

EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NOS MICRORGANISMOS

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA*
LOURDES MARIA PESSOA MASSON**
AMAURI ROSENTHAL***

Efetou-se revisão de literatura acerca do efeito do tratamento a alta pressão nos microrganismos, a influência de fatores extrínsecos (substrato e temperatura) nesse tratamento, seus princípios e operações. A Alta Pressão Hidrostática (APH), tecnologia emergente de conservação de alimentos, destaca-se por não afetar ligações químicas covalentes presentes nas moléculas de seus constituintes, minimizando a perda dos principais atributos sensoriais e nutricionais dos alimentos. Conclui-se com o estudo que o efeito da alta pressão depende das características do produto e das condições do processo. Além disso, a APH tem-se mostrado eficaz na inativação de células vegetativas e quando combinada com tratamento térmico é capaz de inativar esporos, aumentando a vida-de-prateleira e garantindo a segurança microbiológica dos produtos.

PALAVRAS-CHAVE: ALTA PRESSÃO; MICRORGANISMOS.

* Engenheira de Alimentos, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro Federal de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis (CEFETEQ), Rio de Janeiro, RJ (e-mail: elisahelenarocha@gmail.com).

** Engenheira Química, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Professora, CEFETEQ, Rio de Janeiro, RJ (e-mail: lourdesmasson44@hotmail.com).

*** Engenheiro de Alimentos, Doutor em Biotecnologia e Bioengenharia de Alimentos, Pesquisador, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ (e-mail: arosent@ctaa.embrapa.br).

1 INTRODUÇÃO

O calor constitui o principal agente físico utilizado nos métodos convencionais de preservação de alimentos (pasteurização e esterilização). O emprego do calor revolucionou a indústria de alimentos, tornando viável a conservação de produtos. No entanto, o calor está relacionado com a deterioração dos compostos da cor e do sabor ou perda nutricional que pode comprometer a qualidade de certos alimentos. No suco de abacaxi, por exemplo, o tratamento térmico aplicado aos produtos comerciais pode produzir alterações desagradáveis em suas características sensoriais e nutricionais (THAKUR e NELSON, 1998; SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002; RATTANATHARNALERK, CHIEWCHAN e SRICHUMPOUNG, 2005; MARCELLINI, 2006).

A técnica da Alta Pressão Hidrostática (APH) consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos a pressões entre 100 MPa e 800 MPa, associada ou não com certa elevação da temperatura, podendo o alimento estar ou não embalado (FDA, 2000).

A APH, processo não-térmico, é capaz de inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos, assim como ativar e inativar enzimas (KNORR, 1993; GOULD, 2000) minimizando a perda da qualidade do alimento em termos nutricionais e sensoriais. Os níveis de pressão usados normalmente não são capazes de romper ligações covalentes, mantendo inalterados os compostos que conferem cor, aroma e sabor aos alimentos (FARKAS e HOOVER, 2000; BARBOSA-CÁNOVAS e RODRÍGUEZ, 2002). Assim, a APH tem sido sugerida como alternativa efetiva ao processamento térmico para ser empregada na pasteurização ou esterilização não-térmica de sucos cítricos e sucos em geral (OGAWA *et al.*, 1989; ALEMÁN *et al.*, 1996).

Esta revisão teve por objetivo abordar os princípios e operações da alta pressão, seu efeito sobre células vegetativas e esporos de microrganismos deteriorantes e patogênicos e a influências de fatores extrínsecos (substrato e temperatura) no tratamento.

2 PRINCÍPIOS DOS EQUIPAMENTOS DE ALTA PRESSÃO

O método de APH fundamenta-se no *Princípio de Lê Chatelier* em que qualquer fenômeno (transição de fases, mudanças na configuração molecular ou reações químicas) associado à redução de volume é favorecido pelo aumento da pressão e vice-versa (CHEFTEL, 1995; EARNSHAW, 1996; CAMPOS, 2004). Também se baseia no *Princípio Isostático*, segundo o qual a pressão é transmitida de maneira uniforme e quase instantânea por todo o alimento, independente da forma, tamanho e composição, ao contrário do que ocorre com o tratamento térmico (RASO *et al.*, 1998; SMELT, 1998; FDA, 2000, CAMPOS, 2004).

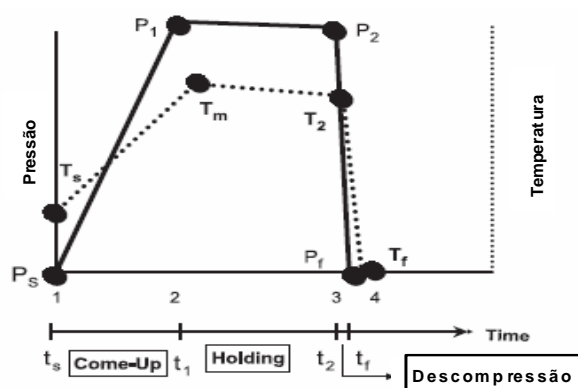
O sistema completo de aplicação de pressão hidrostática consiste num recipiente (câmara de pressão) e no seu fechamento, um sistema de geração de pressão, o mecanismo de controle de temperatura e demais variáveis de processo e o sistema de operação (HOOVER, 1993).

A capacidade da câmara de pressão é determinada de acordo com as necessidades do usuário. Unidades laboratoriais têm capacidade de 100 mL a 2 L e equipamentos de Planta Piloto de 10 L a 25 L. Em escala industrial, são encontrados equipamentos com câmaras de pressão com capacidade de até 687 L para produtos marinhos (AVURE TECHNOLOGIES, 2006) ou equipamentos providos de duas câmaras de 300 L, com volume total de 600 L e capacidade de produção de 2000 kg – 4400 lbs/h (NC HIPERBARIC, 2006).

A Figura 1 contém gráfico que relaciona as variáveis típicas do processamento por APH (pressão, temperatura e tempo). BALASUBRAMANIAM *et al.* (2004) definem *come up time*, *holding time* ou *processing time* e o tempo de descompressão como parâmetros importantes durante o tratamento experimental com APH. *Come up time* é o tempo necessário para aumentar a pressão da amostra a partir da pressão atmosférica e depende da taxa de compressão, da pressão transmitida pelo fluido e na proporcionalidade da potência da bomba e o processo de pressão requerido. *Holding time* ou

processing time é o tempo durante a pressão constante entre a compressão e o início da decompressão. Tempos de processamento menores que 5 minutos são preferidos para maximizar a produtividade e justificar a tecnologia economicamente. Tempo de decompressão é o tempo que traz a amostra de alimento processado por APH para próximo à pressão atmosférica.

FIGURA 1 - GRÁFICO QUE RELACIONA PRESSÃO, TEMPERATURA E TEMPO, VARIÁVEIS TÍPICAS QUE INDICAM AS CONDIÇÕES DE TESTES COM APH



P_s = pressão ambiente; P_f = pressão final; T_m = Temperatura máxima do processo; T_s = temperatura antes do processamento APH; T_f = temperatura depois do processamento APH.

FONTE: BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2004.

Dois métodos de processamento de alimentos em alta pressão têm sido pesquisados: o hidrostático que pode ser descontínuo (batelada) ou semicontínuo, e o método de homogeneização (HAP – Homogeneização à Alta Pressão). O equipamento básico de homogeneização com baixos níveis de pressão já é conhecido pela indústria de leite e de outros alimentos, sendo bastante utilizado na quebra dos glóbulos de gordura para produção de leite homogeneizado. A pressão de homogeneização típica utilizada na indústria gira em torno de 20 MPa. Porém, o desenvolvimento da tecnologia permitiu que os equipamentos de HAP alcançassem pressões de até 350 MPa, colaborando com o desenvolvimento de novos produtos (SANDRA e DALGLEISH, 2005). Esses níveis de pressão podem provocar a ruptura de células microbianas, propiciando o uso da HAP como alternativa à pasteurização para aumentar a segurança e qualidade microbiológica dos alimentos. A dinâmica do processo HAP não coincide com o descrito na literatura para a alta pressão hidrostática, e estudos recentes evidenciam a cavitação e o cisalhamento como sendo os mecanismos primários observados durante a HAP.

O processamento APH descontínuo assemelha-se em termos de fluxo de produção ao utilizado na esterilização em autoclaves (FARKAS e HOOVER, 2000). O alimento é embalado e pressurizado dentro da câmara de pressão, utilizando-se meio líquido para transferência da pressão ao produto. O método caracteriza-se como processo em batelada (CAMPOS, 2004). O sistema semicontínuo pode ser construído pelo arranjo de três ou mais recipientes resistentes a altas pressões em série, sendo o alimento pressurizado e embalado em recipientes estéreis (FDA, 2000).

O processamento em alta pressão estático pode ocorrer num ou mais pulsos, sendo o processo em pulso único o mais comumente utilizado. Na forma usual, o alimento é pressurizado por pulso contínuo e mais longo. Já na forma de pulsos múltiplos, a operação envolve uma série de ciclos de pressurização (pressão - despressurização - pressão), normalmente, durante período relativamente curto de tempo sem retirá-lo da câmara. Dessa forma, o alimento sofrerá o efeito de vários processos de pressurização e despressurização (FARKAS e HOOVER, 2000).

Vários trabalhos comprovaram que a aplicação da APH por pulsos múltiplos é mais eficiente

que o método de pulso simples para inativação de fungos filamentosos (ALEMÁN *et al.*, 1996; PALOU *et al.*, 1998a), bem como para inativação de *Saccharomyces cerevisiae* em sucos de laranja e abacaxi (DONSÌ, FERRARI e MARESCA, 2007). Isso se deve à grande injúria causada na membrana celular em função da rápida e grande diferença de pressão na interface da membrana intracelular e extracelular. Porém, a APH em pulsos múltiplos apresenta custo mais elevado e oferece maior risco de desgaste ao equipamento (CHEFTEL, 1995). A aplicação de repetidos pulsos requer equipamentos mais sofisticados, capazes de aumentar e decair a pressão rapidamente e aplicar repetidas seqüências de ciclos de pressão (DONSÌ, FERRARI e MARESCA, 2007).

Segundo THAKUR e NELSON (1998), a pressão pode ser gerada pelos métodos direto, indireto e térmico na APH. No método direto, o meio de transmissão de pressão contido na câmara é diretamente pressurizado por um pistão e gera pressão rapidamente. No entanto, restringe-se a equipamentos com pequeno volume, sendo indicado para laboratórios e plantas piloto. No método indireto, usa-se intensificador de pressão para bombear o meio de transmissão de pressão do reservatório para dentro da câmara de pressão já fechada, sendo empregado em nível industrial devido sua maior capacidade de gerar pressão. No método térmico, utilizado quando altas temperaturas devem estar associadas ao processo de pressão, a temperatura induz a expansão do meio de pressurização, gerando a pressão.

FARKAS e HOOVER (2000) citam que o alimento tem seu volume reduzido em 15% durante a pressurização e expansão equivalente durante a despressurização. Assim, as embalagens que são utilizadas na APH devem ter capacidade de redução e expansão sem perda da integridade do material e da selagem utilizada.

Segundo TEWARI, JAYAS e HOLLEY (1999), as embalagens mais utilizadas na APH são: *stomacher bags*, tubos estéreis, tubos de polietileno, “sacos” de polietileno e outros tipos de embalagens flexíveis.

A água tornou-se o fluido mais utilizado como meio de transmissão de pressão, devido à baixa compressibilidade e sua maior compatibilidade com o alimento, ocasionando menor risco de contaminação (CHEFTEL, 1995). Materiais como óleos, agentes anticorrosivos, ou antimicrobianos podem ser usados de acordo com a indicação do fabricante (FARKAS e HOOVER, 2000).

A energia gerada dentro da câmara de pressão, durante o processamento, resulta em moderada e temporária geração de calor (aquecimento adiabático). Com o término do processamento de pressurização, a câmara é despressurizada, caindo a pressão rapidamente e dissipando o aquecimento adiabático (ANSTINI, 2003).

Todas as substâncias que podem ser compressíveis alteram a temperatura durante compressão física e o efeito termodinâmico não pode ser evitado. Líquidos, como a água, são pouco compressíveis. A mudança na temperatura ocorre de acordo com a compressão e é relativamente baixa até mesmo em pressões altas. Logo, sob condições adiabáticas e próximas da temperatura ambiente, a água aquece cerca de 3°C para cada 100 MPa de pressão. Como a água é o principal ingrediente de muitos alimentos, a compressão de muitos produtos exibe aquecimento adiabático muito similar ao que ocorre com a água (TING, BALASUBRAMANIAM e RAGHUBEER, 2002).

3 EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE OS MICRORGANISMOS

Os primeiros estudos sobre a inativação de microrganismos por efeito da pressão foram realizados na França por Certes, em 1884, e nos EUA por Hite entre 1899 e 1914, que estudaram a resistência dos microrganismos a altas pressões em alimentos (HOOVER, 1993).

Altas pressões causam mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas, principalmente na membrana e na parte intracelular dos microrganismos. Além disso, provocam mudanças no funcionamento e na reprodução dos microrganismos (CHEFTEL, 1992).

As causas da inativação microbiana ainda são pouco conhecidas (HOOVER *et al.*, 1989),

porém as seguintes mudanças morfológicas das células foram observadas: compressão dos vacúolos gasosos (WALSBY, 1972), alongamento das células, contração da parede celular com formação de poros, modificação do núcleo (CHEFTEL, 1992), modificações nas organelas intracelulares e no citoesqueleto, separação da membrana da parede celular, coagulação de proteínas citoplasmáticas e liberação de constituintes intracelulares para fora da célula (CHEFTEL, 1995).

A APH acelera as reações químicas, envolvendo mudanças de volume em nível molecular, que constituem a chave para entender os efeitos biológicos nas macromoléculas e microrganismos (HUGAS, GARRIGA e MONFORT, 2002). Outros autores acrescentam que a eficiência da tecnologia está nas alterações morfológicas e bioquímicas, assim como nos mecanismos genéticos e na funcionalidade das membranas e paredes celulares dos microrganismos (HOOVER *et al.*, 1989; CHEFTEL, 1995). Entretanto, o principal dano causado pela pressão ocorre na membrana celular (HOOVER *et al.*, 1989).

O material genético é afetado no nível das enzimas relacionadas à replicação e transcrição do DNA (CHEFTEL, 1992). Alguns sistemas enzimáticos dos microrganismos são inibidos ou inativados pela pressão, como é o caso das desidrogenases na *Escherichia coli* a 100 MPa e das carboxilases nas leveduras a 400 MPa (CHONG, FORTES e JAMESON, 1985).

Segundo CHEFTEL (1992), a destruição celular pode ser causada pela inibição da ATPase ou pela cristalização da membrana de fosfolípidios com mudanças irreversíveis na permeabilidade celular e nas trocas iônicas.

A APH é capaz de promover a acidificação dos vacúolos, organela que compõe a célula, de maneira proporcional à magnitude da pressão aplicada. Essa acidificação, causada pela produção de dióxido de carbono, é facilitada pelo decréscimo no volume da célula. Conseqüentemente, grande número de prótons é produzido no citoplasma promovendo a diminuição do pH intracelular (ABE, KATO e HORIKISHI, 1999; MARCELLINI, 2005). CHEFTEL (1995) relatou que a alteração do pH intracelular da célula microbiana estressada pela pressão pode ser de até 0,2 unidade.

A resistência dos microrganismos à pressão varia consideravelmente e depende de fatores, como: tipo de microrganismo (família, espécie, cepa), fase de crescimento em que se encontra, temperatura, pressão e tempo de tratamento, pH e composição do meio (PATTERSON *et al.*, 1997), bem como idade da cultura, presença de fatores e substâncias antimicrobianas, tipo de pressão utilizada (pulso ou contínua) e a matriz alimentícia na qual está inserido o microrganismo (ALPAS *et al.*, 2000; SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002; HUGAS, GARRIGA e MANFORT, 2002). Segundo BUTZ e TAUSHER (2002), a atividade de água e o pH são fatores críticos na inativação de microrganismos por APH.

PALOU *et al.* (1998b) observaram que a inativação dos ascósporos do *Byssoschlamys nivea* em sucos de frutas concentrados dependeu da temperatura, da atividade de água e do tipo de processo utilizado (pulso simples ou múltiplos).

LEE, DOUGHERTY e KANG (2002) avaliaram o efeito da APH em esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e observaram que somente a associação pressão/tratamento térmico foi eficaz para sua inativação.

PAGÁN e MACHEY (2000) em trabalho realizado com as espécies C9490, H1071 e NCTC 8003 de *Exercia caule* observaram alta, baixa e média resistência à pressão, respectivamente, na fase estacionária. No entanto, verificaram resistências similares à pressão na fase exponencial.

As células vegetativas em fase de crescimento (log) são mais sensíveis à pressão que as células vegetativas na fase lag. As células na fase lag são esféricas e menores do que aquelas que estão na fase de crescimento (log). Além disso, o acúmulo de componentes como proteínas e carboidratos poderiam reduzir o efeito da pressão nas células na fase lag (ISAACS, CHILTON e MACKEY, 1995). MAÑAS e MACKEY (2004) propuseram que a fase exponencial da célula é inativada sob alta pressão por danos irreversíveis à membrana celular, ao contrário das células na fase estacionária que têm membrana citoplasmática mais robusta (suportando melhor o tratamento pela pressão). Essa proposta baseia-se no fato das células na fase exponencial mostrarem mudanças nos seus envoltórios que não são observadas na fase estacionária. Essas mudanças incluem perturbações físicas na

estrutura celular, diminuição no trabalho osmótico e também na proteína e no RNA do meio extracelular.

As bactérias Gram positivas, em geral, são mais resistentes à pressão que as bactérias Gram negativas (EARNSHAW, 1995; SMELT, 1998), devido sua parede celular mais fina (apresentam membrana externa). A rigidez da parede celular confere fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade em virtude da aplicação da pressão (SMELT, 1998). Já LUDWIG e SCHERK (1997) não encontraram nenhuma relação entre o tipo de Gram e a resistência à pressão, mas sim em relação à morfologia celular. Afirmaram que as bactérias mais sensíveis têm forma bacilar e as mais resistentes formas de cocos. Outros autores também têm mostrado a grande resistência dos cocos a altas pressões (EARNSHAW, 1995; PATTERSON *et al.*, 1995; PATTERSON e KILPATRICK, 1998).

As leveduras e os fungos são microrganismos muito sensíveis à pressão, inativando-se a 200-300 MPa (CHEFTEL, 1995), enquanto que os esporos são muito resistentes e podem sobreviver a pressões muito elevadas (> 1000 MPa) (SALE, GOULD e HAMILTON, 1970). Considerando tal resistência, os esporos podem ser germinados em baixas pressões. Esse processo leva ao aparecimento de células vegetativas que são mais sensíveis à pressão e a outros métodos de inativação (EARNSHAW, 1996). Pressões de 50-300 MPa são suficientes para produzir a germinação dos esporos (SALE, GOULD e HAMILTON, 1970; WUYTACK, SOONS e MICHIELIS, 1997).

Para inativar as células vegetativas, em geral, é necessário aplicar pressões superiores a 200 MPa. Para a inativação da maioria das bactérias Gram positivas são necessários tratamentos a 500 – 600 MPa e 25°C por 10 minutos, enquanto que as Gram negativas são inativadas com tratamentos de 300 – 400 MPa por 10 minutos (TRUJILLO *et al.*, 1997). A Tabela 1 mostra a sensibilidade de alguns microrganismos à alta pressão hidrostática.

São, relativamente, poucas as informações sobre a sensibilidade dos fungos à pressão, mas já foi mostrado que os conídios são mais sensíveis e os ascósporos mais resistentes (BUTZ *et al.*, 1996; VOLDRICH *et al.*, 2004). O efeito da pressão em micotoxinas pré-formadas é limitado como tratamento pelo pequeno efeito nas ligações covalentes das moléculas. Porém, estudo mostrou que a patulina (micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssochlamys*) foi degradada pela pressão (BRUNA *et al.*, 1997). A patulina contida em suco de maçã diminuiu em 42, 53 e 62% após 1 hora de tratamento a 300, 500 e 800 MPa, respectivamente, a 20°C.

4 FATORES EXTRÍNSECOS QUE AFETAM A SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

4.1 EFEITO DO SUBSTRATO (COMPOSIÇÃO, ATIVIDADE DE ÁGUA E pH)

A sensibilidade do microrganismo à pressão é extremamente dependente da matriz do alimento. Bactérias classificadas como “barossensíveis” em estudos com tampões podem tornar-se barorresistentes em matriz complexa como o leite (PATTERSON *et al.*, 1995; GARCÍA-GRAELLS, MASSCHALCK e MICHELIS, 1999). Alguns constituintes dos alimentos como proteínas, carboidratos e lipídios exercem efeito baroprotetor (SIMPSON e GILMOUR, 1997). Tratamento de 375 MPa por 30 minutos a 20°C em tampão fosfato (pH 7,0) provocou inativação de $6 \log_{10}$ de *Escherichia coli* O157:H7, enquanto o mesmo tratamento em carne de frango e leite reduziu apenas $2,5 \log_{10}$ e $1,75 \log_{10}$, respectivamente (PATTERSON *et al.*, 1995). Cátions, como Ca^{2+} , podem exercer efeito baroprotetor, motivo pelo qual muitos microrganismos apresentam maior resistência à pressão quando tratados em alimentos como o leite (HAUBEN, BENAERTS e MICHIELS, 1998).

A diminuição da atividade de água tem sido postulada como efeito baroprotetor nos microrganismos, como visto nas leveduras *Zygosaccharomyces bailii* (PALOU *et al.*, 1997) e *Rhodotorula rubra* (OXEN e KNORR, 1993). OXEN e KNORR (1993) relataram que a redução da atividade de água do meio de 0,98-1,0 para 0,94-0,96 melhorou a sobrevivência de *Rhodotorula rubra* a pressões entre 200 e 400 MPa por 15 minutos a 20°C. Porém, a natureza do soluto é importante. Na mesma atividade de água, células foram mais sensíveis à pressão em glicerol do que em monossacarídeos e dissacarídeos (SMELT, 1998).

TABELA 1 - SENSIBILIDADE DE ALGUNS MICRORGANISMOS FRENTE AO TRATAMENTO A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Microorganismo	Substrato	Condições de Tratamento	Inativação (reduções logarítmicas)	Referência
Esporos de Bactérias				
<i>C. botulinum</i> tipo E	Tampão fosfato de Sorensen (0,067M, pH 7,0) Peito de frango	827MPa/5min/50°C	5	REDDY <i>et al.</i> , 1999
<i>C. sporogenes</i>		680MPa/20min/80°C	2	CRAWFORD <i>et al.</i> , 1996
<i>B. stearotherophilus</i>	água	600MPa/5min/70°C x 6 ciclos	5	HAYAKAWA <i>et al.</i> , 1994
<i>C. sporogenes</i> ; <i>B. subtilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i>	Emulsão de carne	621MPa/5min/98°C	>5 >9 >10	WILSON e BAKER, 2001
Células Vegetativas de Bactéria				
<i>Compylobacter jejuni</i>	Patê de presunto	300MPa/10min/25°C	6	SHIGEHISA <i>et al.</i> , 1991
<i>Salmonella</i> Senftenberg 775W <i>E. coli</i> O147:H7 NCTC 12079	Alimento infantil Leite UHT Carne de ave Leite UHT	340MPa/10min/23°C 600MPa/15min/20°C	<2 <2	METRICK <i>et al.</i> , 1989 PATTERSON <i>et al.</i> , 1995
<i>S. aureus</i>	Carne de ave Leite UHT	600MPa/15min/20°C	3	PATTERSON <i>et al.</i> , 1995
<i>L. monocytogenes</i>	Carne de ave Leite UHT	375MPa/15min/20°C	<1	PATTERSON <i>et al.</i> , 1995
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 <i>L. helveticus</i>	Carne de ave Leite de ovelha	300MPa/3min/10°C 500MPa/10min/10°C	5	COOK, 2003
<i>P. fluorescens</i>	Leite de ovelha	450MPa/10min/10°C	3	GERVILLA <i>et al.</i> , 1997
Bolores e Leveduras				
<i>S. cerevisiae</i>	Patê de presunto	300MPa/10min/20°C	2	SHIGEHISA <i>et al.</i> , 1991
Ascósporos de <i>B. nivea</i>	Suco de uva Aa=0,97 Geléia de Bilberry Aa= 0,84	700MPa/30min/70°C	2 <1	BUTZ <i>et al.</i> , 1996

Adaptado de PATTERSON (2005).

OPSTAL, VANMUYSEN e MICHAELS (2003) estudaram a resistência da *Escherichia coli* em tampões fosfato de potássio contendo 0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% m/v de sacarose, submetida a tratamentos de 250 MPa a 500 MPa a 20°C por 15 minutos. Verificaram que a sacarose exerceu efeito baroprotetor sobre a *Escherichia coli*, porém as células que não eram imediatamente inativadas sofriam injúria subletal. Quando armazenadas por 24 horas a 20°C, após tratamento de alta pressão, observaram redução logarítmica a mais que estaria relacionada com a intensidade da pressão e não com a concentração de sacarose, havendo aumento na eficiência do processo. Assim, o tratamento com alta pressão combinado com outros fatores de conservação, como por exemplo, a baixa atividade de água (alta pressão osmótica) torna-se perspectiva extremamente interessante.

BASAK, RAMASWAMY e PIETTE (2002) avaliaram a resistência térmica de *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae* em néctar e suco concentrado de laranja. Verificaram maior barorresistência no suco concentrado para ambos microrganismos. Os valores z foram praticamente o dobro quando comparado com néctar, mostrando aumento significativo na resistência dos microrganismos com a elevação da concentração de sólidos solúveis.

Já foi verificado que bactérias são bem mais sensíveis em pH baixo. Vários estudos têm demonstrado a eficiência da utilização de baixas pressões para inativação de muitas bactérias vegetativas barorresistentes em alimentos ácidos (GRACÍA-GRAELLS, HAUBEN e MICHIELS, 1998; ALPAS *et al.*, 2000; JORDAN *et al.*, 2001). O pH de soluções ácidas também diminui com o aumento da pressão, como a queda de 0,2 unidade por 100 MPa observada em suco de maçã (HEREMANS, 1995; PATTERSON, 2005). Essa mudança de pH que ocorre durante o tratamento pela APH pode ser medida diretamente em alimentos líquidos, porém ainda não foram desenvolvidos métodos para mensurar a variação de pH de alimentos sólidos durante o tratamento por APH (HAYERT, PERRIER-CORNET e GERVAIS, 1999; STIPPL *et al.*, 2004). O pH volta ao seu valor original quando a pressão é restabelecida, mas não se sabe se essa mudança no pH afeta a sobrevivência dos microrganismos durante a aplicação da pressão. Sabe-se que o pH e a pressão podem agir sinergicamente aumentando a inativação microbiana. LINTON, McCLEMENTS e PATTERSON (1999) demonstraram que o pH inicial exerce efeito significativo na inativação de *Escherichia coli* O157:H7 em suco de laranja. Com o abaixamento do pH, as células ficam mais susceptíveis à inativação ou à injúria subletal causada pela pressão que leva à rápida morte da bactéria durante a estocagem do suco.

4.2 EFEITO DA TEMPERATURA

O processamento por APH sob refrigeração, temperatura ambiente ou aquecimento moderado, pode inativar microrganismos patogênicos ou deteriorantes em diferentes níveis, com poucas mudanças no frescor dos produtos quando comparado com o processo de conservação convencional (TORRES e VELAZQUEZ, 2005).

A temperatura durante o tratamento por APH exerce efeito extremamente significativo na inativação de microrganismos. Geralmente, a inativação é aumentada acima ou abaixo de 20°C (TAKAHASHI, ISHII e ISHIKAWA, 1992; PATTERSON, 2005).

O efeito negativo da esterilização convencional na qualidade do produto deve-se ao intenso tratamento térmico. A APH sozinha é incapaz de inativar esporos bacterianos, sendo necessária sua combinação com outras técnicas como certa elevação da temperatura (KREBBERS *et al.*, 2003).

O processamento a Alta Pressão pode ser usado como meio de esterilização de produtos alimentícios se aplicado em temperaturas elevadas (60-90°C), ou utilizando a compressão adiabática para o aquecimento. Logo, a esterilização a Alta Pressão deve combinar pressão e temperatura objetivando a inativação de esporos e enzimas. Determinando a condição ótima de processamento é possível inativar tanto células vegetativas quanto seus esporos, resultando em alimentos estáveis (MATSER *et al.*, 2004).

Segundo MATSER *et al.* (2004), os seguintes parâmetros são importantes para a esterilização a alta pressão: temperatura inicial do produto, temperatura na câmara do fluido de pressão; nível de pressão utilizada; temperatura durante o tratamento (a temperatura aumenta devido ao aquecimento adiabático, porém há subsequente resfriamento na parede da câmara de pressão); tempo de tratamento e número

de ciclos. A esterilização a Alta Pressão resulta em aquecimento adiabático, distribuição uniforme da temperatura e tempos de tratamento relativamente curtos. O aquecimento adiabático (aumento uniforme da temperatura dentro do produto) é causado unicamente pela pressurização. A magnitude do aumento da temperatura no produto é determinada pela temperatura inicial e propriedade material do produto, conforme a Equação 1 (HOOGLAND, DE HEIJ e Van SCHEPDAEL, 2001):

$$\frac{dT}{dp} = \frac{\alpha.T}{\rho.C_p} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que:

T = temperatura (K).

p = pressão (Pa).

á = coeficiente de expansão volumétrica (1/K).

ñ = densidade (Kg/m³).

C_p = calor específico (J/Kg.K).

Não se conhece o aumento da temperatura (descrito na Equação 1) devido ao tratamento a Alta Pressão para a maioria dos alimentos, já que essa propriedade (aquecimento adiabático) é função da pressão e da temperatura. A Tabela 2 mostra a mudança da temperatura para alguns alimentos.

TABELA 2 - MUDANÇA DE TEMPERATURA DEVIDO À COMPRESSÃO ADIABÁTICA PARA ALGUNS ALIMENTOS

Alimento a 25°C	Mudança de temperatura por 100 MPa (°C)
Água	~3,0
Purê de batata	~3,0
Suco de laranja	~3,0
Salsa	~3,0
Leite (2% de gordura)	~3,0
Salmão	~3,2
Frango	~4,5
Carne	~6,3
Óleo de oliva	De 8,7 a <6,3 ^a
Óleo de soja	De 9,1 a <6,2 ^a

^a Alimentos que mostraram diminuição da temperatura com o aumento da pressão.

FONTE: TING, BALASUBRAMARIAM e RAGHUBEER, 2002.

O aquecimento adiabático resulta em aquecimento homogêneo no produto. Porém, como descrito por DE HEIJ *et al.* (2002) e TING BALASUBRAMARIAM e RAGHUBEER (2002), a parede de aço da câmara de pressão do equipamento sofre aumento de temperatura menor do que o produto tratado, o que resulta no resfriamento do produto próximo à parede da câmara durante o tempo de retenção. Pequenas diferenças de temperatura podem resultar em efeitos significativos na inativação de esporos. Conseqüentemente, o cálculo da distribuição da temperatura pelo produto em função do tempo e da posição na câmara de pressão é necessário para delinear o equipamento e o processamento (DE HEIJ *et al.*, 2002). ROVERE *et al.* (1999) mostraram que a inativação de esporos de *Clostridium sporogenes* é comercialmente possível aplicando pressões de 600-800 MPa e temperaturas em torno de 100°C. REDDY *et al.* (1999) verificaram redução de 5 ciclos logarítmicos em esporos de *Clostridium botulinum* tipo E após processamento a 827 MPa e temperatura final de processamento de 50°C a 55°C.

Vários autores têm estudado o efeito da alta pressão e elevação da temperatura na inativação de esporos. PATTERSON e KILPATRICK (1998) relataram diminuição aproximada de 6 ciclos logarítmicos de *Escherichia coli* O157 H7 em leite, usando tratamento de 400 MPa a 50°C por 15 minutos. A temperatura e a pressão isoladamente não promoveram esse nível de inativação.

Estudos feitos com purê de tomate demonstraram que o tratamento por APH combinado com

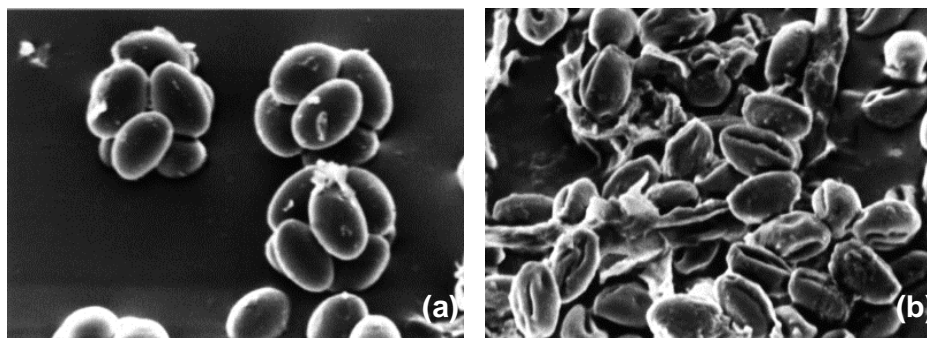
elevação de temperatura (700 MPa, 90°C, 30s) reduziu em 4,5 unidades logarítmicas a contaminação de esporo de *Bacillus stearothermophilus*, além de inativar 99% da poligalacturonase e da pectinametilesterase (PME) (KREBBS *et al.*, 2003).

MAGGI *et al.* (1994) avaliaram o efeito de altas pressões sobre ascósporos de fungos termorresistentes em néctar de damasco e água. Foram testadas as espécies *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus*. Suspensões de ascósporos desses fungos ativados (70°C/15 min) foram inoculadas em néctar de damasco e água (concentração final de 10²-10⁴ ascósporos/mL). Vinte mililitros de amostras inoculadas foram colocados em embalagens de polietileno (7x12 cm) e submetidos à pressão de 600 MPa e 900 MPa em temperatura ambiente (20°C), ou após aquecimento até 50 e 60°C em banho termostático. Verificaram que os ascósporos são menos sensíveis a alta pressão em néctar do que em água. *Talaromyces flavus* se mostrou sensível no néctar de damasco (900 MPa/20 min) a 20°C, sendo os seus ascósporos inativados rapidamente. Ascósporos de *Neosartorya fischeri* foram reduzidos em 2 ciclos logarítmicos, enquanto que *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* se mostraram mais resistentes à pressão (não houve inativação). No pré-aquecimento a 50°C e tratamento a 800 MPa por 1 a 4 minutos e pré-aquecimento a 60°C e 700 MPa por 1 a 2 minutos, todas as quatro espécies foram inativadas demonstrando melhoria do tratamento em alta pressão para destruição dos ascósporos quando precedido pelo aquecimento do produto em temperatura branda.

BUTZ *et al.* (1996) investigaram a resposta de algumas espécies de fungos termorresistentes (*Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva*, *Eurotium spp.*, *Eupenicillium spp.* e *Paecilomyces spp.*) frente ao tratamento combinado de alta pressão e temperatura em suco de uva. Os conídios e as hifas foram destruídos pelo tratamento mais brando (300 MPa/25°C). Os ascósporos de *Byssochlamys nivea* se mostraram mais barorresistentes exigindo pressões acima de 600 MPa para inativação, ao contrário de outras espécies testadas que foram destruídas com tratamentos mais brandos. Em testes com ascósporos de *Byssochlamys nivea* é mais efetivo aplicar alta pressão (700 MPa/60°C) antes do tratamento térmico (80°C/30 min) que o inverso, indicando que a pressão sensibilizou os ascósporos e facilitou a ação inativadora do calor. Ainda em teste com *Byssochlamys nivea* foi constatada inativação maior dos ascósporos em suco de uva que em solução salina fisiológica (tratamento de 700 MPa/70°C). Já para MAGGI *et al.* (1994), a resistência à pressão foi maior em néctar de damasco em relação à água destilada. BUTZ *et al.* (1996) também observaram com auxílio da microscopia eletrônica, que a APH rompe ascos e danifica a parede dos ascósporos (*Byssochlamys nivea*, tratamento de 700 MPa/70°C, tempo suficiente para inativação total dos ascósporos) como mostra a Figura 2.

Temperaturas de refrigeração também podem aumentar a inativação pelo tratamento com pressão. GERVILLA *et al.* (1997) demonstraram que leite de ovelha pressurizado a 450 MPa a 2°C por 15 minutos foi mais efetivo na inativação de *Listeria innocua* que o mesmo tratamento a 25°C, porém menos efetivo que a 50°C.

FIGURA 2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE ASCÓSPOROS DE *Byssochlamys nivea*



(a) Antes do tratamento APH;

(b) Após 60 minutos a 700 MPa e 70°C.

FONTE: BUTZ *et al.* (1996).

GEORGE (2000) sugeriu que a inativação por APH de microrganismos patogênicos é mais efetiva em baixas temperaturas (-10 e -5°C) que em temperatura ambiente (20-40°C). Tal fato levou SHEN *et al.* (2005) a avaliar o tratamento com APH em baixas temperaturas em célula vegetativa de *Bacillus subtilis*, mostrando que tratamentos entre 250 MPa e 350 MPa a -25°C são mais efetivos na inativação desse microrganismo.

5 CONCLUSÃO

O processamento a alta pressão tem sido reconhecido como técnica potencial de preservação de alimentos há mais de um século. Embora seja comprovada a preservação das características nutricionais e sensoriais do alimento, prever os efeitos do tratamento a alta pressão exige estudo caso a caso, devido à complexidade de composição de cada alimento e as possibilidades de mudanças e reações que podem ocorrer sob pressão. As pesquisas com alta pressão vêm acumulando conhecimento sobre a inativação cinética de microrganismos e enzimas, sobre a estrutura de biopolímeros (proteínas, polissacarídeos), bem como sobre as características de produtos alimentícios reais (sucos, laticínios, carnes, peixes, frutas e vegetais). A alta pressão não se mostra promissora apenas pela sua capacidade de preservação do alimento, mas também pelo seu potencial em promover efeitos nas propriedades funcionais de seus constituintes.

A resistência dos microrganismos à pressão varia bastante e depende de fatores como, o tipo de microrganismo, fase de crescimento, temperatura, pressão e tempo de tratamento, pH e composição do meio, idade da cultura, presença de fatores e substâncias antimicrobianas, tipo de pressão utilizada e a matriz alimentícia na qual está inserido o microrganismo, sendo a atividade de água e o pH fatores críticos na inativação de microrganismos por APH.

Embora ainda exista pouca informação sobre a sensibilidade dos fungos à pressão tem sido mostrado que os conídios e hifas são mais sensíveis, enquanto os ascósporos são mais resistentes. O efeito da pressão em micotoxinas pré-formadas é limitado, uma vez que esse tratamento exerce pouco efeito nas ligações covalentes.

A esterilização representa uma das inúmeras possibilidades da tecnologia de alta pressão, assim como a pasteurização. A combinação de pressão e temperatura, bem como o aumento de temperatura causado pela compressão adiabática, possibilita a inativação de células vegetativas e de esporos microbianos. A pasteurização e a esterilização a alta pressão tem sido consideradas menos danosas aos produtos que os equivalentes térmicos, principalmente, quanto aos fatores sensoriais e de retenção de nutrientes. Os resultados das pesquisas sobre conservação de produtos alimentícios utilizando a tecnologia de alta pressão têm mostrado que os efeitos obtidos dependem do produto, o que requer cuidadosa seleção das condições de processo.

ABSTRACT

EFFECT OF THE HIGH HYDROSTATIC PRESSURE IN THE MICROORGANISMS

This paper aims at reviewing the effect of high pressure on microorganisms, and discussing the influence of extrinsic factors (substratum and temperature) on the treatment, as well as its principles and operations. High Pressure is an emergent technology and does not affect covalent chemical bounds presented in food molecules constituents, decreasing the sensorial and nutritional food attribute losses. This study concludes that effects of high pressure depend on product characteristics and process conditions, and, in general, it demonstrates efficiency on vegetative cell inactivation and, when combined with thermal treatment, it can inactivate spores, increasing the shelf life and guaranteeing microbiological safety.

KEY-WORDS: HIGH PRESSURE; MICROORGANISMS.

REFERÊNCIAS

- 1 ABE, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. **Trends in Microbiology**, v.7, n.11, p.447-453, 1999.

- 2 ALEMÁN, G.D.; TING, E.Y.; MORDRE, S.C.; HAWES, A.C.O.; WALKER, M.; FARKAS, D.F.; TORRES, J.A. Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurization of pineapple juice. **Journal of Food Science**, v.61, n.2, p.388-390, 1996.
- 3 ALPAS, D.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU RAY, B. Intection of high hidrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.33-42, 2000.
- 4 ANSTINI, T.T. High-pressure processing for safe, quality foods. **Cereal Foods World**, v.48, n.1, p.5-8, 2003.
- 5 AVURE TECNOLOGIES, SYSTEMS. **High pressure seafood processing system**. Disponível em: <http://www.avure.com/archive/documents/Food-products/qfp_6871-eu-may-2007.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2006.
- 6 BALASUBRAMANIAN, V.M.; TING, E.Y.; STEWART, C.M.; ROBBINS, J.A. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.5, p.299-306, 2004.
- 7 BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; RODRÍGUEZ, J.J. Update on nonthermal food processing technologies: pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v.54, n.11, p.513-520, 2002.
- 8 BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S.; PIETTE, J.P.G. High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.3, p.223-231, 2002.
- 9 BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T.; TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Leensm.-Wiss.u-Technology**, v.29, p.404-410, 1996.
- 10 BUTZ, P.; TAUSHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v.35, p.279-284, 2002.
- 11 BRUNA, D.; VOLDRICH, M.; MAREK, M.; KAMARA'D, J. Effect of high pressure treatment on patulin content in apple concentrate. In: HIGH PRESSURE RESEARCH IN THE BIOSCIENCES AND BIOTECHNOLOGY, 1997, Leven. **Proceedings...** Leven: Leven University Press, 1997. p. 335.
- 12 DE HEIJ, W.; VAN SCHEPDAEL, L.; VAN DEN BERG, R.; BARTELS, P. Increasing preservation efficiency and product quality through control of temperature distribution in high pressure applications. **High Pressure Research**, v.22, p. 653-657, 2002.
- 13 CAMPOS, F.P. **Estudo do processamento de suco de laranja através da tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão**. Campinas, 2004. 94 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- 14 CHEFTEL, J.C. High pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v.1, p.75-90, 1995.
- 15 CHEFTEL, J.C. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: HIGH PRESSURE RESEARCH IN THE BIOSCIENCES AND BIOTECHNOLOGY, 1992, Montrouge. **Proceedings...** Montrouge: John Libbey Eurotext, 1992, p. 195.
- 16 CHONG, P.L.; FORTES, P.A.; JAMESON, D.M. Mechanisms of inhibition oh Na/K ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probs. **Journal Biology Chemistry**, v.260, p.14484-14489, 1985.
- 17 DONSI, G.; FERRARI, G.; MARESCA, P. Pulsed high pressure treatment for the anactivation of *Sacchamyces cerevisiae*: the effect of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.984-990, 2007.
- 18 EARNSHAW, R.G. High pressure food processing. **Nutrition & Food Science**, n.2, p.8-11, 1996.
- 19 EARNSHAW, R.G. Kinetics of high pressure inactivation of microorganisms. In: HIGH PRESSURE PROCESSING OF FOODS, 1995, Leicestershire. **Proceedings...** Leicestershire: Nothiinghan University Press, 1995. p.20.

- 20 FARKAS, D.F.; HOOVER, D.G. High pressure processing. **Journal of Food Science**, v.65, n.4, p.47-64, 2000.
- 21 FDA. Food and Drug Administration. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. High pressure processing**. Jun. 2000. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>>. Acesso em: 12 jun.2008.
- 22 GARCÍA-GRAELLS, C.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1248-1254, 1999.
- 23 GARCIA-GRAELLS, C.; HAUBEN, K.J.; MICHIELS, C.W. High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. **Applied Environmental of Microbiology**, v.64, p.1566-1568, 1998.
- 24 GEORGE, S. **Impact of high hydrostatic pressure on foods at sub temperatures: phase transitions, modelling temperature distribution during thawing and inactivation of microorganisms**. Berlin, 2000, 145 f. Dissertation (Ph. D.), University of Technology.
- 25 GERVILLA, R.; CAPELLAS, M.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. **Journal of Food Protection**, v.60, p.33-37, 1997.
- 26 GOULD, G.W. Emerging technologies in food preservation and processing in the last 40 years. In: BARBOSA-CÂNOVAS, G.; GOULD, G.W. **Food preservation technology series innovations in food processing**. Pensilvânia: Lancaster, 2000. cap. 1, p. 1-11.
- 27 HAYERT, M.; PERRIER-CORNET, J.-M.; GERVAIS, P. A simple method for measuring the pH of acid solutions under high pressure. **Journal of Physical Chemistry**, v.103, p.640-645, 1999.
- 28 HAUBEN, K.J.A.; BENAERTS, K.; MICHIELS, C.W. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.678-684, 1998.
- 29 HEREMANS, K. High Pressure effects on biomolecules. In: HIGH PRESSURE PROCESSING OF FOODS, 1995, Leicestershire. **Proceedings...** Leicestershire: Nottingham University Press, 1995, p.81.
- 30 HOOGLAND, H.; DE HEIJ, W.; VAN SCHEPDAEL, L. High pressure sterilization: novel technology, new products, new opportunities. **New Food**, v.3, p.21-26, 2001.
- 31 HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganism. **Food Technology**, v.43, p.99-107, 1989.
- 32 HOOVER, D.G. Pressure effects on biological systems. **Food Technology**, v.47, n.6, p.150-155, 1993.
- 33 HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. New mild technologies in meat processing: high pressure is a model technologt. **Meat Science**, v.62, p.359-371, 2002.
- 34 ISAACS, N.S.; CHILTON, P.; MACKEY, B. Studies on inactivation by high pressure of microorganisms. In: HIGH PRESSURE PROCESSING OF FOOD, 1995, Leicestershire. **Proceedings...** Leicestershire: Nottingham University Press, 1995, p.65.
- 35 JORDAN, S.L.; PASCUAL, C.; BRACEY, E.; MACKEY, B.M. Inactivation and injury of pressure-resistants strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.463-469, 2001.
- 36 KNORR, D. Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**, v.47, n.6, p.156-161, 1993.
- 37 KREBBS, B.; MATSER, A.M.; HOOGERWERF, S.W.; MOEZELAAR, R.; TOMASSEN, M.M.M.; BERG, R.W. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.4, p.377-385, 2003.
- 38 LEE, S.Y.; DOUGHERTY, H.; KANG, D.H. Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.6, n.8, p.4158-4161, 2002.

- 39 LINTON, M.; MCCLEMENTS, J.M.J.; PATTERSON, M.S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of pressure-treated orange juice. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1038-1040, 1999.
- 40 LUDWIG, H.; SCHRECK, CH. The inactivation of vegetative bacteria by pressure. In: HIGH PRESSURE RESEARCH IN THE BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1997, Leuven. **Proceedings...** Leuven: Leuven University Press, 1997, p.221.
- 41 MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTTI, E.; ROVERE, P.; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**, v.69, p.26-29, 1994.
- 42 MAÑAS, P.; MACKEY, B.M. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1545-1554, 2004.
- 43 MARCELLINI, A.M.B. **Desenvolvimento de suco de abacaxi (*Ananas comosus (L.) Merrill*) através da tecnologia de alta pressão hidrostática aplicada à polpa do fruto**. Campinas, 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 44 MATSER, A.M.; KREBBERS, B.; VAN DER BERG, R.W.; BARTELS, P.V. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.79-85, 2004.
- 45 NC HIPERBARIC. **High pressure processing: innovation for food industry**. Disponível em: <http://www.nchyperbaric.com/descargas/Flyer_juices&beverages_2006.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2006.
- 46 OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; FUKUMOTO, H.; HORI, K.; HAYASHI, R. Effects of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of freshly squeezed, nonpasteurized citrus juice. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v.63, p.1109-114, 1989.
- 47 OPSTAL, I.V.; VANMUYSEN, S.C.M.; MICHIELS, C.W. High sucrose concentration protects *E. coli* against pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.1-9, 2003.
- 48 OXEN, P.; KNORR, D. Baroprotective effects of high solute concentration against inactivation of *Rhodotorula rubra*. **Lebensm Wiss Technology**, v.26, p.220-223, 1993.
- 49 PAGÁN, R.; MACHEY, B. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary-phase cells and variation among strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2829-2934, 2000.
- 50 PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. High hydrostatic pressure come-up time and yeast viability. **Journal of Food Protection**, v.61, n.12, p.1657-1660, 1998b.
- 51 PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailii*. **Journal of Food Protection**, v.61, n.9, p.1213-1215, 1998a.
- 52 PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Combined effect of high hydrostatic pressure and water activity on *Zygosaccharomyces bailii* inhibition. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.417-420, 1997.
- 53 PATTERSON, M.F. A Review: microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1400-1409, 2005.
- 54 PATTERSON, M.F.; KILPATRICK, A. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat inactivation of pathogens in milk and poultry. **Journal of Food Protection**, v.61, p.432-436, 1998.
- 55 PATTERSON, M.F.; MARGEY, D.M.; MILLS, G.; SIMPSON, R.; GLIMOUR, A. The effect of high pressure treatment on microorganisms in foods. In: HIGH PRESSURE RESEARCH IN THE BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1997, Leuven. **Proceedings...** Leuven: Leuven University Press, 1997, p. 269.
- 56 PATTERSON, M.F.; QUIN, M.; SIMPSON, R.; GLIMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. **Journal of Food Protection**, v.58, p.524-529, 1995.

- 57 RATTANATHANALERK, M.; CHIEWCHAN, N.; SRICHUMPOUNG, W. Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v.66, p.259-265, 2005.
- 58 RASO, J.; GONGORA-NIETO, M.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.125-132, 1998.
- 59 REDDY, N.R.; SOLOMON, H.M.; FINGERHUT, G.A.; RHODEHAMEL, E.J.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; PALANIAPPAN, S. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. **Journal of Food Safety**, v.19, p.277-288, 1999.
- 60 ROVERE, P.; LONNERBORG, N.G.; GOLA, S.; MIGLIOLO, L.; SCARAMUZZA, N.; SQUARCINA, N. Advances in bacterial spores inactivation in thermal treatments under pressure. In: ADVANCES IN HIGH PRESSURE BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1999, Berlin. **Proceedings...** Berlin: Springer, 1999. p.54.
- 61 SALE, A.J.H.; GOULD, G.W.; HAMILTON, W.A. Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. **Journal of General Microbiology**, v.60, p.323-334, 1970.
- 62 SANDRA, S.; DALGLEISH, D.G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Products**, v.15, p.1095-1104, 2005.
- 63 SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÁNOVAS, V.; SWANSON, B.G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.42, n.6, p.627-645, 2002.
- 64 SHEN, T.; URRITIA BENET, G.; BRUL, S.; KNORR, D. Influence of high-pressure-low-temperature treatment on the inactivation of *Bacillus subtilis* cells. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.6, p.271-278, 2005.
- 65 SIMPSON, R.K.; GILMOUR, A. The effects of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate buffered saline and models food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.181-188, 1997.
- 66 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.
- 67 TAKAHASHI, K.; ISHII, H.; ISHIKAWA, H. Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. In: HIGH PRESSURE SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1992, Paris. **Proceedings...** Paris: John Libbey Eurotext, 1992. p.303.
- 68 TEWARI, G.; JAYAS, D.S.; HOLLEY, R.A. High pressure processing of foods: an overview. **Science des Aliments**, v.19, p.619-661, 1999.
- 69 THAKUR, B. R.; NELSON, P. E. High-pressure processing and preservation of food. **Food Reviews International**, v.14, p.427-447, 1998.
- 70 TING, E.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; RAGHUBEER, E. Determining thermal effects in high pressure processing. **Food Technology**, v.56, p.31-35, 2002.
- 71 TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of food. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.95-112, 2005.
- 72 TRUJILLO, A.J.; FERRAGUT, V.; GERVILLA, R.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B. High hydrostatic pressure affects milk and milk products, recent research developments. **Agriculture and Food Chemistry**, v.1, p.137-159, 1997.
- 73 VOLDRICH, M.; DOBIÁS, J.; TICHÁ, L.; CEROVSKÝ, M.; KRÁTKÁ, J. Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.541-543, 2004.
- 74 WALSBY, A.E. Gas filled structures providing buoyancy in photosynthetic organisms. In: SLEIGH, M.A.; MACDONALD, A.G. (eds.). **The effect of pressure on living organisms**. New York: Academic Press, 1972. p. 233-239.
- 75 WUYTACK, E.; SOONS, J.; MICHIELS, C. Rapid measurement of pressure-induced germination on

Bacillus subtilis spores expressing green fluorescent protein. In: HIGH PRESSURE RESEARCH IN THE BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1997, Leuven. **Proceedings...** Leuven: Leuven University Press, 1997. p.261.

- 76 ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. **Food Technology**, v.47, n.6, p.162-163, 1993.