesófilos: 4,76 log UFC/g e Psicotróficos: 5,3 log UFC/g) comparado com os outros tratamentos (APH: 0,19 log UFC/g para mesófilos e 0,0 log UFC/g para psicotróficos) e (SGS + APH: 0,87 log UFC/g e 0,0 log UFC/g).

A análise estatística (Tabela 5.2) revelou efeito significativo dos tratamentos ( $P < 0,001$ ) e do armazenamento ( $P < 0,001$ ) tanto para micro-organismos mesófilos quanto para os psicotróficos. A contagem inicial para APH aumentou significativamente ( $P = 0,0174$ ) até 2,59 log UFC/g para mesófilos e 3,0 log UFC/g para psicotróficos, em 20 dias, respectivamente.

As amostras SGS + APH apresentaram baixo crescimento microbiano até o 23º dia de armazenamento. As contagens microbianas



para os mesófilos em carnes recém-processadas de bivalves são considerados de qualidade inferior, quando possuem valores  $> 500.000$  UFC/g pela *U.S. Food and Drug Administration* (1989). Neste estudo, o nível foi alcançado pelo tratamento VAC em 13 dias, com  $6,39 \log$  UFC/g para mesófilos e  $6,30 \log$  UFC/g para psicrotróficos. Porém, as características visuais e de odor foram aceitáveis para as amostras VAC até 7 dias. Depois disso, os mexilhões a vácuo apresentaram contagem elevada, com forte odor e aparente deterioração. A efetividade da alta pressão depende de parâmetros tecnológicos e das características microbiológicas do produto, incluindo as espécies presentes e as respectivas cepas e o seu estado fisiológico (HEREU et al., 2012). Os resultados indicam que a combinação da técnica SGS com a APH são efetivos em manter a contagem microbiana baixa no mexilhão durante o armazenamento durante 23 dias. He et al. (2002) usou alta pressão e obteve redução decimal de 2 a 3 ciclos log nas contagens microbianas em ostras, que permaneceram em um nível reduzido dentro do armazenamento. O processo de APH reduz significativamente a contagem total de bactérias aeróbias e de anaeróbias em ostras, ao mesmo tempo que mantém boas características sensoriais (CALIK et al., 2002).

Figura 5.5 - Contagem de micro-organismos mesófilos nos mexilhões cozidos durante o armazenamento.

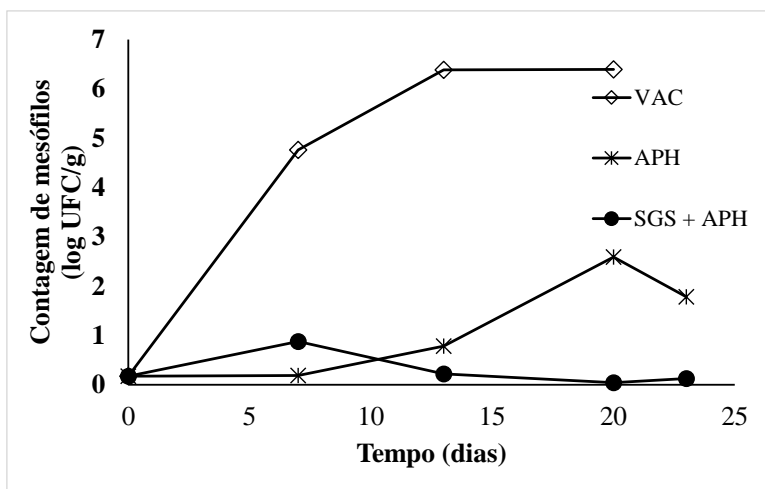


Figura 5.6 - Contagem de micro-organismos psicrotróficos nos mexilhões cozidos durante o armazenamento.

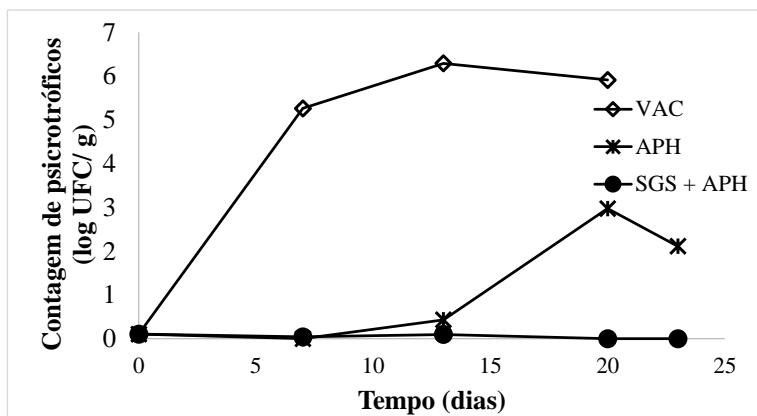


Tabela 5.2 - Efeito<sup>1</sup> do tempo de armazenamento (d) e dos tratamentos de envase nas contagens microbiológicas<sup>2</sup> (micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em mexilhões (*Mytilus edulis*) cozidos).

	Mesófilos (log UFC/g)	Psicrotróficos (log UFC/g)
<b>Armazenamento (dias)</b>	(n=24)	(n=24)
0 (n=4)	0,17 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
7 (n=12)	1,97 <sup>b</sup>	1,78 <sup>b</sup>
13 (n=12)	2,50 <sup>b</sup>	2,39 <sup>b</sup>
20 (n=12)	3,15 <sup>b</sup>	2,87 <sup>b</sup>
23 (n=12)	2,33 <sup>b</sup>	2,52 <sup>b</sup>
Efeito do tempo (valor P)	< 0,001	< 0,001
<b>Tratamento</b>	(n=48)	(n=48)
APH	1,13 <sup>a</sup>	1,04 <sup>a</sup>
SGS + APH	0,27 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>
VAC	4,68 <sup>b</sup>	4,69 <sup>b</sup>
Efeito do tratamento (valor P)	< 0,001	< 0,001

<sup>1</sup> Efeito do tratamento (valor P), análise de variância (ANOVA) (MLG) e teste de comparação múltipla de Tukey.

<sup>2</sup> Valores são dados como média dos mínimos quadrados. Médias com diferentes letras sobscritas em cada coluna são significativamente diferentes pela ANOVA (MLG) e teste de comparação média de Tukey.

### 5.3.5 Observações no produto

O odor de produto cru pode ser percebido em mexilhões tratados com APH e com SGS + APH. Este perfil foi relatado por Murchie et al. (2005), onde os estudos com ostras tratadas com APH mostraram reter um gosto cru, enquanto outros estudos também relataram uma melhora no sabor, atribuída à incorporação da água salgada na qual as ostras foram tratadas.

Mesmo com a aplicação de APH nos mexilhões, o mau cheiro pode ocorrer com o prolongamento da vida útil. Neste estudo, os mexilhões tratados sob o processo a APH mantiveram baixa contagem microbiana durante o tempo de armazenamento, mas o odor forte desagradável (empírico) resultou na rejeição do produto para consumo (Tabela 5.3). Bactérias deteriorantes estão normalmente envolvidas com as mudanças sensoriais no pescado e moluscos durante o armazenamento, principalmente por Gram-negativos, que tendem a ser relativamente sensíveis à pressão (GRAM & HUSS, 2000). Como consequência, os produtos tratados com APH tem maiores proporções de bactérias Gram-positivas, especialmente bactérias ácido-láticas, que podem não ser eliminadas pelo processo, mas é possível reduzir a sua contagem e atrasar o seu crescimento em frutos do mar. A ação deste processo nas enzimas endógenas envolvidas na deterioração de alimentos, pode inativar ou melhorar a ação de outras enzimas, levando a alterações sensoriais em detrimento dos alimentos, dependendo das espécies. Odores indesejados estão associados com bactérias láticas em extensões na vida útil de frutos do mar tratados com APH (MURCHIE et al., 2005). O processo APH teve um efeito positivo no odor para as amostras APH e SGS + APH, caracterizadas como “odor de mar”. Contudo, este efeito foi prolongado nas amostras SGS + APH durante 23 dias, após esse período foram observadas as primeiras mudanças no odor. Nas amostras apenas com APH, no 13º dia o odor não foi considerado bom embora as contagens microbianas continuassem baixas durante o armazenamento. A partir do 20º até 23º dia, o odor foi considerado inaceitável para consumo. Para as amostras com vácuo (VAC) as mudanças ocorreram mais rapidamente do que nos outros tratamentos, e no 7º dia, o odor foi forte, provavelmente intensificado pelas contagens microbianas na faixa de 4 log UFC/g. Depois disso, os mexilhões foram considerados inaceitáveis para consumo. Assim, o processo de APH é uma alternativa para evitar efeitos indesejáveis no sabor e na aparência de moluscos (MURCHIE et al., 2005). Neste estudo, APH e SGS + APH mostraram características de

frescor por um período mais longo do que o tratamento VAC. Em ostras, a alta pressão promove a captação do líquido salgado da carne, o que resulta em melhoria do sabor (HOOVER et al., 1989).

Cruz-Romero et al. (2008) investigaram a composição centesimal, cor e os níveis de ácidos graxos e compostos voláteis em ostras em submetidas ao tratamento APH e perceberam diferenças nos níveis de compostos voláteis quando comparado com o *headspace* de ostras frescas. Os estudos com frutos do mar indicaram que o sabor é influenciado também por componentes não voláteis dos moluscos, tais como aminoácidos livres, nucleotídeos, açúcares e sais minerais (MURCHIE et al., 2005).

Tabela 5.3 - Observações nos mexilhões durante a abertura das embalagens nas análises de armazenamento.

<b>Tratamento/ Dia de armazenamento</b>	<b>Observações no produto</b>
<b>APH</b>	
<b>0</b>	"Odor de mar" como material cru e fresco, bom.
<b>7</b>	"Odor de mar" como material cru e fresco, bom.
<b>13</b>	Tendendo ao cheiro azedo (não é bom).
<b>20</b>	Odor fraco
<b>23</b>	Odor podre
<b>SGS + APH</b>	
<b>0</b>	"Odor de mar" como material cru e fresco, bom.
<b>7</b>	"Odor de mar" como material cru e fresco, bom.
<b>13</b>	"Odor de mar" como material cru e fresco, bom.
<b>20</b>	"Odor de mar" como material cru e fresco, bom.
<b>23</b>	A água do mar e odor de CO <sub>2</sub> e alguma deterioração
<b>VAC</b>	
<b>0</b>	Odor forte, característico do produto cozido
<b>7</b>	Odor forte, mas não é bom
<b>13</b>	Cheiro azedo, inaceitável
<b>20</b>	Cheiro azedo, inaceitável
<b>23</b>	Não avaliado

A baixa contagem microbiana encontrada não foi o único critério considerado para a análise dos efeitos causados pelo processo de APH e o SGS em mexilhões. A produção de odores durante o armazenamento foi o critério de rejeição para o produto. Assim, mexilhões tratados com SGS + APH alcançaram 23 dias de armazenamento com baixa contagem microbiana e um odor aceitável, enquanto que o tratamento de APH, sem aplicação de CO<sub>2</sub> (APH) manteve uma baixa contaminação microbiana durante o armazenamento de 23 dias, mas com odor aceitável somente até o 13 dias de armazenamento, possivelmente, em consequência da formação de compostos tais como as aminas, sulfuretos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos com desagradável e inaceitável odores (GRAM; DALGAARD, 2002). O tratamento controle (VAC) comprovou ser insuficiente para manter os mexilhões em condições aceitáveis depois de 7 dias. A análise das informações traz o tratamento combinado SGS + APH como a melhor alternativa para a conservação de mexilhões cozidos sob refrigeração entre os tratamentos estudados.

#### **5.4 Conclusões**

Os tratamentos APH e SGS + APH afetaram as propriedades físico-químicas, exceto na textura dos mexilhões, em relação ao tratamento controle. As contagens microbiológicas para SGS + APH e APH foram controladas durante o armazenamento, sendo capaz de estender a vida útil dos mexilhões, o que demonstra que a aplicação de alta pressão é eficaz no controle microbiano. No entanto, apenas a combinação de processos de tratamento SGS + APH foi capaz de prolongar a aparência e odor aceitável nos mexilhões ao longo do armazenamento (23 dias), em comparação com o tratamento APH (13 dias) e VAC (7 dias).

**REFERÊNCIAS**

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

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

AUBOURG, A. P.; TABILO-MUNIZAGA, G.; REYES, J. E.; RODRÍGUEZ, A.; PÉREZ-WON, M. Effect of high pressure treatment on microbial activity and lipid oxidation in chilled coho salmon. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 112, p. 362-372, 2010.

CALIK, H.; MORRISSEY, M. T.; RENO, P. W.; AN, H. Effect of High Pressure Processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and pacific oysters. **Journal of Food Science**, v. 67(4), 2002.

CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Fatty acids, volatile compounds and colour changes in high pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 54-61, 2008.

CRUZ-ROMERO, M. C.; SMIDDY, M.; HILL, C.; KELLY, A. L. Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 161-169, 2004.

DIXON, N. M.; KELL, D. B. The inhibition of CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 109–136, 1989.

ERKAN, N. Changes in quality characteristics during cold storage of shucked mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and selected chemical

decomposition indicators. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2625–2630, 2005.

FAO. **Cultured Aquatic Species Information Programme. *Mytilus edulis***. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Gouletquer, P. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. [Cited 3 January 2014].

FAO. Food and Drug Administration. 1989. **National Shellfish Sanitation Program Manual of Operations, Part 2, Sanitation of the Harvesting, Processing and Distribution of Shellfish**. Public Health Service, Shellfish Sanitation Branch, Washington, D.C. 149 p.

FUENTES, A.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; SERRA, J. A. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. **Food Chemistry**, v. 112, p. 295-302, 2009.

GARCIA-GONZALEZ, L.; GEERAERD, A. H.; SPILIMBERGO, S.; ESLST, K.; VAN GINNEKEN, L.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. F.; DEVLIEGHIERE, F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 1-28, 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. High pressure effects on the quality and preservation of cold-smoked dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) fillets. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1250–1259, 2007.

GOU, J.; LEE, H.; AHN, J. Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.119, p. 471-476, 2010.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p 262-266, 2002.

GRAM, L.; HUSS, H. H. **Fresh and processed fish and shellfish**. Em: The Microbiological Safety and Quality of Food. B.M. Lund, A.C. Baird-Parker and G.W. Gould, editors. Chapman and Hall., London, U.K., p. 472-506, 2000.

HE, H.; ADAMS, R. M.; FARKAS, D. F.; MORRISSEY, M. T. Use of high pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. **Journal of Food Science**, v. 67, n.2, 2002.

HEREU, A.; DALGAARD, P.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; BOVER-CID, S. Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 305-315, 2012.

HSU, K.; HWANG, J.; CHI, H.; LAI, K. Effect of different high pressure treatments on shucking, biochemical, physical and sensory characteristics of oysters to elaborate a traditional Taiwanese oyster omelette. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 530-535, 2010.

HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M.; FARKAS, D. F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**, v. 43(3), p.99–107, 1989.

HOTCHKISS, J. H.; LANGSTON, S. W. **MAP of cooked meat and poultry products**. Em: Farber JM, Dodds KL, editors. Principles of modified-atmosphere and sous vide product packaging. Lancaster, Pa.: Technomic Publishing Co. p 137-152. 1995.

HURTADO, J. L.; MONTERO, P.; BORDERÍAS, J. Chilled Storage of Pressurized Octopus (*Octopus vulgaris*) Muscle. **Journal of Food Science**, v. 66(3), 2001.

JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified by semihard cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p 285-290, 2009.

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

KARIM, N. U.; KENNEDY, T.; LINTON, M.; WATSON, S.; GAULT, N.; PATTERSON, M. F. Effect of high pressure processing on the quality of herring (*Clupea harengus*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stored on ice. **Food Control**, v. 22, p. 476-484, 2011.



KNOCHE, W. **Chemical reactions of CO<sub>2</sub> in water**. In C. Bauer, G. Gros, & H. Bartels (Eds.), *Biophysics and physiology of carbon dioxide*. Berlin: Springer-Verlag. 3–11, 1980.

KOVAČ, K.; DIEZ-VALCARCEA, M.; HERNANDEZA, M.; RASPORB P.; RODRÍGUEZ-LÁZARO. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 558-568, 2010.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf-life extensions and microbiological safety of fresh meat – a review, **Food Microbiology**, v. 8(4), p. 267-297, 1991.

LIMA, M.; MELO, M. C. L.; MONTEIRO, A. R. Evaluation of the processing of *Perna perna* mussels: the influence of water quality involved in the cooling operations in the physico-chemical and microbiological characteristics of the product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93(13), p. 3322-3329, 2013.

LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; PÉREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P.; BONDERÍAS, A. J.

Oyster preservation by high pressure treatment. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 96–201, 2000.

MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Extending the shelf-life of refrigerated green mussel (*Perna viridis*) under modified atmosphere packaging. **Songklanakarin Journal of Science and Technology International**, v. 33, n.2, 171-179, Mar. - Apr. 2011.

MONTIEL, R.; DE ALBA, M.; BRAVO, D.; GAYA, P.; MEDINA, M. Effect of high pressure treatments on smoked cod quality during refrigerated storage. **Food Control**, v. 23, p. 429-436, 2012.

MURCHIE, L.W.; CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. P.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; SMIDDY, M.; KELLY, A. L. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p.257 – 270, 2005.

OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J. L.; PEREIRA, M. J. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, p. 805-816, 2011.

PICOUET, P. A.; COFAN-CARBO, S.; VILASECA, H.; BALLBÈ, L. C.; CASTELLS, P. Stability of sous-vide cooked salmon loins processed by high pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 26-31, 2011.

ROTABAKK, B.T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Solubility, absorption and desorption of carbon dioxide in chicken breast fillets. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 442-446, 2010.

SALÁN, E. O. ; GALVÃO, J. A. ; FURLAN, É. F. ; PORTO, E. ; GALLO, C. R. ; OETTERER, M. Quality of mussels cultivated and commercialized in Ubatuba, SP, Brazil – monitoration *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* growth after post-harvest processing. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p. 152-159, jan.-mar., 2008.

SAREEVORAVITKUL R.; SIMPSON B. J.; RAMASWAMY H. S. Comparative properties of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) gels formulated by high hydrostatic pressure and heat. **Journal of Aquatic Food Products and Technology**, v. 5, p.65–79, 1996.

SCHUBRING, R.; MEYER, C.; SCHLÜTER, O.; BOGUSLAWSKI, S.; KNORR, D. Impact of high pressure assisted thawing on the quality of fillets from various fish species. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 257–267, 2003.

SIVERTSVIK, M. (2007). The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and 37ml/100ml carbon dioxide, **LWT-Food Science and Technology**, 40, 430-438.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilization, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-

Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). **Food Science and Technology International**, v. 12(5), p. 445-454, 2006.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; VAGANE, A.; ROSNES, J. T. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61(3), p. 449-458, 2004.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled stored on the microbial and sensory quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1467-1472, 2003.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, K.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 107-127, 2002.

SKIPNES, D.; JOHNSEN, S. O.; SKARA, T.; SIVERTSVIK, M.; LEKANG, O. Optimization of heat processing of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) muscle with respect to cook loss, water holding capacity, color, and texture. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, p. 331–340, 2011.

SKIPNES, D.; ØSTBY, M. L.; HENDRICKX, M. E. A method for characterising cook loss and water holding capacity in heat treated cod (*Gadus morhua*) muscle. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1078–1085, 2007.

SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p.152– 158, 1998.

SOCCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46(4), p. 569-580, 2003.

SSB. Statistics Norway. **Aquaculture 2012, preliminary figures**. Available in: <[http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-](http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og)

fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-forelopige/2013-06-06?fane=tabell&sort=nummer&tabell=117237> Access in: 13 dec 2013.

TAVARES, M.; MELLO, M. R. P.; CAMPOS, N. C.; MORAIS, C.; OSTINI, S. Proximate composition and caloric value of the mussel *Perna perna*, cultivated in Ubatuba, São Paulo State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 473-475, 1998.

TERIO, V.; TANTILLO, G.; MARTELLA, V.; DI PINTO, P.; BUONAVOGLIA, C.; KINGSLEY, D. H. High pressure inactivation of HAV within mussels. **Food and Environmental Virology**, v. 2(2), 83-8, 2010.

VERNOCCI, P.; MAFFEI, M.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GARDINI, F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). **Food Control**, v. 18, p. 1575-1583, 2007.

YI, J.; XU, Q.; HU, X.; DONG, P.; LIAO, X.; ZHANG, Y. Shucking of bay scallop (*Argopecten irradians*) using high hydrostatic pressure and its effect on microbiological and physical quality of adductor muscle. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 57-64, 2013a.

YI, J.; ZHANG, L.; DING, G.; HU, X.; LIAO, X.; ZHANG, Y. High hydrostatic pressure and thermal treatments for ready-to-eat wine-marinated shrimp: An evaluation of microbiological and physicochemical qualities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 16-23, 2013b.

ZIEGLER, F.; WINTHER, U.; HOGNES, E. S.; EMANUELSSON, A.; SUND, V.; ELLINGSEN. The Carbon Footprint of Norwegian Seafood Products on the Global Seafood Market. **Journal of Industrial Ecology**, v. 17(1), 2012.

## CONCLUSÕES FINAIS

O produto resultante do processo de cozimento integrado com o resfriamento a vácuo apresentou características físico-químicas e microbiológicas adequadas ao consumo e resolveu o problema de exsudação formada pelo processamento e que se torna um problema para comercialização nas gôndolas, principalmente no aspecto visual do produto.

O aparato experimental apresentado neste trabalho foi validado com água destilada, através da reprodução da constante de Henry do CO<sub>2</sub> solubilizado em água compatível com o referenciado pela literatura.

A aplicação do processo SGS em escala experimental demonstrou que a estrutura porosa dos mexilhões favoreceu a absorção de gás nos experimentos de solubilidade do CO<sub>2</sub> em um tempo mais curto e as maiores taxas de absorção de CO<sub>2</sub> foram obtidas a altas pressões e baixas temperaturas. Para selecionar as melhores condições de processo para a indústria é necessário avaliar o processo de dessorção e a quantidade de CO<sub>2</sub> solubilizada capaz de estender a vida útil dos mexilhões.

A aplicação do tratamento SGS diretamente nas embalagens resultou em um efeito bacteriostático em relação ao tratamento com ar e foi mais efetivo do que o envase com AM contribuindo na melhoria da qualidade microbiológica e aumento da vida útil do mexilhão cozido. Também foi possível observar o efeito do SGS na aparência das embalagens, que não sofreram o efeito do colapso observado nas embalagens com AM, e forneceram um produto com vida útil de 19 dias.

Os tratamentos APH e SGS + AM afetaram as propriedades físico-químicas, exceto a textura dos mexilhões, em relação ao controle. As contagens microbiológicas para o tratamento SGS + APH e APH foram controlados durante o armazenamento, porém somente o tratamento SGS + APH foi capaz de prolongar a aceitabilidade do produto durante todo o armazenamento.

Todas as propostas de processos aplicados foram capazes de manter as propriedades físico-químicas e aumentar a vida útil do mexilhão. Foi possível compreender que o mexilhão é uma matéria-prima complexa, e que por isso, a interação do CO<sub>2</sub> com o produto ainda não foi bem elucidada pelas dificuldades de geometria indefinida, estrutura porosa bem como suas variações sazonais, porém este gás é promissor

industrialmente para a conservação do mexilhão, embora algumas variáveis de processo ainda necessitem ser estudadas.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar a capacidade de reidratação dos mexilhões para a manutenção das características sensoriais típicas do molusco, visando o seu uso em diversos pratos;
- Selecionar as condições de processo SGS em mexilhões com base no processo de dessorção e a quantidade de CO<sub>2</sub> solubilizada adequada para aceitabilidade sensorial e estender a vida útil dos mexilhões;
- Investigar os processos envolvidos na produção dos odores gerados nos mexilhões submetidos ao processo SGS e atmosfera modificada durante o armazenamento, bem como identificar os grupos microbianos responsáveis pelas alterações no produto;
- Continuar o estudo da aplicação de APH combinada com o SGS nos mexilhões encontrando uma combinação de condições de processo que proporcione um produto aceitável sensorialmente por mais tempo;
- Investigar os tipos de proteínas presentes no mexilhão e os seus mecanismos de transformação durante os processos térmicos e aplicação de alta pressão, através de análises de varredura como DSC e também eletroforese para identificação das proteínas, para assim relacionar com o comportamento do molusco e suas mudanças durante o armazenamento.
- Focar o comportamento do *Clostridium botulinum* e os microorganismos baroresistentes/barolábeis nos mexilhões submetidos à alta pressão.





## APÊNDICE A

Tabela A.1 Parâmetro L\* (luminosidade) para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo

Tempo (dias)	L* Macho		L* Fêmea	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
00	44,79±2,76 <sup>ba</sup>	35,65±1,96 <sup>aA</sup>	27,54±0,68 <sup>aAB</sup>	30,59±2,09 <sup>aB</sup>
04	39,41±1,78 <sup>aAB</sup>	36,14±0,98 <sup>aA</sup>	24,04±1,05 <sup>aAB</sup>	23,64±1,59 <sup>aA</sup>
07	43,54±1,34 <sup>ba</sup>	37,19±0,65 <sup>aA</sup>	24,74±1,50 <sup>aAB</sup>	26,77±1,11 <sup>aAB</sup>
11	36,93±1,79 <sup>aAB</sup>	31,41±2,70 <sup>aA</sup>	23,59±0,82 <sup>aAB</sup>	22,67±1,06 <sup>aA</sup>
14	32,12±2,40 <sup>aB</sup>	38,44±1,76 <sup>aA</sup>	22,61±1,06 <sup>aA</sup>	22,59±0,93 <sup>aA</sup>
18	37,58±0,68 <sup>baB</sup>	32,97±1,66 <sup>aA</sup>	25,00±0,70 <sup>aAB</sup>	25,55±1,58 <sup>aAB</sup>
25	36,14±0,74 <sup>aAB</sup>	37,05±1,18 <sup>aA</sup>	25,41±0,94 <sup>aAB</sup>	30,08±0,92 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$

Tabela A.2 Coordenada de cromaticidade a\* para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo.

Tempo (dias)	a* Macho		a* Fêmea	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
00	2,42±0,25 <sup>aA</sup>	3,54±0,50 <sup>aA</sup>	22,52±0,85 <sup>aAB</sup>	25,41±1,41 <sup>aAB</sup>
04	2,25±0,18 <sup>ba</sup>	3,14±0,32 <sup>aA</sup>	20,15±0,81 <sup>aAB</sup>	22,19±2,51 <sup>aAB</sup>
07	3,92±0,30 <sup>baB</sup>	2,84±0,19 <sup>aA</sup>	19,21±1,44 <sup>ba</sup>	25,54±0,42 <sup>aAB</sup>
11	2,56±0,22 <sup>baB</sup>	2,78±0,26 <sup>aA</sup>	18,89±1,05 <sup>aA</sup>	20,40±1,02 <sup>aA</sup>
14	4,79±1,22 <sup>aB</sup>	2,75±0,25 <sup>aA</sup>	19,68±0,41 <sup>aAB</sup>	20,33±1,32 <sup>aA</sup>
18	2,83±0,27 <sup>baB</sup>	4,13±0,12 <sup>aA</sup>	21,57±1,16 <sup>aAB</sup>	23,81±1,58 <sup>aAB</sup>
25	2,52±0,08 <sup>baB</sup>	3,66±0,54 <sup>aA</sup>	22,02±0,96 <sup>aAB</sup>	27,26±0,84 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$

Tabela A.3 Parâmetro  $b^*$  para mexilhões machos e fêmeas submetidos ao processo convencional e ao processo alternativo.

Tempo (dias)	b* Macho		b* Fêmea	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
00	13,35±0,65 <sup>aA</sup>	13,96±0,77 <sup>aA</sup>	28,57±0,90 <sup>aA</sup>	30,36±1,99 <sup>aB</sup>
04	11,66±0,47 <sup>aA</sup>	13,29±0,91 <sup>bA</sup>	25,33±0,84 <sup>aA</sup>	26,30±2,04 <sup>aAB</sup>
07	13,95±0,75 <sup>aA</sup>	13,81±0,45 <sup>bAB</sup>	23,49±2,00 <sup>aA</sup>	27,24±0,41 <sup>aAB</sup>
11	12,23±0,36 <sup>aA</sup>	12,64±0,39 <sup>bAB</sup>	23,90±1,13 <sup>aA</sup>	23,21±1,47 <sup>aA</sup>
14	14,15±1,62 <sup>bA</sup>	13,87±0,86 <sup>aB</sup>	23,16±0,52 <sup>aA</sup>	22,60±1,69 <sup>aA</sup>
18	12,38±0,37 <sup>bAB</sup>	15,32±0,64 <sup>bAB</sup>	25,87±1,41 <sup>aA</sup>	27,10±1,44 <sup>aAB</sup>
25	12,05±0,27 <sup>aA</sup>	14,81±1,17 <sup>bAB</sup>	26,07±1,41 <sup>bA</sup>	31,16±0,78 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas entre colunas: diferem quanto ao tipo de processo. Letras maiúsculas entre linhas: diferem quanto ao período de armazenamento.  $p < 0,05$

## APÊNDICE B

### Estudo da desnaturação protéica no mexilhão

Durante os experimentos de aplicação do processo SGS nos mexilhões (Capítulo 4), foram feitos alguns experimentos à respeito da influência do tratamento térmico nas proteínas dos mexilhões, visto que a interpretação de fenômenos de desnaturação protéica e perda de água permite visualizar os substratos disponíveis para a degradação proteolítica que ocorre em mexilhões durante a armazenagem, resultando das reações enzimáticas e da atividade de micro-organismos. Pode ser uma maneira de prever a qualidade final dos produtos cárneos, de acordo com as mudanças das proteínas miofibrilares, que influencia na textura do produto.

#### B.1. Experimentos

Para a realização da Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foram utilizados 20 mg do manto cru de mexilhões machos e fêmeas, pesados em panelas de aço com Ø 7 mm para média pressão em equipamento DSC1 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça), onde foram executadas varreduras de 30 °C até 115 °C (GORINSTEIN et al., 2006).

A identificação das proteínas de alto e baixo peso molecular foram executadas por eletroforese SDS-PAGE, onde previamente as amostras de mexilhão foram preparadas para realizar a extração das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas do músculo do mexilhão, utilizando 2 g de mexilhão homogeneizado em 8 mL tampão de pescado, por 1 min a 13.000 rpm em Ultra Turrax. A mistura homogeneizada foi diluída 10 X em tampão de pescado e foi reservada para as análises. A determinação das proteínas foi realizada em nanoespectrofotômetro com faixa de A280 nm. As amostras foram diluídas novamente (20 X) em solução tampão de pescado, e foram adicionadas a proteína Methoden-UV (4µL), e o branco é a solução de tampão de pescado diluída 10 X. O fator de correção para A280 nm é 1,550 e a diluição foi ajustada para 20 X. As amostras-estoque foram ajustadas de 3,0 mg/mL em 100µl com tampão em tubos eppendorf. Foram adicionados 5 µl de β-mercaptoetanol e as amostras foram armazenadas no refrigerador.

Para a execução do gel, este foi lavado em água MiliQ, e as amostras foram misturadas com tampão de Laemmli 95µl (BioRad) concentração de 1,5 mg/mL. As amostras foram então aquecidas em

banho-maria a 85 °C/2min. 800 mL de tampão de corrida diluído 1X (80 mL tampão de corrida diluído 10 X e 760 mL de água MilliQ). Foram aplicadas 10 µl de amostra em cada espaço (capacidade de 15 µg de proteína). A proteína padrão foi adicionada (5µl). O gel passou pela corrida a 200 V durante 30-40 min. Após a eletroforese, as caixas com o gel foram lavadas com água Milli-Q e descartado, e apenas os géis permaneceram e apresentaram coloração após 18 horas.

## Resultados:

### Calorimetria diferencial de varredura:

Nos testes realizados, foi possível encontrar diferenças nas curvas de desnaturação protéica, entre os testes. Uma hipótese seria uma possível diferença entre gêneros. Assim, novos testes foram realizados para mexilhões machos e fêmeas, onde as fêmeas apresentaram somente um pico referente à desnaturação na faixa de temperatura entre 50 a 65 °C, enquanto que para os machos, os picos ocorreram em três momentos (entre 50 a 65 °C e após, entre 85 °C a 95 °C, e por fim, entre 95 °C a 110 °C), conforme mostram as Figuras B.1 e B.2.

Figura B.1 Curvas de desnaturação proteica encontradas para machos e fêmeas

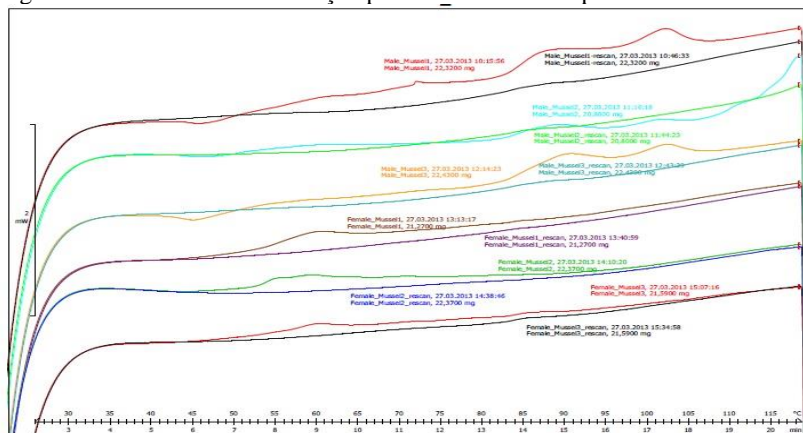
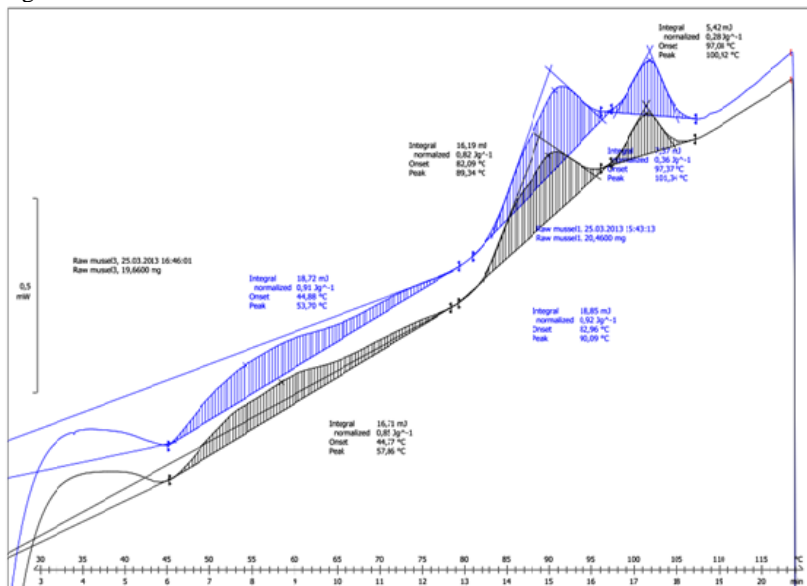


Figura B.2. Detalhamento das curvas encontradas nos mexilhões machos



Para tentar explicar esta aparente diferença entre os gêneros, a eletroforese foi realizada, porém os resultados dos géis demonstraram a predominância de proteínas de baixo peso molecular. As diferenças encontradas para os géis, entretanto, não foram evidenciadas entre os gêneros, porém ocorreram diferenças individuais, o que pode explicar a heterogeneidade da matéria-prima, quando realizadas análises de caracterização, principalmente em relação à textura do molusco.

