UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

André Tomé Coelho Lourenço

Efeitos do ultrassom de alta intensidade sob pressão na redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina

São José do Rio Preto
2012

André Tomé Coelho Lourenço

Efeitos do ultrassom de alta intensidade sob pressão na redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roger Darros Barbosa

São José do Rio Preto
2012

Lourenço, André Tomé Coelho.
Efeitos do ultrassom de alta intensidade sob pressão na redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina / André Tomé Coelho Lourenço. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.
83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roger Darros Barbosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ultrassom. 2. Manossonicação. 3. Manotermossonicação. 4. Métodos não-convencionais. 5. *Listeria monocytogenes*. 6. Extrato de carne bovina. I. Darros-Barbosa, Roger. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU –613.28

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

André Tomé Coelho Lourenço

Efeitos do ultrassom de alta intensidade sob pressão na redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roger Darros Barbosa
Professor Assistente Doutor
UNESP/IBILCE - São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. José Antonio Gomes Vieira
Professor Assistente Doutor
UNESP/IBILCE - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Tokio Higuti
Professor Assistente Doutor
UNESP/FEIS - Ilha Solteira

São José do Rio Preto, 7 de Dezembro de 2012.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, eternos guerreiros e educadores dos valores morais e dos bons costumes.
Amo muito vocês.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a meus pais, meus primeiros e importantíssimos educadores. Com amor incondicional, sempre prontos a mostrar o caminho dos primeiros passos, às vezes com informação e ensinamentos, às vezes com disciplina, prepararam-nos, a mim e a minha irmã, para essa deliciosa estrada da vida do saber;

Ao meu caro e dedicado orientador, Roger, que com muita paciência e generosidade, me ajudou a trilhar esse caminho;

A Elzinha da Biblioteca que muito me ajudou no início a encontrar as referências bibliográficas que precisava;

Ao amigo Rodrigo Bíscaro, pelas agradáveis conversas sobre pesquisa, ciência e, onde numa dessas conversas, surgiu a idéia, a ser bastante lapidada posteriormente, de trabalhar com ultrassom;

Aos professores, amigos, companheiros e colegas de IBILCE, pela convivência, ajuda, companheirismo e tão boa energia que sempre emanou desse Instituto;

Gracias a Santiago Condón por recibirme en Zaragoza, permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio y por su generosa ayuda y enseñanzas. A los otros profesores y amigos de la Universidad de Zaragoza por su valiosa ayuda, enseñanzas y por la convivencia placentera;

Por fim, agradeço aos amigos de Barretos por sua amizade, momentos agradáveis, intermináveis cervejadas e por me aturarem nesses quatro anos.

Valeu!

Epígrafe

"O que quer que possa fazer ou sonhe em fazer, comece-o. Há algo de genialidade, de poder e de magia na coragem."
(Goethe)

"Nosso cérebro é o melhor brinquedo já criado: nele se encontram todos os segredos, inclusive o da felicidade."
(Charles Chaplin)

"Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm."
(Winston Churchill)

"A adversidade leva alguns a serem vencidos, e outros a baterem recordes."
(*Willian Arthur Ward)*

"O investimento em conhecimento é aquele que traz os maiores retornos."
(*Benjamin Franklin)*

"Sucesso é a realização daquilo que esperamos de nós mesmos."
(Albert Herbert.)

Evoluir, sempre; acomodar-se, jamais!

RESUMO

A bovinocultura de corte apresenta importância e crescimento de destaque no agronegócio brasileiro, liderando desde 2004 as exportações mundiais de carne bovina. Algumas áreas podem e devem evoluir para que o Brasil se consolide como sinônimo de carne bovina segura, de alta qualidade e com produtos de alto valor agregado. Neste sentido, este trabalho propôs avaliar o uso do ultrassom de alta intensidade para reduzir a carga microbiana em derivado de carne bovina sem o uso de temperaturas extremas, necessárias no tratamento térmico convencional. Considerando que a tecnologia de ultrassom disponível está relativamente bem adaptada para alimentos fluidos, estudou-se o efeito letal do ultrassom de alta intensidade sob pressão (manossonicação – MS) e em combinação com temperatura e pressão (manotermossonicação - MTS) na redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina diluído. Os tratamentos variaram quanto à amplitude da onda gerada com intensidades de potência transferida ao meio variando entre 92 e 240 W (ou 4 W/ml e 10,4 W/ml), pressão entre 1,0 a 4,0 bar e temperatura entre 40 a 60^{o}C. Os resultados foram expressos em função do tempo para a redução de um ciclo logarítmico ou 90% da população inicial de microrganismos (valor D). Os tratamentos proporcionaram até 4 ciclos de redução logarítmica da *Listeria monocytogenes* no extrato de carne bovina. Os menores tempos de redução logarítmica obtidos foram D_{MS} de 1,12 minutos, determinado a 240 W (10,4 W/ml) e 3,5 bar, e D_{MTS} de 0,16 minutos a 162 W, 2,5 bar e 60ºC. A manotermossonicação mostrou forte influência da temperatura do tratamento, com 2 ciclos de redução logarítmica em 5 minutos a 40^{o}C e 4 ciclos em 40 segundos a 60^{o}C, demonstrando um efeito sinérgico significativo ao redor de 60% entre 50ºC e 60ºC. Nas condições operacionais utilizadas, a manossonicação e a manotermosonicação mostraram ser tratamentos eficazes para destruição da *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina.

Palavras-chave: Ultrassom, manossonicação, manotermossonicação, métodos não-convencionais, *Listeria monocytogenes*, extrato de carne bovina.

ABSTRACT

The beef cattle industry is an important sector of economic growth on Brazilian agribusiness, leading, since 2004, the world beef exports. Some areas can and should evolve to consolidate Brazil as a synonym of high quality safe beef and high value-added products. This research project proposed to evaluate the use of ultrasound to reduce microbial load on a beef by-product without the use of extreme temperatures, usually required in conventional thermal treatments. Considering that the ultrasound technology is relatively well adapted to fluid foods, the lethal effect of high intensity ultrasound under pressure (manosonication - MS) and temperature (manothermosonication - MTS) was investigated to reduce *Listeria monocytogenes* in diluted beef extract. The intensities of the treatments varied according to the amplitude of wave generated, at power level of energy transferred to the medium varying from 92 W and 240 W (or 4 W/ml and 10.4 W/ml), pressure from 1.0 to 4.0 bar, and in the temperature range of 40 to 60^{o}C. The results were expressed in terms of the time required for one log cycle reduction or 90% of the initial microorganism population reduction (D-value). The treatments resulted up to 4 log-cycles reduction of *Listeria monocytogenes* in beef extract. The shortest logarithmic reduction times obtained were D_{MS} of 1.12 minutes, determined at 240 W (10.4 W/ml) at 3.5 bar, and a D_{MTS} of 0.16 minutes at 162 W, 2.5 bar and 60ºC. The manothermosonication showed a strong influence of treatment temperature, with a 2-log cycle reduction in 5 minutes at 40^{o}C, and a 4-log cycle reduction in 40 seconds at 60^{o}C demonstrating a significant synergic effect around 60% between 50^{o}C and 60^{o}C. Within the experimental operational conditions used, the manosonication and manothermosonication showed to be effective treatments for the destruction of *Listeria monocytogenes* in beef extract.

Keywords: Ultrasound, manosonication, manothermosonication, non-conventional methods, *Listeria monocytogenes*, beef extract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Espectro de som 21

Figura 2 Algumas características da onda sônica 22

Figura 3 Posição e impulso da partícula para um único ciclo de onda. 26

Figura 4 Efeito dos ciclos (compressão e expansão) no tamanho das bolhas. 27

Figura 5 Esquema de uma célula bacteriana durante a cavitação 27

Figura 6 Fotografia de uma cavitação 28

Figura 7 Influência da amplitude do ultrassom na letalidade de tratamentos com manossonicação 32

Figura 8 Relação entre pressão e letalidade de tratamentos com manossonicação comparando 2 amplitudes. 34

Figura 9 Influência da temperatura na letalidade do tratamento MS 36

Figura 10 Sequência de preparação do meio de cultura 40

Figura 11 Diagrama esquemático do equipamento para tratamento com ultrassom. . . 44

Figura 12 Transdutor utilizado. 45

Figura 13 Detalhe do transdutor utilizado 46

Figura 14 Comportamento da temperatura nos experimentos de Manossonicação. . . 47

Figura 15 Temperatura de um experimento de Manotermossonicação (MTS) a 45ºC . 52

Figura 16 Perfil de temperatura nos experimentos sem refrigeração 53

Figura 17 Aparelho para determinação da resistência térmica 54

Figura 18 Variação da temperatura com a aplicação do ultrassom em água destilada a pressão de 4,5 bar e amplitude 2 56

Figura 19 Potência transferida em função da pressão e amplitude do ultrassom 57

Figura 20 Potência experimental versus potência calculada 57

Figura 21 Curvas de sobreviventes em função do tempo de tratamento da MS para as condições de pressão e amplitude aplicados 59

Figura 22 Valores DMS para a MS do extrato de carne desidratado 61

Figura 23 Influência da amplitude nos 3 níveis de pressão para o tratamento de MS do extrato de carne bovina desidratado 61

Figura 24 Influência da pressão nos 3 níveis de amplitude para o tratamento de MS do extrato de carne bovina desidratado 62

Figura 25 Curvas de sobreviventes em função do tempo de tratamento de MS para as condições de pressão e amplitude aplicados 63

Figura 26 Superfície de resposta obtida para o tratamento de MS do extrato de carne bovina concentrado 64

Figura 27 Qualidade do ajuste dos valores D_{MS} calculados pela Equação (18) a partir dos dados experimentais 65

Figura 28 Influência da pressão em uma mesma amplitude (4) 66

Figura 29 Influência da amplitude em uma mesma pressão (2,5 bar) 67

Figura 30 Efeito da concentração de sólidos no meio de tratamento na inativação do microrganismo 68

Figura 31 Valor D_{MS} em função da potência aplicada ao meio 68

Figura 32 Curvas de sobreviventes dos tratamentos de MTS em extrato de carne bovina desidratado nas diversas temperaturas 69

Figura 33 Comparação dos tratamentos com e sem refrigeração 71

Figura 34 Comparação entre sonda ultrassônica (a) nova; e as desgastadas pelos experimentos (b) MS; (c) MTS 71

Figura 35 Curvas de sobreviventes dos tratamentos térmicos em extrato de carne bovina desidratado nas diversas temperaturas 72

Figura 36 Comparação entre MS, MTS e Termorresistência 74

Figura 37 Porcentagem de sinergia entre calor e MS 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições de operação e leitura da amplitude 45

Tabela 2 Delineamento fatorial completo 2^3 para os tratamentos de MS para o extrato de carne bovina desidratado 49

Tabela 3 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para os tratamentos de MS em extrato de carne bovina concentrado 51

Tabela 4 Condições dos tratamentos de MTS realizados 52

Tabela 5 Condições operacionais utilizadas e potência 58

Tabela 6 Médias dos valores D_{MS} para os tratamentos de manossonicação em extrato de carne bovina desidratado 60

Tabela 7 Valores D_{MS} para os tratamentos de manossonicação em extrato de carne bovina concentrado 64

Tabela 8 Valores D_{MTS} para os tratamentos de manotermossonicação em extrato de carne bovina desidratado 70

Tabela 9 Valores D_T médios para a *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina desidratado diluído a 24% de sólidos totais 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Amplitude da onda sônica ou Porcentagem da amplitude máxima fornecida pelo gerador	[µm] [%]
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne	/
a_w	Atividade de água. Relação da pressão de vapor (da água) de um alimento com a pressão de vapor da água pura, a mesma temperatura.	/
C_p	Calor específico	[kJ/kg.K]
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo	/
D	Tempo necessário para reduzir a carga microbiana em um ciclo logarítmico	[min]
D_T	Tempo de tratamento térmico necessário para reduzir a carga microbiana em um ciclo logarítmico	[min]
D_{MS}	Tempo de manossonicação necessário para reduzir a carga microbiana em um ciclo logarítmico	[min]
D_{MTS}	Tempo de manotermosonicação necessário para reduzir a carga microbiana em um ciclo logarítmico	[min]
$\frac{dT}{dt}$	Variação de temperatura em um determinado tempo ou taxa de variação da temperatura	[ºC/s] ou [K/s]
E	Energia	[J]
E_a	Energia acústica	[J]
$\dot{E}_a$	Energia acústica por unidade de tempo (ou Potência)	[J/s] ou [W]
E_e	Energia elétrica	J

f	Freqüência da onda	[kHz]
I	Intensidade da onda	[W/cm^2]
I_0	Intensidade inicial da onda	[W/cm^2]
m	Massa da amostra	[kg]
m/m	Massa / Massa	/
m/v	Massa / Volume	[kg/m^3]
MS	Manossonicação (Ultrassom de alta intensidade combinado com Pressão)	/
MTS	Manotermossonicação (Ultrassom de alta intensidade combinado com Pressão e Temperatura)	/
P	Pressão	[kPa ou bar]
pH	Potencial Hidrogênico	/
P_{ot}	Potência	[W]
Q	Calor gerado	[J/s] ou [W]
T	Temperatura	[ºC] ou [K]
TDT	*Thermal Death Time* (Tempo de mortalidade pelo calor)	[min]
UFC	Unidade Formadora de Colônia (CFU, em inglês)	/
v	Velocidade da onda sonora	[m/s]
x	Distância do ponto de tratamento até o gerador do ultrassom	[m]

z	Impedância acústica	[$kg/m^2.s^1$] (Rayl)
Z	Acréscimo de temperatura necessário para reduzir o tempo de tratamento em um ciclo logarítmico e manter os mesmos resultados de mortalidade microbiana	[ºC]
Z_{MS}	Acréscimo de potência necessária para reduzir o tempo de tratamento de manossonicação em um ciclo logarítmico e manter os mesmos resultados de mortalidade microbiana	[W]
α	Coeficiente de atenuação da amplitude	[m^{-1}]
λ	Comprimento da onda sonora	[µm]
ρ	Densidade	[kg/m^3]
ε	Eficiência do processo de geração e utilização da energia	/

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

2. OBJETIVO. 20

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21

3.1. PRINCÍPIOS DO ULTRASSOM 21

3.1.1. Características das ondas 21

3.1.2. Ultrassom de baixa e alta intensidade. 24

3.1.3. Mecanismo de ação do ultrassom para a destruição microbiana. 25

3.1.4. Instrumentação. 29

3.2. APLICAÇÕES DO ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE NA DESTRUIÇÃO DE MICRORGANISMOS 31

4. MATERIAIS E MÉTODOS 38

4.1. EXTRATO DE CARNE BOVINA 38

4.1.1. Extrato de carne bovina desidratado. 38

4.1.2. Extrato de carne bovina concentrado. 39

4.1.3. Solução tampão 39

4.2. MICRORGANISMO: *Listeria monocytogenes*. 39

4.3. MEIOS DE CULTURA 40

4.3.1. TSAYE – Agar de soja tripisina enriquecido com extrato de levedura. 41

4.3.2. TSBYE – Caldo de soja tripisina enriquecido com extrato de levedura. 41

4.3.3. Água de peptona. 41

4.4. DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA TRANSFERIDA PELO ULTRASSOM . 42

4.5. TRATAMENTO COM ULTRASSOM SOB PRESSÃO (MANOSSONICAÇÃO - MS). 43

4.5.1. Planejamento experimental para o tratamento de manossonicação em extrato de carne bovina desidratado 48

4.5.2. Planejamento experimental para o tratamento de manossonicação em extrato de carne bovina concentrado. 50

4.6. TRATAMENTO COM ULTRASSOM SOB PRESSÃO COMBINADO COM EFEITO DA TEMPERATURA (MANOTERMOSSONICAÇÃO - MTS) 51

4.6.1. Manotermossonicação (MTS) com o controle de temperatura . 51

4.6.2. Manotermossonicação (MTS) sem o controle de temperatura . 53

4.7. RESISTÊNCIA TÉRMICA DO MICRORGANISMO 53

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 56

5.1. DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA TRANSFERIDA PELO ULTRASSOM . 56

5.2. MANOSSONICAÇÃO APLICADA AO EXTRATO DE CARNE BOVINA DESIDRATADO. 58

5.3. MANOSSONICAÇÃO APLICADA AO EXTRATO DE CARNE BOVINA CONCENTRADO. 62

5.4. TRATAMENTO POR ULTRASSOM SOB PRESSÃO COM ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA - MANOTERMOSSONICAÇÃO (MTS) 69

5.4.1. Manotermossonicação (MTS) com o controle de temperatura. . 69

5.4.2. Manotermossonicação (MTS) sem o controle de temperatura. . 70

5.5. RESISTÊNCIA TÉRMICA DO MICRORGANISMO. 72

5.6. COMPARAÇÃO ENTRE MS, MTS e TERMORRESISTÊNCIA. 73

6. CONCLUSÕES. 75

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 77

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte apresenta uma importância e um crescimento de destaque no agronegócio brasileiro. Desde 2004, o Brasil lidera as exportações mundiais de carne bovina e esse negócio tende a crescer ainda mais, pois a maior multinacional do setor é de origem brasileira, o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo e área suficiente para o seu crescimento com custos relativamente baixos e ainda, um corpo técnico preparado e experiente nas áreas de produção, sanidade animal e industrialização. Ainda assim, algumas áreas podem e devem evoluir para que o Brasil se consolide como sinônimo de carne bovina segura, de alta qualidade e com produtos de alto valor agregado, fugindo da histórica *commodity* que tanto limita o crescimento do país.

Para se ter uma melhor ideia da importância desse negócio, dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2010) mostram que a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R$ 50 bilhões/ano e oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos. Desde 2004 o Brasil lidera o ranking dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de cerca de 2 milhões de toneladas equivalente carcaça e receita cambial de US$ 5,3 bilhões ao ano. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países. O rebanho bovino brasileiro, com cerca de 209 milhões de cabeças e em contínuo crescimento, tem apresentado avanços nos índices de produtividade. O custo de produção do bovino brasileiro se situa entre os mais baixos do mundo, o que traz uma grande vantagem competitiva. Transformar a carne brasileira em produto destacado, com valor agregado, e não em mais uma *commodity*, é um dos grandes desafios que a cadeia do agronegócio da bovinocultura tem que enfrentar. Manter o país como líder desse mercado, um desafio ainda maior (ABIEC, 2010).

A bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* foi estudada por ser um microrganismo de referência no setor cárneo e ao mesmo tempo uma das mais resistentes, tanto ao calor como a tratamentos de manossonicação (ARROYO et al.,

2011). A mesma já foi isolada em diferentes surtos de toxinfecção alimentar, em alimentos pasteurizados, processados, ambientes de armazenamento e em produtos cárneos, consequência de sua resistência a diferentes ambientes e condições de temperatura. *Listeria monocytogenes,* como uma bactéria patogênica presente nos alimentos, tem uma importância significativa na saúde pública com sérios impactos econômicos. A infecção em humanos pode resultar em estados clínicos severos com alta mortalidade (POSFAY-BARBE; WALD, 2004).

O calor, tradicionalmente utilizado como meio de reduzir a carga microbiana em alimentos através do branqueamento, pasteurização ou esterilização, pode danificar as propriedades organolépticas e os valores nutricionais dos alimentos. Para evitar os efeitos indesejados do calor, esforços têm sido feitos para desenvolver novos métodos de preservação dos alimentos. Ultra-alta pressão, pulsos elétricos, ondas ultrassônicas sob pressão (manossonicação, MS) e ondas ultrassônicas sob pressão combinadas com altas temperaturas (manotermossonicação, MTS) são talvez os métodos mais promissores atualmente investigados (ALLIGER, 1975; RASO et al., 1998b; MAÑAS et al., 2000a,b; ARROYO et al., 2011).

O ultrassom de alta intensidade é considerado uma tecnologia emergente e promissora para o processamento industrial de alimentos. O uso do ultrassom no processamento cria metodologias inovadoras e interessantes, as quais são geralmente complementares às técnicas clássicas. Várias áreas têm sido identificadas com grande potencial para futuros desenvolvimentos: cristalização, dispersão, desgaseificação, secagem, extração, filtração, emulsificação, cozimento, congelamento, homogeneização, amaciamento de carnes e esterilização. Existe uma vasta possibilidade para novas pesquisas em termos do uso do ultrassom no processamento de alimentos para aplicações industriais. As vantagens do ultrassom sobre a pasteurização pelo calor incluem: redução das perdas nutricionais, de sabor e aroma, melhor homogeneidade do tratamento e economia de energia (SALA et al., 1999; DOLATOWSKI; STADNIK; STASIAK, 2007; TORLEY; BHANDARI, 2007).

Várias pesquisas apontam para o uso do ultrassom como um método alternativo ao tratamento tradicional pelo calor, com vantagens físico-químicas, sensoriais, economia de energia, homogeneidade do tratamento etc. Raso e outros (1998a) mostraram que o ultrassom combinado com a pressão (manossonicação) é um tratamento mais eficiente. O estudo dessa aplicação em um derivado de carne bovina se justifica pelo alto valor do setor cárneo e significativa contribuição na geração de empregos, na balança comercial e na economia do país como um todo. O desafio está em identificar as condições necessárias para maximizar o efeito da manossonicação e vencer as resistências impostas por sua estrutura e quantidade de sólidos solúveis presentes.

Mason, Paniwnyk e Lorimer (1996), Pohlman e outros (1997a), Lyng, Allen e McKenna (1998), Got e outros (1999), FDA (2000), Piyasena, Mohareb e McKellar (2003), Jayasooriya e outros (2004) e Dolatowski, Stadnik e Stasiak (2007) afirmam que a tecnologia do processamento pelo ultrassom aplicada aos alimentos está em sua infância e requer mais pesquisas na área para melhor compreender os seus efeitos.

Este trabalho pesquisou pela primeira vez os efeitos do ultrassom de alta intensidade em extrato de carne bovina e em condições de potência superiores às anteriormente estudadas. Para isso foram utilizados os equipamentos da Universidade de Zaragoza, situada na capital da comunidade autônoma de Aragón, Espanha.

2 OBJETIVO

Esse trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do ultrassom de alta intensidade combinado com a pressão e a temperatura para redução da carga microbiana em extrato de carne bovina. Mais especificamente, o projeto deve responder às seguintes perguntas: O ultrassom de alta intensidade sob efeitos da pressão é um método eficaz para a redução de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina? Em quais condições de amplitude do ultrassom, pressão e temperatura obtêm-se melhores resultados na redução da *Listeria*?

As hipóteses levantadas foram:

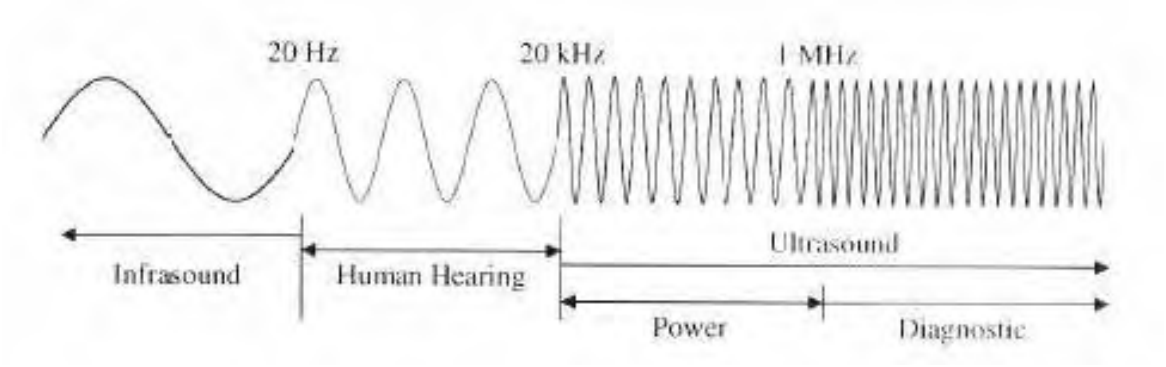
1) A aplicação do ultrassom reduz de maneira significativa a população de *Listeria monocytogenes* no extrato de carne bovina;
2) A manossonicação é capaz de reduzir ao menos 2 ciclos logarítmicos da população de *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina;
3) O efeito letal do tratamento com ultrassom aumenta com o aumento da amplitude da onda de ultrassom no extrato de carne bovina;
4) O efeito letal do tratamento com ultrassom aumenta com o aumento da pressão do meio de tratamento no extrato de carne bovina;
5) Existe influência significativa da amplitude (ou potência) de aplicação do ultrassom, combinado com pressão e temperatura (manotermossonicação) no efeito letal do tratamento no extrato de carne bovina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRINCÍPIOS DO ULTRASSOM

Ondas de ultrassom são similares às ondas sonoras, apenas sua frequência é muito alta para ser percebida pelo ouvido humano. A transmissão do som ocorre devido a variações locais de pressão dadas por vibrações de partículas em torno de um ponto de equilíbrio. Variam ao longo do tempo e do espaço, dando origem à onda que se propaga no meio, com a energia de movimento sendo transmitida sem a transferência de matéria. A faixa de frequência percebida pelos humanos é de 20 Hz a 16 kHz. A partir de 20 kHz tem-se o ultrassom. O ultrassom tem as mesmas propriedades das ondas de som, como refração, absorção, interferência, propagação multi-direcional e pode ser propagado através de sólidos, líquidos e gases (POVEY; MCCLEMENTS, 1988; MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996).

Figura 1 - Espectro de som.



Fonte: FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011.

3.1.1 Características das ondas

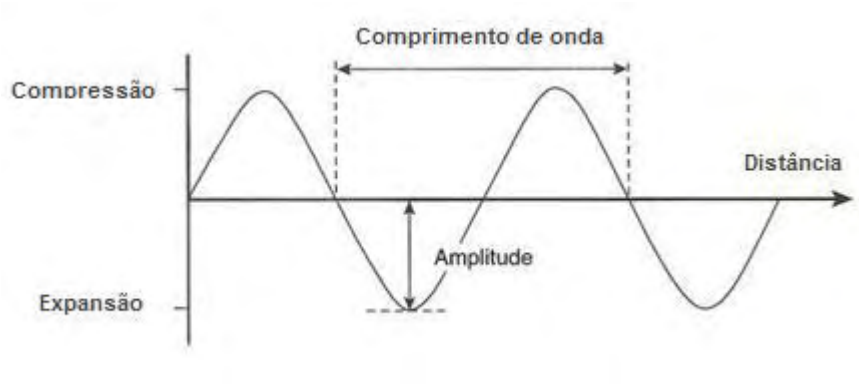
Os parâmetros fundamentais que estão relacionados com as ondas de ultrassom são velocidade (v), comprimento de onda (λ), freqüência (f), amplitude (A), impedância (z) e intensidade (I).

Velocidade do som (*v)* é a taxa de propagação da onda sonora no meio e está relacionada com o comprimento de onda (*λ*) e a sua frequência (*f)* conforme a Equação (1). A velocidade do som depende das propriedades físicas do meio através do qual as ondas se propagam.

$$v = \lambda f \tag{1}$$

O comprimento de onda é a distância entre dois picos adjacentes ou o seu período espacial (Figura 2), enquanto que a frequência refere-se ao número de ondas que passam por um ponto em uma unidade de tempo e reflete a vibração do gerador da onda.

Figura 2 - Algumas características da onda sônica.



A amplitude de vibração acústica (A) é a "altura" da onda, relacionada com seu pico de pressão. Determina a força da mesma, e está relacionada com a energia (E) contida na onda conforme nos mostra a Equação (2). A amplitude refere-se ao impulso dado pela fonte geradora do ultrassom, do receptor ou do meio através do qual a onda se propaga.

$$E \alpha A^2 \tag{2}$$

Intensidade da onda sonora é a medida do fluxo de energia acústica através de uma unidade de área do meio em uma unidade de tempo. Ao passar através de

qualquer meio ou tecido biológico, a intensidade das ondas de som diminui com a distância devido à características de propagação multi-direcional das ondas, pela absorção de parte da energia pelo material e pela reflexão em interfaces. Esse fenômeno de reflexão e transmissão é causado pelas interfaces entre materiais com diferentes impedâncias acústicas (z), conforme Equação (3). A heterogeneidade de um material pode aumentar significativamente a atenuação quando houver grandes diferenças, entre outras coisas, nas densidades (ρ) entre dois materiais.

$$z = \rho v \tag{3}$$

A quantidade ρv é também conhecida como impedância característica. É importante casar a impedância do transdutor com o circuito elétrico (fonte de energia) e a amostra, caso contrário a energia não será transmitida de forma eficaz para a amostra. Quando as impedâncias não casam ocorre a reflexão da onda. Para um melhor entendimento, consideremos um copo de vidro com o espaço livre através do qual a luz se propaga. Assim, grande parte da luz atravessa o vidro. Mas se o copo for de alumínio, a maior parte da luz será refletida. Um processo similar acontece em acústica (POVEY, 1997).

A diminuição da intensidade segue um padrão exponencial que depende da intensidade inicial (I_0), distância a partir do gerador do ultrassom (x) e o coeficiente de atenuação da amplitude do material (α), conforme a Equação (4) (POVEY; MCCLEMENTS, 1988; TORLEY; BHANDARI, 2007).

$$I = I_0 \, e^{-2\alpha x} \tag{4}$$

A energia absorvida é convertida em calor causando um aumento da temperatura. A produção de calor (Q) está relacionada com a intensidade do som (I) e o coeficiente de atenuação da amplitude do material (α), de acordo com a Equação (5).

$$Q = 2\alpha I \quad (5)$$

O coeficiente de atenuação da amplitude varia entre materiais e com a freqüência do som. A atenuação diminui com a diminuição da frequência (GOSS; JOHNSTON; DUNN, 1978; TORLEY; BHANDARI, 2007).

Experimentalmente, o aumento da temperatura pode ser utilizado para determinar a fração da energia elétrica (E_e), originalmente aplicada ao transdutor, que é convertida em energia acústica (E_a) e posteriormente em calor. Este método é conhecido como determinação calorimétrica da energia acústica e é determinado por um balanço de energia simples dado pela Equação (6) (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

$$\dot{E_a} = mC_p \frac{dT}{dt} \quad (6)$$

onde $\dot{E}_a$ é a energia acústica por unidade de tempo (Potência) que entra no sistema em Watts, m é a massa da amostra, C_p é o calor específico da amostra e $\frac{dT}{dt}$ é a variação de temperatura em um determinado tempo.

Assim, a eficiência do processo de geração e utilização dessa energia é dada por:

$$\mathcal{E} = E_a / E_e \quad (7)$$

3.1.2 Ultrassom de baixa e alta intensidade

O ultrassom de baixa intensidade e alta frequência (< 1 W/cm^2; > 100 kHz) normalmente é usado para monitoramento. É utilizado na medicina e em uma ampla gama de aplicações com alimentos, utilizando parâmetros de velocidade, atenuação

da onda, impedância ou parâmetros relacionados para medir características de distância, composição, mudança de fase e distribuição do tamanho das partículas.

O ultrassom de alta intensidade e baixa frequência (1-1000 W/cm^2; 20-100 kHz) normalmente é utilizado para alterar as propriedades do meio ou influenciar o progresso de um processo. Isto acontece através de efeitos físicos, químicos e mecânicos, como destruição microbiana, cristalização, dispersão e desgaseificação de líquidos, homogeneização, extração, filtração, emulsificação, aumento da taxa de congelamento, cozimento, secagem, maturação de carnes e amadurecimento de vinhos, melhora na maciez da carne, inativação de enzimas, entre outros. O ultrassom pode afetar as propriedades dos alimentos, entretanto, é comum utilizá-lo em conjunto com outro processo tecnológico para melhorar a sua eficiência (SALA et al., 1999; DOLATOWSKI; STADNIK; STASIAK, 2007; TORLEY; BHANDARI, 2007).

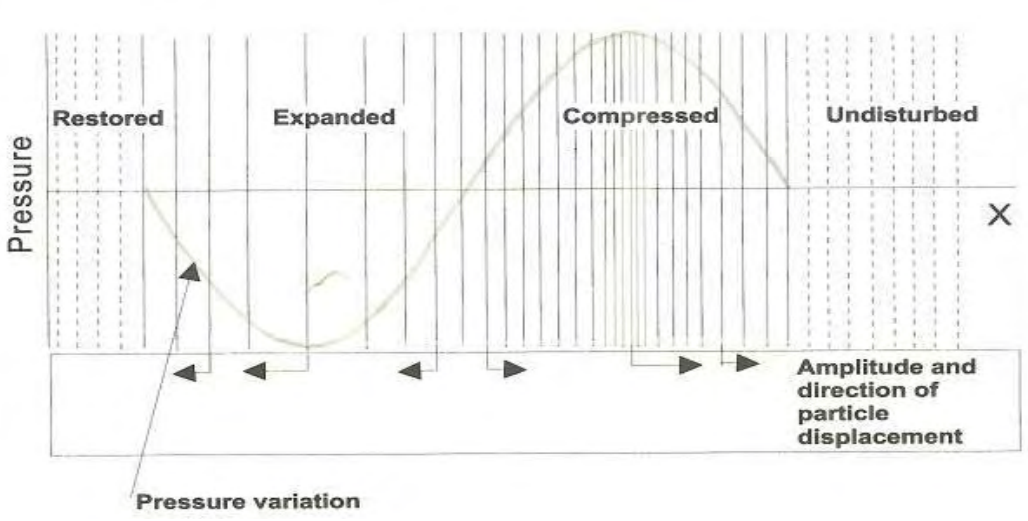
3.1.3 Mecanismo de ação do ultrassom para a destruição microbiana

Pesquisas com ultrassom como um método potencial de inativação microbiana começaram com os pesquisadores Harvey e Loomis (1929) e posteriormente nos anos de 1960, após a verificação de que as ondas de som dos sonares dos submarinos de guerra matavam os peixes. Nos anos seguintes várias pesquisas com os efeitos do ultrassom apareceram, primeiro explorando altas freqüências, depois altas intensidades; isso em paralelo com o desenvolvimento de pequenos equipamentos que permitissem testes nessas condições (ALLIGER, 1975; SALA et al., 1999; PIYASENA; MOHAREB; MCKELLAR, 2003).

O efeito das ondas de ultrassom na inativação dos microrganismos é entendido como uma conseqüência da ruptura mecânica das células, causada por um fenômeno denominado “cavitação transiente”. Ondas de ultrassom são geradas através de vibrações mecânicas em frequências a partir de 20 kHz. Essas ondas se propagam no meio causando a cavitação em líquidos ou tecidos biológicos. As

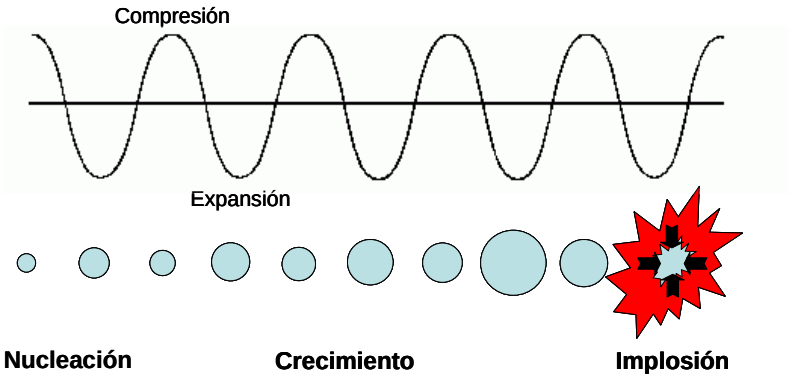
ondas se propagam alternando ciclos de compressão e expansão (Figura 3). Após alguns desses ciclos, mais precisamente no ciclo de expansão, bolhas são geradas no líquido devido ao abaixamento local da pressão o que leva a sua vaporização. A seguir, as bolhas aumentam de tamanho até atingirem um limite crítico, onde a energia do ultrassom não é mais capaz de manter a pressão de vapor estável dentro das bolhas. Como consequência, o vapor condensa e as bolhas implodem (Figura 4). Assim, ondas de choque muito intensas são formadas as quais fazem com que as moléculas do líquido se choquem violentamente, gerando altas pressões e temperaturas locais. Essas intensas ondas de choque são as responsáveis pela ruptura das células, e consequentemente, pela inativação ou destruição das mesmas (Figura 5). A cavitação é então definida como o fenômeno combinado de formação, crescimento e subsequente colapso das microbolhas ou cavidades dentro de um intervalo de tempo extremamente pequeno (microssegundos), liberando grandes magnitudes de energia locais (Figura 6). Densidades energéticas muito altas (grande energia liberada por unidade de volume) são obtidas localmente, resultando em altas pressões (da ordem de 100 a 5.000 bars) e temperaturas (1.000 a 10.000K) (SUSLICK, 1990; FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

Figura 3 - Posição e impulso da partícula e variação espacial da pressão versus posição (x) para um único ciclo de onda em um meio fluido.



Fonte: Adaptado de Pierce (1981) e Povey (1997).

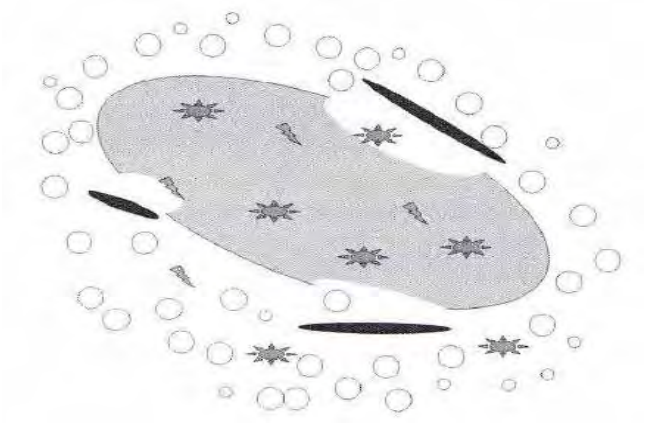
Figura 4 - Efeito dos ciclos de compressão e expansão no tamanho das bolhas.



Fonte: CONDÓN e outros, 2011.

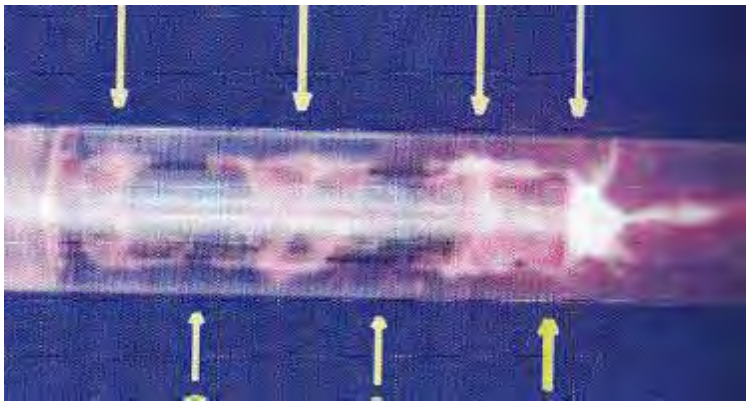
A intensidade da cavitação aumenta com a amplitude das ondas e com a pressão, mas diminui com a freqüência. Esse choque mecânico é sentido a uma distância de alguns micrometros. Esses princípios foram utilizados por vários anos em pesquisas sobre a ruptura celular através do ultrassom. Para a maioria dos autores, essas são as principais razões para o efeito letal do ultrassom de alta intensidade (ALLIGER, 1975; SCHERBA; WEIGEL; O´BRIEN, 1991; RASO et al., 1998a; SALA et al., 1999; MAÑAS et al., 2000b; JAYASOORIYA et al., 2004; DOLATOWSKI; STADNIK; STASIAK, 2007; TORLEY; BHANDARI, 2007; FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

Figura 5 -Esquema de uma célula bacteriana durante a cavitação mostrando o efeito letal do ultrassom através da formação de poros e rompimento da membrana celular



Fonte: FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011.

Figura 6 - Fotografia de uma cavitação.



Fonte: FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011.

Segundo Alliger (1975), a 20 kHz o tamanho de ressonância da bolha é de cerca de 150 micrometros e sendo maior, explode com uma força maior do que as bolhas menores formadas com maiores frequências. O tamanho das bolhas depende basicamente da frequência da onda. Amplitudes maiores produzem mais bolhas ao invés de bolhas maiores e, é claro, oferecendo mais força de colisão. Segundo o mesmo autor, com as características corretas e necessárias do meio e das ondas, toda célula pode ser “danificada” com o uso do ultrassom.

A vantagem da cavitação acústica está na sua habilidade de concentrar energia acústica em pequenos volumes. Isto resulta em temperaturas de milhares de Kelvin, pressões de GPa, acelerações locais na ordem de magnitude de 12 vezes a aceleração da gravidade, ondas de choque e emissão de fóton (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

3.1.4 Instrumentação

Equipamentos de aplicação do ultrassom basicamente consistem em um gerador de pulsos elétricos, um transdutor e um emissor, o qual fisicamente envia as ondas ultrassônicas para o meio a ser tratado (POVEY; MASON, 1998).

Os transdutores eletroacústicos se baseiam em fenômenos eletrostáticos característicos de certos materiais com propriedades piezoelétricas que se deformam e vibram quando excitados eletricamente.

Todo sistema ultrassônico inclui um transdutor como elemento central cujo papel é gerar as ondas de ultrassom. O transdutor converte energia elétrica em energia mecânica através da vibração dos materiais piezoelétricos (POVEY; MASON, 1998).

O propósito do emissor é acoplar a onda de ultrassom, do transdutor ao meio, e também serve para amplificar as vibrações ultrassônicas. As duas formas mais comuns são os do tipo banho e os do tipo amplificador acústico (formato cônico). O tipo amplificador acústico geralmente requer uma ponta aderida a si, também conhecida como sonotrodo (POVEY; MASON, 1998).

Em sistemas do tipo amplificador físico, este é inserido ao transdutor para amplificar o sinal e trazê-lo à amostra e o seu formato determina a amplificação. O sonotrodo, geralmente um pequeno dispositivo ligado ao amplificador, amplifica ainda mais as vibrações mecânicas e emite a onda ultrassônica no meio. A grande diferença entre equipamentos utilizados em laboratórios e os utilizados comercialmente em plantas processadoras é o tipo de emissor. Emissores mais robustos que não se desgastam tanto após várias horas de utilização são necessários na indústria de alimentos (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

O tipo de equipamento mais indicado para se trabalhar com alta intensidade consiste em um emissor de metal em formato de amplificador físico (cônico) acoplado ao transdutor de ultrassom com o emissor de metal utilizado para amplificar a vibração produzida pelo material piezoelétrico no transdutor. Um desenho apropriado do emissor aumentará a amplitude da vibração na face do mesmo. Sistemas deste tipo tem a vantagem de poderem ser colocados diretamente no material a ser processado; sua potência pode ser controlada para produzir ondas de alta intensidade de centenas de W/cm^2 (JAYASOORIYA et al., 2004; TORLEY; BHANDARI, 2007).

A potência do tratamento resulta da passagem da onda ultrassônica pelo meio e é determinada pela potência (ou força) da onda de ultrassom. Estudos mostram que mais potência causa maiores alterações no material, ao menos até um limite máximo, dependendo das propriedades do meio em questão. A potência está relacionada com a energia e atualmente a maioria dos pesquisadores prefere medir a intensidade de energia efetivamente enviada ao meio. Assim, o tempo de tratamento em segundos pode ser multiplicado pela sua potência para obter a energia em Joules que passa pelo meio (MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996; PAGÁN et al., 1999b; POVEY; MASON, 1998; FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011; ARROYO et al., 2012).

Para gerar e aplicar eficientemente o ultrassom de alta intensidade em diferentes meios é necessário o desenho e o desenvolvimento de transdutores de alta potência especificamente adaptados a cada meio. Meios fluidos, particularmente gases, apresentam baixa impedância específica e alta absorção acústica. Portanto, de forma a obter uma transmissão eficiente de energia, é necessário conseguir um bom casamento de impedâncias entre o transdutor e o meio, uma grande amplitude de vibração e feixes altamente direcionados e focados para a concentração de energia.

Atualmente, a maioria dos transdutores de alta intensidade comerciais estão baseados no tipo clássico de Langevin (1912) os quais possuem várias limitações.

Portanto, uma nova tecnologia de transdutores faz-se necessária onde os pontos essenciais a serem considerados são, entre outros, aumento da capacidade energética, maior eficiência e aumento da área de trabalho. O recente desenvolvimento de novas tecnologias baseadas em um transdutor de prato escalonado (GALLEGO-JUÁREZ et al., 2010), o qual implementa alta capacidade energética, eficiência e direção abre novas possibilidades para a aplicação do ultrassom (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

3.2 APLICAÇÕES DO ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE NA DESTRUIÇÃO DE MICRORGANISMOS

Pesquisas têm sido realizadas para avaliar o efeito do ultrassom na letalidade dos microrganismos. Elas demonstram que os microrganismos não são imunes ao ultrassom, mas que esse efeito varia conforme o tipo de microrganismo. Esses estudos identificaram também que o efeito do ultrassom sozinho é limitado, mas que se potencializa quando utilizado sob pressão (manossonicação, MS). A seguir são apresentados os casos de maior interesse para a presente investigação.

Ao estudar os efeitos da manossonicação sobre o microrganismo *Yersinia enterocolitica* em solução tampão de pH 7, Raso e outros (1998a) verificaram que o modelo exponencial dado pela Equação (8) representava satisfatoriamente a curva de redução decimal do microrganismo.

$$\log N_t = \log N_0 - (1/D_{MS})\, t \qquad (8)$$

onde:

N_t = número de células sobreviventes após t minutos de tratamento
N_0 = número inicial de células
D_{MS} = tempo de redução decimal sob manossonicação

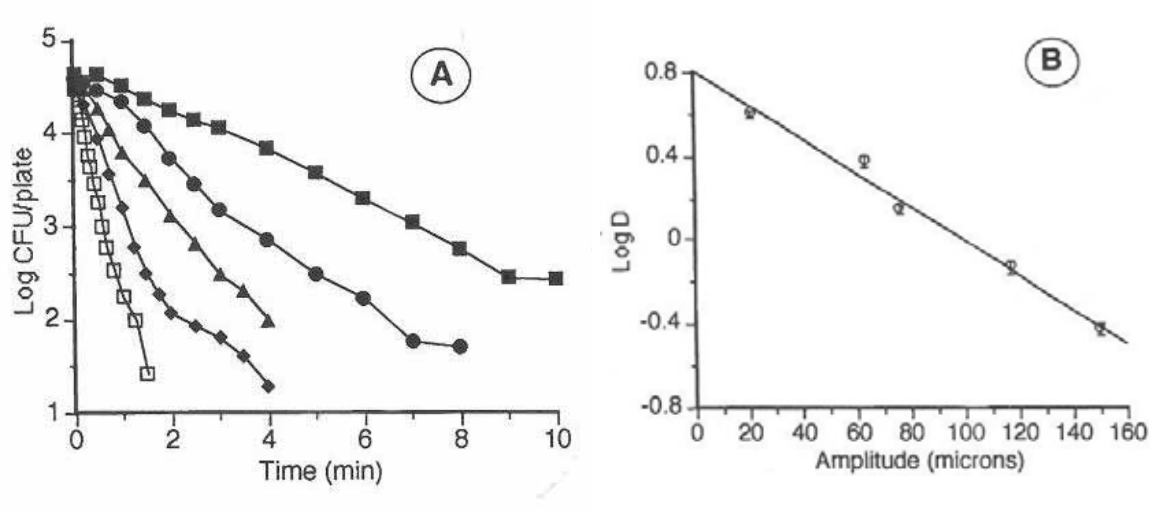
De modo a melhor ilustrar os resultados dessa pesquisa, a Figura 7A mostra as curvas de sobrevivência da *Y. enterocolitica* submetida à manossonicação em

diferentes amplitudes de onda a 200 kPa de pressão e 30°C de temperatura. A Figura 7B mostra a relação entre amplitude e valores D obtidos. A letalidade dos tratamentos aumentou exponencialmente com a amplitude (A) de acordo com a Equação (9).

$$\log D_{MS} = 0{,}806 - 0{,}008\ (A) \qquad (9)$$

Com os esporos do *Bacillus subtilis*, Raso e outros (1998b) obtiveram resultados semelhantes: a amplitude representou o fator principal de influência na inativação dos esporos, com uma relação exponencial entre amplitude e número de sobreviventes.

Figura 7 - Influência da amplitude do ultrassom na letalidade de tratamentos com manossonicação. (A) Curvas de sobrevivência da *Y. enterocolitica* submetida a MS a 200kPa, 30°C e 20kHz, nas seguintes amplitudes: 21 (■), 63 (●), 76 (▲), 117 (♦) e 150 (□) μm. (B) Relação entre amplitude do ultrassom e letalidade da manossonicação (log D).



Fonte: RASO e outros, 1998a.

Pagán e outros (1999a), ao estudar a influência da MS em quatro diferentes microrganismos (*Streptococcus faecium, Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis e Aeromonas hydrophila*) confirmaram que a letalidade da MS aumentava

exponencialmente com a amplitude (A) e encontraram a relação dada pela Equação (10).

$$\log D_{MS} = \log D_0 - 0{,}0091\ (A - 62) \qquad (10)$$

onde:

D_0 = tempo de redução decimal da MS a 62 µm e 40°C

Pagán e outros (1999a) verificaram também que, ao contrário da taxa de inativação pelo calor que variava consideravelmente conforme a resistência térmica do microrganismo estudado, a taxa da inativação pela MS era muito mais uniforme, ou seja, microrganimos mais termo-tolerantes, não conseguiam a mesma resistência quando submetidos à MS. Para a *Listeria monocytogenes*, o valor D_{MS} encontrado foi de 1,5 minutos em solução tampão com pH 7, amplitude 117 µm, pressão 200kPa e a 40°C. Os autores verificaram que a taxa de inativação da MS (117 µm e 40°C) aumentou com o aumento da pressão para a qual propuseram a seguinte relação:

$$\log D_{MS} = \log D_0 - 0{,}0026\ (P) + 2{,}2 \times 10^{-6}\ (P^2) \qquad (11)$$

onde:

D_{MS} = tempo de redução decimal da MS a 117 µm de amplitude e 40°C

D_0 = tempo de redução decimal da MS a 117 µm de amplitude e 40°C a pressão atmosférica

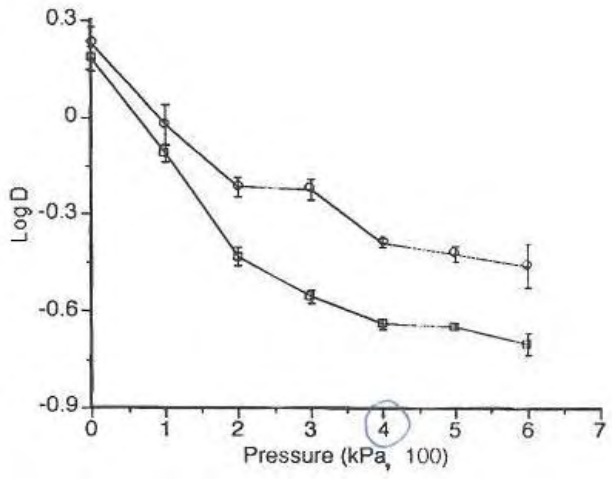
P = pressão (kPa)

Mañas e outros (2000b), ao estudarem três diferentes cepas de *Salmonella,* confirmaram que as taxas de letalidade da MS seguiam satisfatoriamente as Equações (10) e (11) e chegaram a conclusões ainda mais contundentes quanto à uniformidade dos tratamentos. Eles observaram que as três cepas de *Salmonella* estudadas, quando submetidas ao calor em diferentes meios, tinham sensibilidade (ou resistência térmica) bastante diferentes umas das outras. Diferentemente da resistência ao calor, a resistência à MS (117 µm, 200 kPa e temperatura ambiente)

das cepas era muito parecida e não era influenciada pelo meio; informação confirmada por Álvarez e outros (2003, 2006) e posteriormente por Arroyo e outros (2011) com o microrganismo *Cronobacter sakazakii*. Nesse mesmo trabalho, ao comparar a resistência a MS de diferentes microrganismos, Arroyo e outros encontraram um valor D_{MS} de 0,86 minutos para a *Listeria monocytogenes* (117 µm, 200 kPa, 35 °C). Esses resultados sugerem que os mecanismos de inativação pelo calor e pela MS são diferentes e mostram mais uma vantagem de se utilizar a MS em relação à pasteurização pelo calor. Enquanto a segurança alimentar assegurada por tratamentos térmicos depende da composição dos alimentos e da cepa da *Salmonella* presente, à assegurada pela MS seria a mesma, mesmo se a cepa da *Salmonella* ou a composição do alimento mudasse.

A influência da pressão na letalidade das ondas de ultrassom a 117 e a 150 µm de amplitude também pode ser vista no trabalho de Raso e outros (1998a) com a *Y. enterocolitica* mostrada na Figura 8. A 150 µm, o aumento na pressão de 0 para 300 kPa reduziu o D_{MS} de 1,5 para 0,28 minutos. A relação entre amplitude e pressão também é ilustrada nessa figura. Enquanto a 100 kPa o aumento da amplitude de 117 para 150 µm reduziu o D_{MS} de 0,95 para 0,77 minutos, a 300 kPa esse aumento reduziu o D_{MS} de 0,60 para 0,28 minutos.

Figura 8 - Relação entre pressão e letalidade de tratamentos com manossonicação (log D) comparando 2 amplitudes: 117 (○) e 150 (□) µm.



Fonte: RASO e outros, 1998a.

Este mesmo trabalho identificou que à temperatura ambiente e pressão atmosférica, o efeito letal do ultrassom em microrganismos é pequeno. Ao aumentarmos a pressão, a letalidade do ultrassom aumenta drasticamente. A 30°C e com amplitude de onda de 150 µm, o valor D passou de 1,5 minutos à pressão atmosférica, para 0,22 minutos à pressão de 600 kPa. Por outro lado, o aumento da amplitude de 21 µm a 150 µm reduziu o valor D exponencialmente (de 4 para 0,37 minutos). Aumentando-se a pressão de 0 a 600 kPa (à 30°C e 150 µm) resultaram na diminuição do valor D de 1,52 para 0,2 minutos. Entretanto, a magnitude da redução de D diminuiu com o aumento da pressão.

Em outro trabalho, Raso e outros (1998b) verificaram que a manossonicação a 20 kHz, 150 µm e 500 kPa por 12 minutos proporcionou máximo efeito de letalidade sobre esporos de *B. subtilis*; aumentos da amplitude e da pressão resultaram em um aumento da letalidade, entretanto, aumentos da pressão acima de 500 kPa não resultaram em maior inativação microbiana.

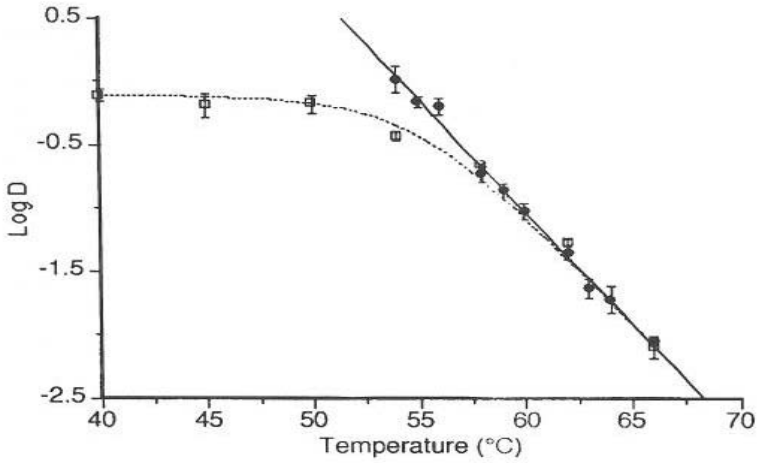
A contribuição do calor e da manossonicação no efeito letal da manotermossonicação (MTS), pode ser deduzida da Figura 9, resultado do trabalho de Raso e outros (1998a). A inativação através do tratamento por MS foi resultado de um único mecanismo, a ruptura mecânica das células. Diferentemente da MS, a letalidade da MTS parece ser resultado de dois mecanismos diferentes atuando de forma independente; um sendo o calor e o outro a MS. O efeito letal da MTS seria o resultado da soma dos efeitos da MS e do calor (RASO et al., 1998a; MAÑAS et al., 2000b).

Outros trabalhos indicaram que em certas condições pode ocorrer sinergia entre a MS e o calor dependendo do tipo de microrganismo (PAGÁN et al, 1999a), da temperatura do meio (RASO et al., 1998; PAGÁN et al., 1999c) e da atividade de água do meio (ÁLVAREZ et al., 2003, 2006), no entanto, essa sinergia aparece apenas em temperaturas a partir de 50°C, já começando a trazer os efeitos indesejados do calor consigo.

Na Figura 9, a linha reta representa o efeito do tratamento térmico enquanto que a linha pontilhada é a curva de inativação da manotermossonicação modelada utilizando a Equação (12).

$$D_{MTS} = (D_T\ D_{MS})/(D_T + D_{MS}) \quad (12)$$

Figura 9 - Influência da temperatura na letalidade do tratamento MS. Valores apenas do tratamento térmico (●) e da MS (□) (117 µm, 200 kPa e 20 kHz).



Fonte: RASO e outros, 1998a.

Como pode ser observado na Figura 9, o valor D para a *Y. enterocolitica* submetida à MTS foi praticamente o mesmo, independente da temperatura até valores próximos a 50°C. De 50°C até 58°C, os valores de D diminuíram rapidamente e foram sempre menores que os valores de D do tratamento térmico sozinho à mesma temperatura. Em temperaturas maiores que 58°C, os valores de D do tratamento térmico se igualam aos valores da MTS. Ou seja, até 50°C, o valor D da MS foi praticamente constante porque nesta faixa a taxa de inativação do ultrassom sob pressão não foi influenciada pela temperatura e porque nessa faixa de temperatura a letalidade do calor é desprezível. A diminuição dos valores de D a temperaturas maiores que 50°C seriam apenas função do aumento da letalidade pelo calor devido ao aumento da temperatura. Este aumento da letalidade pelo calor

tornaria, a 58°C, a letalidade da MS desprezível. À temperaturas maiores que 58°C, os valores D da MTS e do calor se igualam, ou seja, a essas temperaturas o efeito de inativação microbiana é apenas devido ao calor (RASO et al., 1998a). Álvarez e outros (2003, 2006) obtiveram os mesmos resultados com *Salmonella*, verificando, no entanto, que em meios com menor atividade de água (a_w) essa faixa seria mais ampla (50°C - 62°C).

Essa é a razão pela qual esse trabalho se concentrou mais no estudo da manossonicação do que da manotermossonicação. As taxas das reações envolvendo ultrassom são reduzidas com o aumento da temperatura, pois, (i) temperaturas mais altas resultam no aumento da pressão de vapor da água na bolha de cavitação, o que faz com que o calapso das bolhas seja menos efetivo e, (ii) a uma temperatura maior, o número de bolhas formadas e portanto, o número de colapsos devido à cavitação para liberar energia será menor (SALA et al., 1999). Raso e outros (1999) confirmaram no mesmo ano que a energia transferida pelo ultrassom diminuía com o aumento da temperatura e, por outro lado, com o aumento da viscosidade do meio, a cavitação é mais dificilmente induzida, no entanto, o calapso das bolhas formadas é muito mais violento.

Em todas as pesquisas citadas neste capítulo, a faixa de potência (combinação de pressão e amplitude) do ultrassom utilizada variou de 25 a 150 W, e nessa faixa mostrou-se que, quanto maior a potência maiores os efeitos do ultrassom. Assim esse trabalho propôs o estudo de potências em uma faixa superior, de 92 a 240 W.

Modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para descrever a resistência de diferentes bactérias a manossonicação. Dr. Javier Raso e sua equipe de pesquisa da Universidade de Zaragoza, na Espanha, são um dos pioneiros a combinar pressão, calor e ultrassom para conseguir a inativação microbiana. Começaram no final dos anos de 1990 e nos últimos 5 anos, as pesquisas com o ultrassom nessa universidade alcançaram uma importante relevância no campo da engenharia de alimentos mundo afora (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram investigados os efeitos do ultrassom de alta intensidade sob pressão para a redução de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 (Colección Española de Cultivos Tipo – equivalente a ATCC 15313) em extrato de carne bovina diluído em água.

4.1 EXTRATO DE CARNE BOVINA

Os ensaios para aplicação do ultrassom sob pressão foram realizados com o microrganismo *Listeria* inoculado em extrato de carne bovina diluído em água utilizando-se Extrato de Carne Bovina Desidratado, Extrato de Carne Bovina Concentrado e ainda uma solução tampão (fosfato dissódico e ácido cítrico diluídos em água) para a verificação do efeito da concentração de sólidos.

4.1.1 Extrato de carne bovina desidratado

Para os ensaios preliminares foi utilizado o extrato de carne desidratado, em pó, comercializado pela empresa Biolife (*Beef Extract Powder* – Milão, Itália). Inicialmente foram realizados ensaios com o extrato diluído a 12% m/m e posteriormente 24% m/m de sólidos totais para a análise do efeito da concentração de sólidos. Como o pH do meio era aproximadamente 7, esse foi acidificado com ácido cítrico até pH final 5,5 medido em pHmetro modelo micropH 2001 (Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona, Espanha) para se aproximar do pH natural do extrato de carne bovina. Foi medida a atividade de água (a_w) no meio preparado a temperatura ambiente utilizando um instrumento de medida indireta através do ponto de orvalho que fornece a leitura em a_w (modelo AquaLab 4TEV, Decagon Devices, Inc., EUA). A a_w medida foi de 0,99. O meio pronto foi acondicionado em frascos de vidro, tampados e esterilizados a 121 ºC por 20 minutos em autoclave (Darlab – K400, Traun, Suiça).

4.1.2 Extrato de carne bovina concentrado

Os ensaios definitivos foram realizados a partir de um extrato de carne bovina concentrado (16,6% de água) proveniente da empresa JBS, unidade industrial de Barretos, SP produzido em outubro de 2011. O extrato concentrado foi diluído até atingir a concentração de 24% (m/m) de sólidos totais e medido seu pH natural 5,5 por meio de pHmetro modelo micropH 2001 (Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona, Espanha). Foi medida a atividade de água (a_w) no meio preparado a temperatura ambiente utilizando um instrumento de medida indireta através do ponto de orvalho que fornece a leitura em a_w (modelo AquaLab 4TEV, Decagon Devices, Inc., EUA). A a_w medida foi de 0,98. O meio pronto foi acondicionado em frascos de vidro, tampados e esterilizados a 121 ºC por 20 minutos em autoclave (Darlab – K400, Traun, Suiça).

4.1.3 Solução tampão

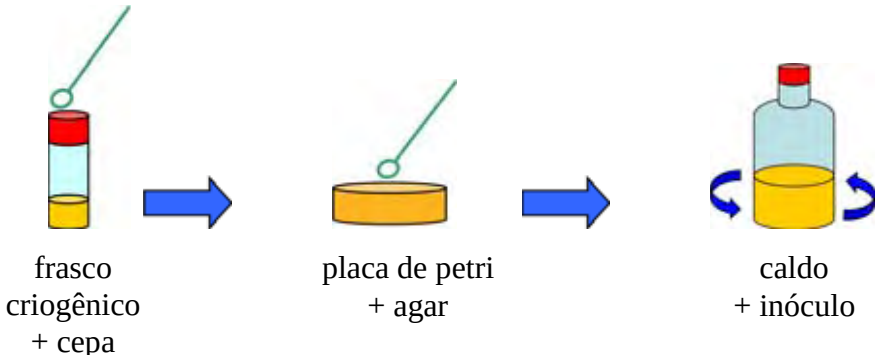
Para comparar os diversos meios de tratamento e a influência da concentração de sólidos foi utilizada a solução tampão denominada Mclvaine preparada com fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4) e ácido cítrico anidro (ambos fornecidos pela Panreac, Barcelona, Espanha), conforme Dawson e outros (1974). O pH final foi ajustado para 5,5 (o mesmo pH do extrato de carne). As medidas de pH foram realizadas utilizando-se pHmetro modelo micropH 2001 (Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona, Espanha). O meio pronto foi acondicionado em frascos de vidro e esterilizado a 121ºC por 20 minutos em autoclave (Darlab – K400, Traun, Suiça).

4.2 MICRORGANISMO: *Listeria monocytogenes*

Utilizou-se a bactéria *Listeria monocytogenes* por se tratar de um microrganismo termorresistente, de referência em produtos cárneos, e ainda por

apresentar uma das maiores resistências a tratamentos de manossonicação (ARROYO e outros, 2011). A cepa utilizada foi a CECT 4031 (Colección Española de Cultivos Tipo – equivalente a ATCC 15313) mantida congelada a –80°C em frascos criogênicos. A partir das cepas congeladas (Figura 10), a *Listeria* era transferida pela técnica de esgotamento para placas contendo agar de soja tripsina enriquecido com extrato de levedura (TSAYE, Biolife, Milão, Itália) solidificado. As placas eram então incubadas a 37°C por 48 horas. Posteriormente, uma única colônia era transferida para um frasco contendo 50 ml de caldo estéril de TSBYE (Biolife, Milão, Itália) e incubado sob agitação a 37°C por 36 horas para obter um caldo contendo aproximadamente 1 x 10^7 UFC/ml. Para a sua utilização nos tratamentos de manossonicação e manotermossonicação, esse caldo sofria uma diluição 1:5 em água de peptona estéril.

Figura 10 - Sequência de preparação do meio de cultura.



4.3 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os seguintes meios para o crescimento das colônias de *Listeria* e sua posterior recuperação em placa após o tratamento:

4.3.1 TSAYE – Agar de soja tripisina enriquecido com extrato de levedura (*tryptic soy agar* e *yeast extract*, Biolife – Milão, Itália)

O meio TSA é composto de 15 g/l de Caseína Pancreática, 5 g/l de Peptona de Soja, 5 g/l de Cloreto de Sódio (NaCl) e 15 g/l de Agar. O TSAYE foi preparado adicionando-se 40 g de TSA e 6 g de Extrato de Levedura por litro de água destilada. Posteriormente a solução foi aquecida em fogo alto sob constante agitação até a sua fervura para a completa homogeneização. O meio foi então dividido em frascos de 250 ml, tampados e esterilizados a 121ºC por 20 minutos em autoclave (Darlab – K400, Traun, Suiça). Quando utilizado nos ensaios, como meio de recuperação nas placas, o meio era fundido e mantido a 50ºC até sua utilização.

4.3.2 TSBYE – Caldo de soja tripisina enriquecido com extrato de levedura (t*ryptic soy broth* + y*east extract*, Biolife – Milão, Itália)

O meio TSB é composto de 17 g/l de Caseína Pancreática, 3 g/l de Peptona de Soja, 5 g/l de Cloreto de Sódio (NaCl), 2,5 g/l de Hidrogênio Fosfato de Dipotássio (K_2HPO_4) e 2,5 g/l de Glucose. O TSBYE foi preparado adicionando-se 30 g de TSB e 6 g de Extrato de Levedura por litro de água destilada. Posteriormente a solução foi homogeneizada, 50 ml do caldo envasados em cada frasco de 250 ml, os frascos tampados e esterilizados a 121ºC por 20 minutos em autoclave (Darlab – K400, Traun, Suiça).

4.3.3 Água de peptona

A água de peptona utilizada na diluição do meio de cultura foi preparada a partir de peptona de carne (Biolife, Milão, Itália) em água destilada a 1% m/v, envasada e esterilizada a 121ºC por 20 minutos em autoclave (Darlab – K400, Traun, Suiça).

4.4 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA TRANSFERIDA PELO ULTRASSOM

Os efeitos do ultrassom de alta intensidade são reflexo da combinação entre amplitude das ondas com a pressão, resultando em potência do tratamento efetivamente transferido ao meio de modo que parte da energia acústica gerada pelo transdutor ultrassônico é transformada em calor como resultado da cavitação (RASO et al., 1999; MAÑAS et al., 2000 e ARROYO et al., 2011). A potência do ultrassom transferida ao meio foi determinada através do método calorimétrico e, por motivos práticos, utilizando-se água destilada como meio de aplicação. Este método consiste em medir as variações de temperatura da massa de líquido que absorve a energia acústica. A taxa de elevação da temperatura foi determinada a partir da derivada primeira da curva de temperatura versus tempo nos primeiros 8 a 12 segundos da aplicação do ultrassom sem refrigeração, e a energia por unidade de tempo do tratamento efetivamente transferida calculada através da Equação (13):

$$Pot = mCp\frac{dT}{dt} \tag{13}$$

onde dT/dt é a taxa de variação da temperatura (K/s), Cp é o calor específico do meio de tratamento (kJ/kg.K) e m é a massa do meio de tratamento (kg). A câmara de tratamento comporta uma massa de 0,023 kg de água destilada.

A temperatura foi medida com uma sonda termopar (Thermo E4 ZA 9020 – FS, type K, sensor NiCr-Ni), isolada com silicone resistente ao calor para evitar interferências externas e conectada a um data-logger (ALMEMO® 2590, Ahlborn, Holzkirchen, Alemanha). Os ensaios foram realizados com o meio a partir de uma temperatura inicial de cerca de 16 ºC. A faixa de pressão foi de 0 a 5,5 bar e a amplitude de 2 a 8, correspondente, respectivamente à 55 a 85% da potência máxima fornecida pelo gerador. Os experimentos foram realizados em duplicata e os

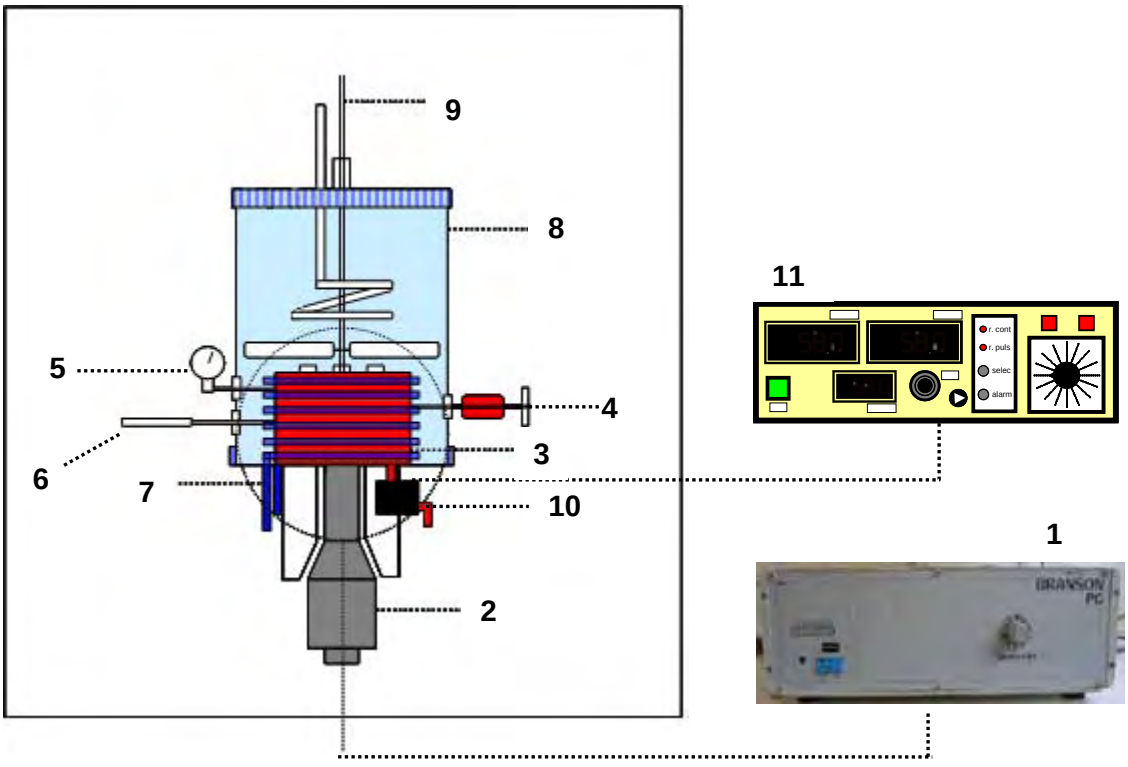
resultados apresentados como média da potência (W) real transferida ao meio para cada condição operacional de pressão e amplitude do gerador de ultrassom.

4.5 TRATAMENTO COM ULTRASSOM SOB PRESSÃO (MANOSSONICAÇÃO - MS)

Para o tratamento com ultrassom foi utilizado um sistema constituído por uma câmara de tratamento contendo o transdutor de ultrassom conectado ao gerador, modelo Branson Sonifier 2000 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, EUA), conforme Figura 11. Pode-se dividir o equipamento utilizado em uma parte mecânica e outra eletrônica. A parte eletrônica consiste em um módulo principal de geração (ou excitação) do ultrassom (1), e um sistema de controle com temporizador para acionamento da válvula de retirada de amostras (11). A parte mecânica consta de um transdutor de ultrassom (2), câmara de tratamento com capacidade para 23 mL (3) que dispõe de um sistema de injeção do meio de cultura (4), sistema de pressurização da câmara de tratamento por meio de nitrogênio (5), sonda termopar (6) para o registro e/ou controle da temperatura, um sistema de refrigeração (7), câmara externa (8), onde circula o líquido refrigerante, sistema de agitação do refrigerante (9) e um sistema de coleta de amostras através de uma válvula solenóide (10) que é acionada por (11), conforme descrito acima. As Figuras 12 e 13 mostram o transdutor utilizado em destaque.

O sistema descrito permite a aplicação de tratamentos de MS em condições controladas de tempo, temperatura, pressão e amplitude das ondas ultrassônicas, com frequência de 20 kHz. No caso da amplitude (Figura 11-1), o controle é realizado através do controlador do gerador de ultrassom que permite uma variação (posição) e uma correspondência em porcentagem da amplitude (50 a 100%). Na Tabela 1 tem-se a correspondência na faixa de amplitudes de estudo do presente trabalho.

Figura 11 - Diagrama esquemático do equipamento para tratamento com ultrassom. (1) gerador de pulsos elétricos, (2) transdutor, (3) câmara de tratamento de 23 mL, (4) sistema de injeção do meio de cultura, (5) sistema de pressurização da câmara de tratamento por meio de nitrogênio, (6) sonda termopar para o registro e/ou controle da temperatura, (7) sistema de refrigeração, (8) câmara externa, onde circula o líquido refrigerante, (9) sistema de agitação do refrigerante, (10) sistema de coleta de amostras e (11) sistema de controle com temporizador para acionamento da válvula de retirada de amostras.

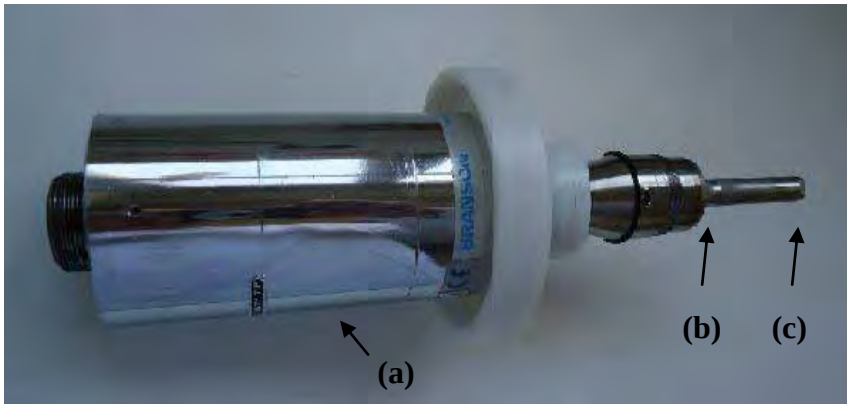


Previamente a cada experimento, todo o circuito interno do equipamento, bem como a seringa de injeção do meio de cultura, era enxaguado com água destilada e posteriormente preenchido com uma solução de hipoclorito de sódio em água destilada de um dia para o outro. Após a desinfecção, os equipamentos eram abundantemente enxaguados com água destilada e retirada uma amostra controle para confirmar a esterilidade do sistema.

Tabela 1. Condições de operação e leitura da amplitude.

Amplitude (posição dial)	Amplitude (% potência máxima)
1	50
2	55
3	60
4	65
5	70
6	75
7	80

Figura 12 - Transdutor utilizado: (a) o material piezoelétrico está dentro do equipamento; (b) amplificador físico; (c) sonotrodo.



Para a preservação das características físico-químicas do meio a ser tratado, os tratamentos foram realizados com as amostras à temperatura mais baixa possível, dentro dos limites operacionais. Uma vez estabelecidas as condições de operação desejadas (pressão e amplitude), mas ainda com o gerador do ultrassom desligado, o líquido refrigerante era circulado pela câmara externa (Figura 11-8) até que a temperatura do meio, medida pela sonda termopar (Figura 11-6), atingisse entre 7,5 e 8 ºC no interior da câmara de tratamento, momento no qual 0,15 mL do meio de cultura era injetado na câmara de tratamento por meio de uma seringa (CR-700-200 Hamilton Co, Reno, Nevada, EUA) e então o tratamento era iniciado. Devido à energia liberada pela cavitação, a temperatura no interior da câmara se eleva rapidamente atingindo uma fase praticamente estacionária, na qual a energia removida pelo sistema de refrigeração se equilibrava com a energia do aquecimento do meio. Esse comportamento ao longo dos experimentos pode ser visualizado na Figura 14, que corresponde ao tratamento do ponto central do delineamento experimental utilizado, conforme Tabela 2 [amplitude 4 (65%), pressão 2,5 bar].

Figura 13 - Detalhe do transdutor utilizado: (b) amplificador físico; (c) sonotrodo.

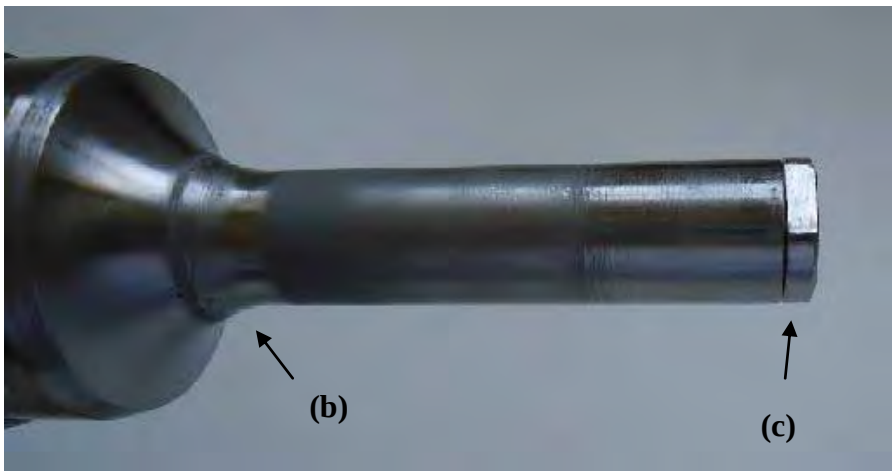
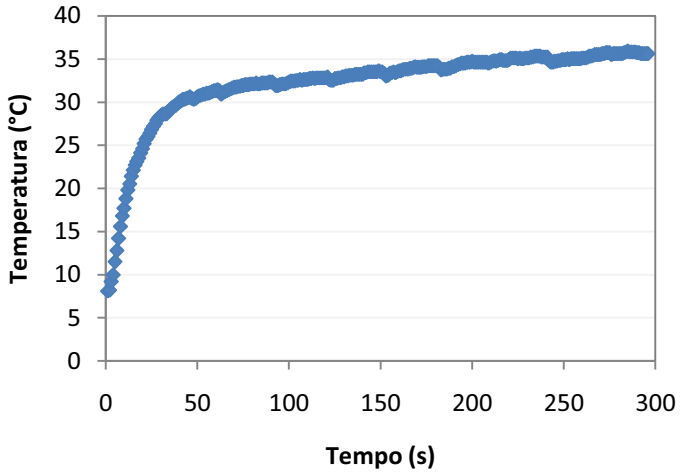


Figura 14. Comportamento da temperatura nos experimentos de Manossonicação.



Durante o tratamento, em intervalos pré-determinados de tempo, as amostras eram coletadas (Figura 11-10) e depositadas diretamente em placas de Petri estéreis, nas quais foi adicionado o meio de recuperação (TSAYE) estéril e fundido para posterior incubação a 37 ºC por 48 horas em estufa bacteriológica (J.P. Selecta S.A., Barcelona, Espanha). Após a incubação das placas, as colônias foram contadas por meio do Contador Automático de Colônias (Protos - Synoptics - Image Processing Systems, Cambridge, UK) e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de meio tratado (UFC/mL).

Devido à retirada de amostras, o equipamento era abastecido com o meio de modo a preencher completamente a câmara de tratamento acrescido de uma quantidade suficiente para a reposição do volume retirado com as amostras, correspondendo a volumes variando entre 0,15 e 0,60 mL nas pressões de 1 a 4 bar, respectivamente. Assim, o volume tratado na câmara de tratamento se manteve constante, no entanto, foi introduzida uma correção para eliminar o efeito dessa pequena diluição da carga microbiana pela reposição do meio. Esse procedimento foi realizado subtraindo-se da contagem bacteriana a fração devida à diluição do meio, restando o resultado apenas devido ao tratamento.

As condições dos tratamentos foram determinadas levando-se em consideração trabalhos anteriores realizados por outros autores: Dickens, Lyon e Wilson (1991), Pohlman e outros (1997a,b,c), Lyng, Allen e McKenna (1998), Raso e outros (1998a,b), Sala e outros (1999), Mañas e outros (2000a,b), Piyasena, Mohareb e McKellar (2003) e Arroyo e outros (2011). No presente estudo, a frequência do pulso de ultrassom utilizada foi fixada em 20 kHz com pressão variando de 1,0 a 4,0 bar e amplitude variando de 1 a 7 (50 a 80% da potência máxima do gerador). O tempo de duração dos experimentos foi determinado para atingir ao menos uma redução decimal nos tratamentos menos intensos ou a completa eliminação detectável da *Listeria* nos tratamentos mais intensos. Assim, os tempos de tratamento da manossonicação variaram entre 4,5 e 6 minutos.

4.5.1 Planejamento experimental para o tratamento de manossonicação em extrato de carne bovina desidratado

Para os tratamentos de Manossonicação com o extrato de carne bovina desidratado foi empregado um delineamento fatorial completo 3^2 em duplicata, ou seja, dois fatores (variáveis controladas) e três níveis: amplitude (2, 4 e 6) e pressão (1,5, 2,5 e 3,5) e para minimizar erros experimentais, a sequência de realização dos ensaios foi aleatória (Tabela 2). A variável resposta foi considerada o tempo de redução decimal da carga microbiana de *Listeria monocytogenes* (valor D_{MS}), calculado através da taxa de redução das UFC/mL (medida experimental).

Para a modelagem dos resultados experimentais foi utilizado o modelo de regressão conforme a Equação (14) e as análises realizadas considerando um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Tabela 2. Delineamento fatorial completo 3^2 para os tratamentos de MS para o extrato de carne bovina desidratado.

Ensaio	Ordem aleatorizada	Amplitude (cod)	Pressão (cod)	Amplitude [posição / (%)]	Pressão (bar)
1	15	- 1	- 1	2 (55)	1,5
2	3	- 1	- 1	2 (55)	1,5
3	13	0	- 1	4 (65)	1,5
4	10	0	- 1	4 (65)	1,5
5	11	+ 1	- 1	6 (75)	1,5
6	1	+ 1	- 1	6 (75)	1,5
7	17	- 1	0	2 (55)	2,5
8	8	- 1	0	2 (55)	2,5
9	2	0	0	4 (65)	2,5
10	7	0	0	4 (65)	2,5
11	12	+ 1	0	6 (75)	2,5
12	18	+ 1	0	6 (75)	2,5
13	16	- 1	+ 1	2 (55)	3,5
14	14	- 1	+ 1	2 (55)	3,5
15	4	0	+ 1	4 (65)	3,5
16	5	0	+ 1	4 (65)	3,5
17	6	+ 1	+ 1	6 (75)	3,5
18	9	+ 1	+ 1	6 (75)	3,5

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_3 x_1^2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_{32} x_1^2 x_2 + \beta_{14} x_1 x_2^2 + \beta_{34} x_1^2 x_2^2 + \varepsilon \quad (14)$$

onde:

y = variável resposta (valor D_{MS})

β_0 = parâmetro que representa o efeito médio geral

β_1 = parâmetro que representa o efeito linear da amplitude

β_2 = parâmetro que representa o efeito linear da pressão

β_{12} = parâmetro que representa a interação da amplitude com a pressão

β_3 = parâmetro que representa o efeito quadrático da amplitude

β_4 = parâmetro que representa o efeito quadrático da pressão

β_{32} = parâmetro que representa a interação quadrática para a amplitude e linear para a pressão

β_{14} = parâmetro que representa a interação linear para a amplitude e quadrática para a pressão

β_{34} = parâmetro que representa a interação quadrática entre amplitude e pressão

x_1 = representa os níveis da amplitude (-1, 0, +1)

x_2 = representa os níveis da pressão (-1, 0, +1)

ε = representa o erro aleatório

4.5.2 Planejamento experimental para o tratamento de manossonicação em extrato de carne bovina concentrado

A segunda etapa consistiu em um delineamento composto central rotacional (DCCR) aplicado ao extrato de carne bovina concentrado. Este delineamento consistiu em 13 ensaios, conforme descrito por Rodrigues e Iemma (2005), contendo fatorial 2^2, 4 pontos axiais mais 5 pontos centrais para avaliação do erro puro. Como apresentado na Tabela 2, as faixas das variáveis controladas foram: amplitude, de 1 a 7 (50 a 80% da potência máxima) e pressão, de 1,0 a 4,0 bar, e para minimizar erros experimentais a sequência de realização dos ensaios foi aleatória. A variável resposta foi considerada o tempo de redução decimal da carga microbiana de *Listeria monocytogenes* (valor D_{MS}), calculado através da taxa de redução das UFC/mL (medida experimental). Para a modelagem dos resultados experimentais foi utilizado o modelo de regressão conforme a Equação (14) e os dados analisados

através de uma superfície de resposta considerando um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Tabela 3. Delineamento composto central rotacional (DCCR) para os tratamentos de manossonicação em extrato de carne bovina concentrado.

Ensaio	Ordem aleatorizada	Amplitude (cod)	Pressão (cod)	Amplitude [posição / (%)]	Pressão (bar)
1	2	-1	-1	2 (55)	1,5
2	3	+1	-1	6 (75)	1,5
3	13	-1	+1	2 (55)	3,5
4	12	+1	+1	6 (75)	3,5
5	5	-1,41	0	1 (50)	2,5
6	9	+1,41	0	7 (80)	2,5
7	4	0	-1,41	4 (65)	1,0
8	1	0	+1,41	4 (65)	4,0
9	6	0	0	4 (65)	2,5
10	7	0	0	4 (65)	2,5
11	8	0	0	4 (65)	2,5
12	10	0	0	4 (65)	2,5
13	11	0	0	4 (65)	2,5

4.6 TRATAMENTO COM ULTRASSOM SOB PRESSÃO COMBINADO COM EFEITO DA TEMPERATURA (MANOTERMOSSONICAÇÃO - MTS)

4.6.1 Manotermossonicação (MTS) com o controle de temperatura

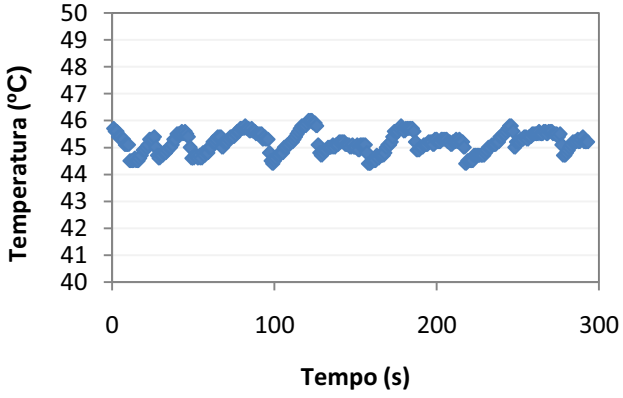
Os tratamentos de MTS referem-se à combinação da MS com a elevação da temperatura. A faixa de temperatura foi estabelecida entre 40 e 60 ºC. O equipamento e as demais condições operacionais foram fixados como aqueles do ponto central do delineamento da MS, conforme apresentado na Tabela 4. Após estabelecidas as condições de amplitude e pressão, faz-se circular o líquido

refrigerante na câmara externa já com a sonicação iniciada. A temperatura é controlada através de duas variáveis: vazão de circulação do refrigerante e agitação do mesmo na câmara externa (Figura 13-9). A Figura 15 apresenta um exemplo de controle da temperatura para o caso do Ensaio nº 2 (45 ºC). Após estabelecido o controle da temperatura (± 1 ºC), o meio de cultura é injetado na câmara de tratamento e o experimento se inicia. O tempo de duração dos experimentos foi determinado para atingir ao menos duas reduções decimais nos tratamentos menos intensos ou a completa eliminação detectável da *Listeria* nos tratamentos mais intensos. Assim, os tempos de tratamento da manotermossonicação variaram entre 40 segundos e 5 minutos.

Tabela 4. Condições dos tratamentos de manotermossonicação realizados.

Ensaio	Amplitude [posição / (%)]	Pressão (bar)	Temperatura (ºC)
1	4 (65)	2,5	40
2	4 (65)	2,5	45
3	4 (65)	2,5	50
4	4 (65)	2,5	55
5	4 (65)	2,5	60

Figura 15 - Temperatura de um experimento de Manotermossonicação (MTS) a 45ºC.

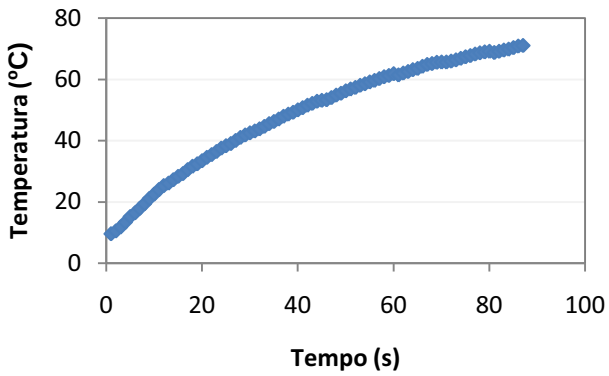


4.6.2 Manotermossonicação (MTS) sem o controle de temperatura

Utilizando as condições do ponto central (Pressão 2,5 bar e Amplitude 4), foram realizados experimentos com temperatura inicial entre 7 e 8 ºC mas sem o sistema de refrigeração em operação, deixando a temperatura subir livremente com o calor gerado pela cavitação, conforme mostra a Figura 16.

O objetivo foi comparar tratamentos de MS e MTS em 2 aspectos: letalidade versus consumo extra de energia (com e sem refrigeração) e desgaste do equipamento. Dessa forma, foram realizados 3 experimentos seguidos com o sistema de refrigeração em operação (MS). Em seguida, a ponta emissora que vibra na ponta do transdutor (sonotrodo) foi substituída por uma nova e mais 3 experimentos foram realizados, dessa vez sem a refrigeração do sistema (MTS sem controle de temperatura), conforme descrito no parágrafo anterior.

Figura 16 - Perfil de temperatura nos experimentos sem refrigeração.



4.7 RESISTÊNCIA TÉRMICA DO MICRORGANISMO

A resistência térmica da *Listeria monocytogenes* foi determinada utilizando-se o Termorresistômetro TR-SC descrito por Condón e outros (1993) sob condições isotérmicas em duplicata. Para tanto foi empregado o método *Thermal Death Time* (TDT). O equipamento especificamente projetado para esta finalidade é constituído de uma parte eletrônica e outra mecânica conforme mostra a Figura 17. À esquerda

está a parte eletrônica que aciona o motor de agitação (acima à direita), o sistema de coleta de amostras e o controle da temperatura. Abaixo à direita está a câmara de tratamento com uma sonda termopar e a válvula solenóide para a coleta de amostras.

O equipamento foi enxaguado e esterilizado a 130 ºC por 10 minutos antes de cada experimento. Com o meio de tratamento no interior da câmara e uma vez estabilizada a temperatura de trabalho desejada (53 ºC, 56 ºC, 59 ºC e 62 ºC), 0,8 mL do meio de cultura são injetados na câmara de tratamento através de uma seringa estéril e descartável. Durante o tratamento, em intervalos pré-determinados de tempo, são extraídas amostras que se depositam diretamente em placas de Petri estéreis, às quais é adicionado o meio de recuperação (TSAYE) estéril fundido para posterior incubação a 37 ºC por 48 horas em estufa (J.P. Selecta S.A., Barcelona, Espanha). O tempo de duração dos experimentos foi determinado para atingir a completa eliminação detectável da *Listeria*. Assim, os tempos de tratamento variaram entre 1 e 20 minutos.

Figura 17 - Aparelho para determinação da resistência térmica.

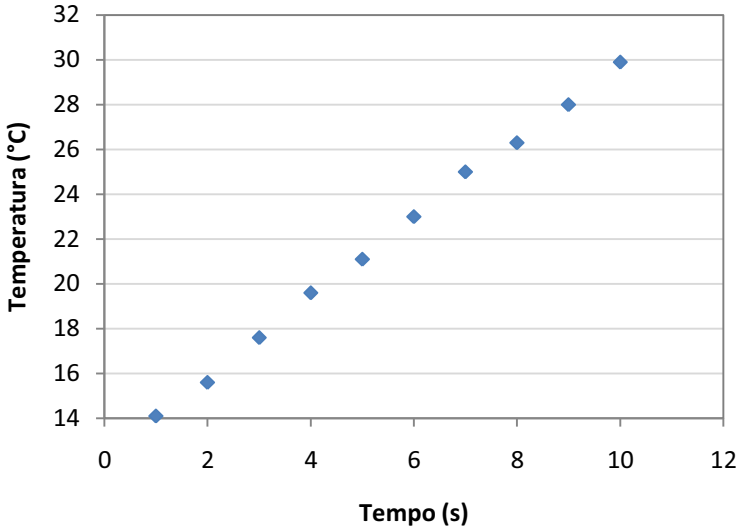
Após o período de incubação, as colônias foram contadas com um Contador Automático de Colônias (Protos – Synoptics – Image Processing Systems, Cambridge, UK) e os resultados expressos em UFC/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA TRANSFERIDA PELO ULTRASSOM

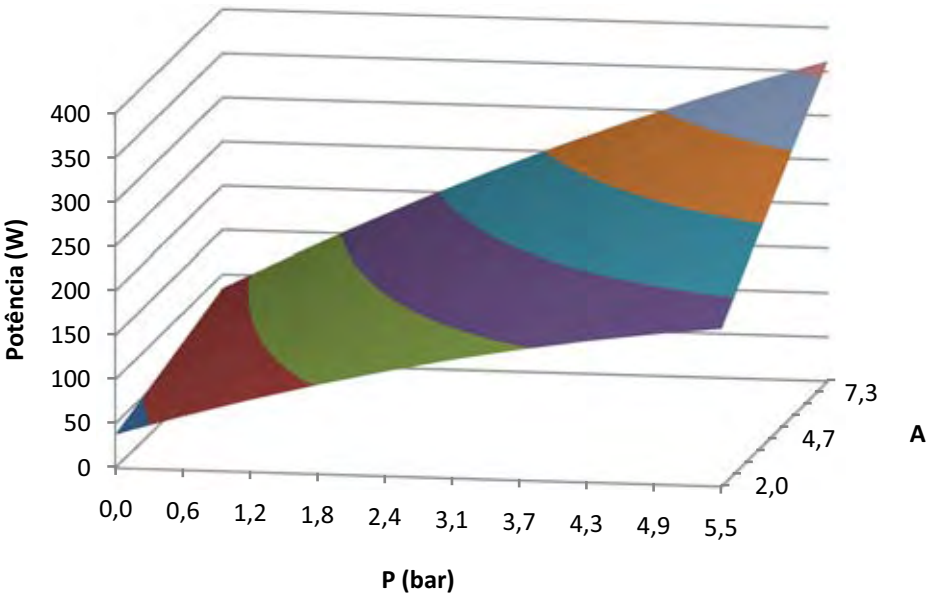
A Figura 18 apresenta um exemplo desses experimentos, realizado na condição de 4,5 bar de pressão e amplitude 2. Neste caso, a taxa de variação da temperatura com o tempo foi determinada como 1,7612 K/s, resultando em uma potência transferida de 169 W, calculada considerando o Cp da água como 4,18 kJ/kgK, conforme Equação (13).

Figura 18 - Variação da temperatura com a aplicação do ultrassom em água destilada a pressão de 4,5 bar e amplitude 2.



A Figura 19 apresenta a potência média obtida em função das combinações de amplitude e pressão estudadas. Observa-se um grande aumento da potência transferida ao meio com o aumento da pressão e da amplitude do ultrassom. A Equação (15) mostra a relação obtida entre a potência em Watts e os valores de amplitude e pressão que cobre a faixa de condições operacionais estudada. A Figura 20 mostra a qualidade do ajuste da Equação (15) para prever a potência transferida ao meio no intervalo de condições operacionais estudado.

Figura 19 - Potência transferida em função da pressão e amplitude do ultrassom.



$$P_{ot} = 22,29 + 30,59P + 7,777A - 2,424P^2 + 4,151PA \quad (15)$$

Figura 20 - Potência experimental versus potência calculada pela Equação (15).

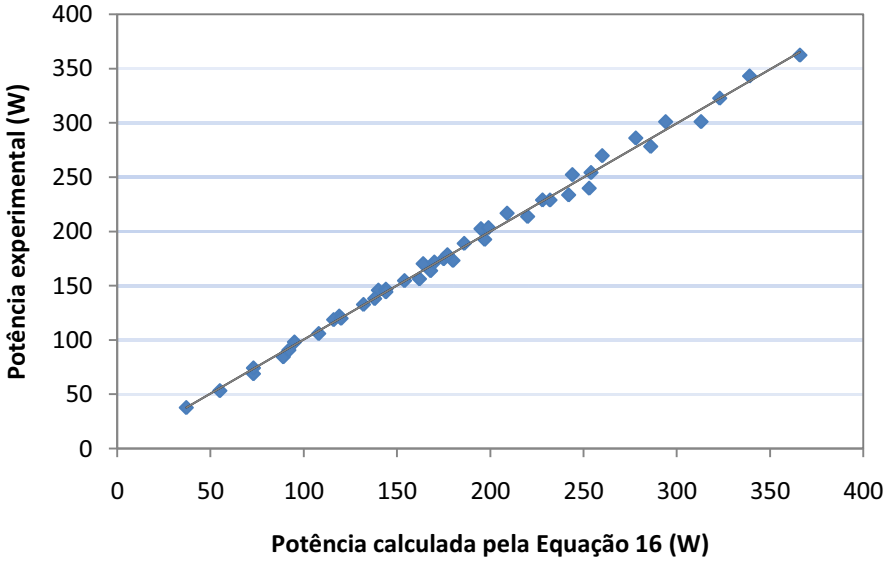


Tabela 5. Condições operacionais utilizadas e potência.

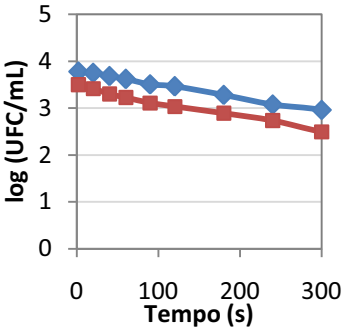
Amplitude (posição dial)	Pressão (bar)	Potência (W)
2	1,5	92
4	1,0	95
1	2,5	102
4	1,5	116
2	2,5	120
6	1,5	144
2	3,5	144
4	2,5	**162**
4	3,5	**186**
6	2,5	**197**
4	4,0	**200**
7	2,5	**210**
6	3,5	**240**

A Tabela 5 mostra as condições operacionais e as potências utilizadas e destaca que pela primeira vez foram utilizadas potências superiores a 150W, potência máxima utilizada em experimentos anteriores (MAÑAS et al., 2000a; ARROYO et al., 2011).

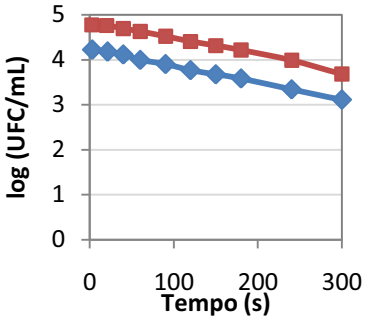
5.2 MANOSSONICAÇÃO APLICADA AO EXTRATO DE CARNE BOVINA DESIDRATADO

Os resultados dos tratamentos de aplicação da manossonicação no extrato de carne bovina desidratado diluído à 24% de sólidos totais são apresentados na Figura 21, como contagens microbianas [log(UFC/mL)] em função do tempo de tratamento para as condições experimentais de pressão e amplitude investigadas (Tabela 6). A partir dos dados de UFC/mL foram calculados os valores D_{MS}, ou seja, o tempo necessário para reduzir o número de colônias (UFC) em um ciclo logarítmico para cada condição experimental (Tabela 6).

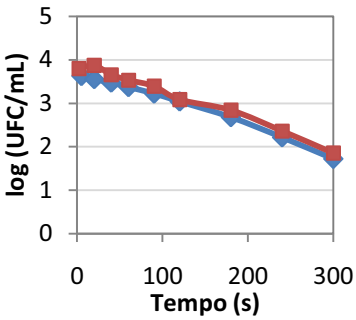
Figura 21 - Curvas de sobreviventes [log (UFC/mL)] em função do tempo de tratamento da MS para as condições de pressão e amplitude aplicados.



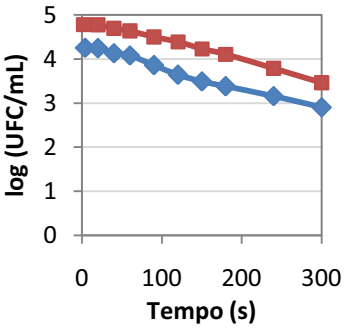
(a) P: 1,5 e A: 2 = 92W



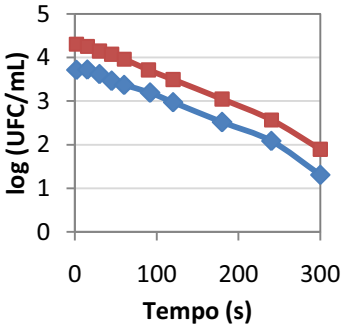
(b) P: 1,5 e A: 4 = 116W



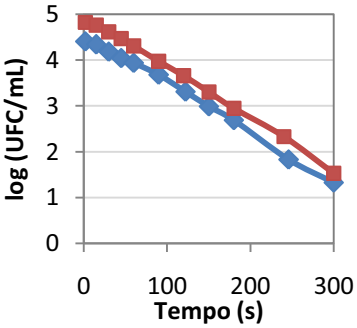
(c) P: 1,5 e A: 6 = 144W



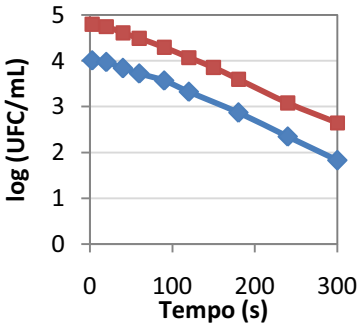
(d) P: 2,5 e A: 2 = 120W



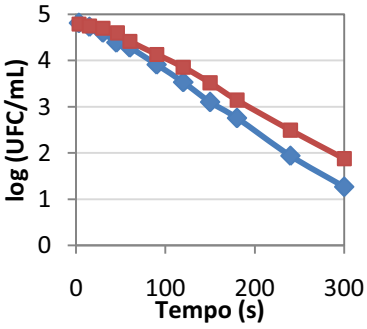
(e) P: 2,5 e A: 4 = 162W



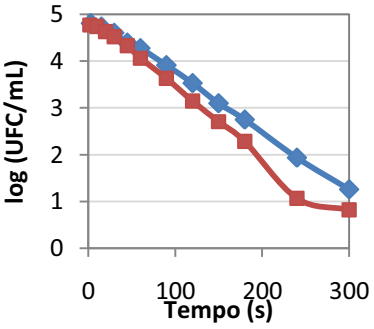
(f) P: 2,5 e A: 6 = 197W



(g) P: 3,5 e A: 2 = 144W



(h) P: 3,5 e A: 4 = 186W



(i) P: 3,5 e A: 6 = 240W

Tabela 6. Médias dos valores D_{MS} para os tratamentos de manossonicação em extrato de carne bovina desidratado.

Amplitude (posição dial)	Pressão (bar)	D_{MS} (min)
2	1,5	6,17
4	1,5	4,91
6	1,5	2,65
2	2,5	3,84
4	2,5	2,21
6	2,5	1,61
2	3,5	2,42
4	3,5	1,59
6	3,5	1,12

Como era esperado, os resultados comprovam que nessa faixa de operação, quanto maior a amplitude e a pressão, maior a letalidade do tratamento, resultando em menores valores D_{MS}, conforme demonstrado na Figura 22. Os dados foram ajustados, através de regressão múltipla, a um modelo polinomial dado pela Equação (16) que permite prever valores D_{MS} conforme as condições de operação utilizadas dentro da faixa operacional investigada.

$$D_{MS} = 12,83 - 4,54\ P + 0,59\ P^2 - 0,30\ P\ A - 0,16\ A^2 + 0,07\ P\ A^2 \qquad (16)$$

Analisando-se a influência de cada um dos fatores nos resultados, pode-se verificar através das Figuras 23 e 24 que ambos fatores são importantes e exercem uma influência logarítmica nos valores D_{MS}.

Figura 22 - Valores D_{MS} para a MS do extrato de carne desidratado.

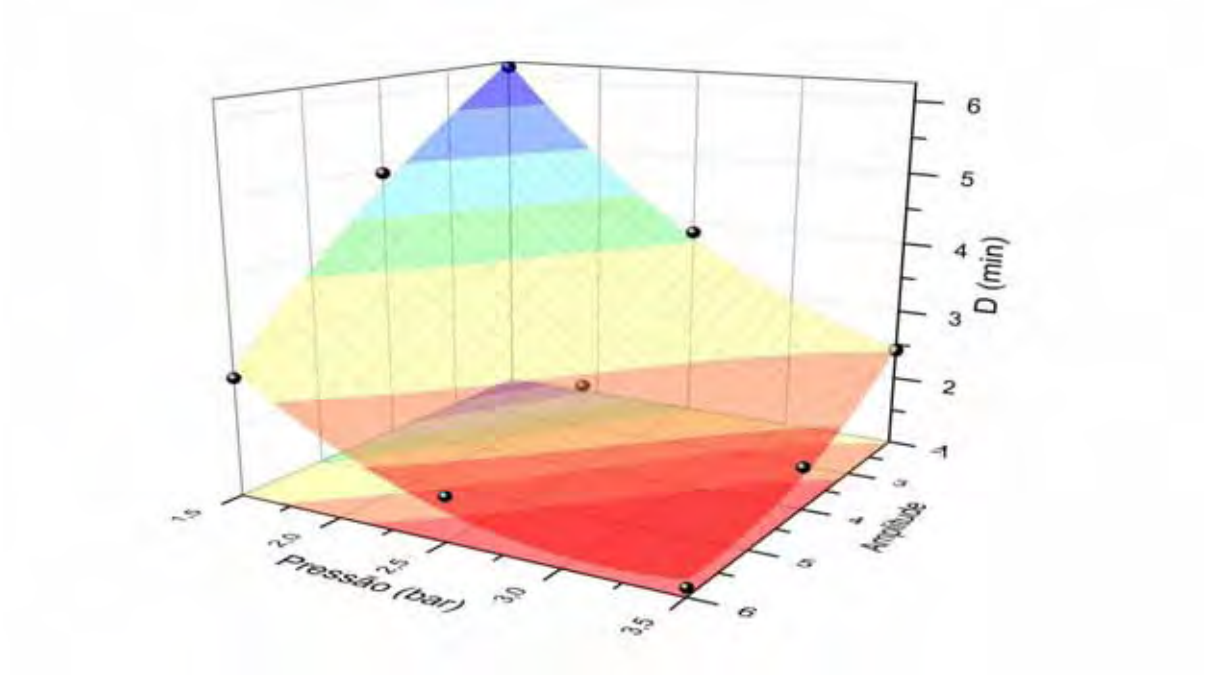


Figura 23 - Influência da amplitude nos 3 níveis de pressão para o tratamento de MS do extrato de carne bovina desidratado.

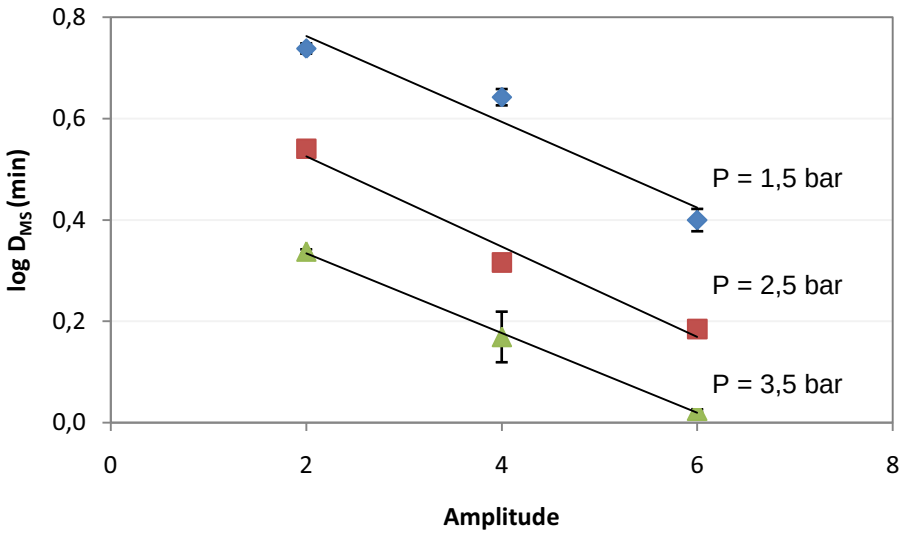
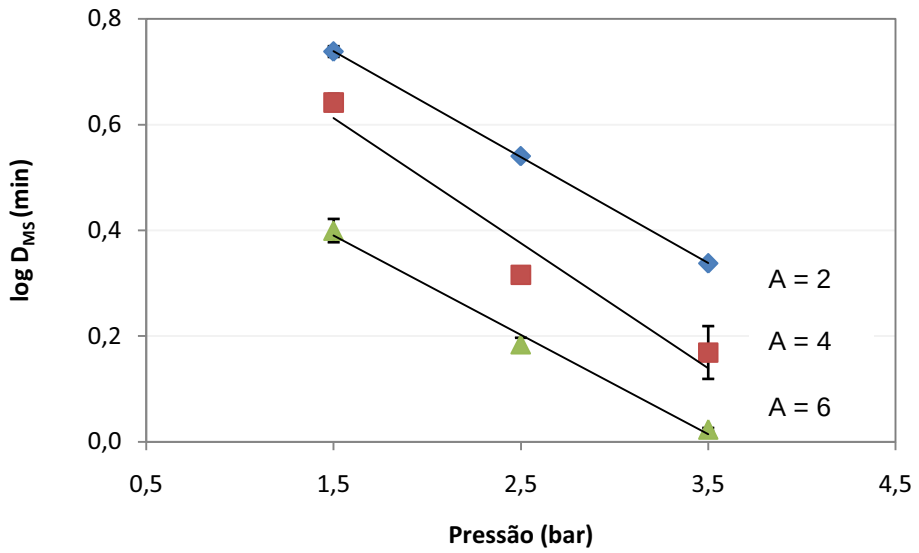


Figura 24 - Influência da pressão nos 3 níveis de amplitude para o tratamento de MS do extrato de carne bovina desidratado.



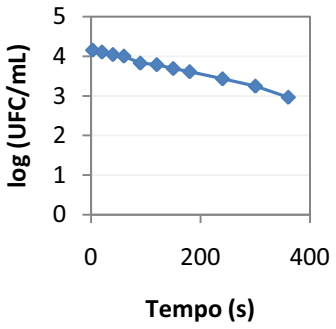
5.3 MANOSSONICAÇÃO APLICADA AO EXTRATO DE CARNE BOVINA CONCENTRADO

Os resultados dos tratamentos de aplicação do ultrassom (manossonicação) no extrato de carne bovina concentrado diluído a 24% de sólidos totais são apresentados na Figura 25 como UFC/mL em função do tempo de tratamento para as condições experimentais de pressão e amplitude investigadas (Tabela 7).

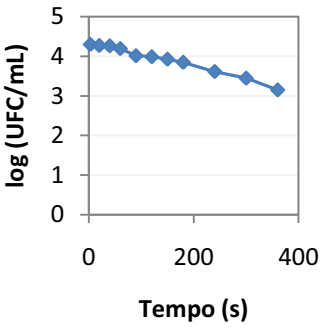
A partir dos dados das curvas de sobreviventes [log(UFC/mL)] em função do tempo de tratamento, foram calculados os valores D_{MS} como tempo para redução do número de microrganismos em um ciclo logarítmico (Tabela 7).

Como resultado da aplicação do delineamento estatístico (DCCR), a superfície de resposta está apresentada na Figura 26 resultando na Equação (17), que prevê o tempo de redução decimal (D_{MS}) com base nas variáveis de pressão e amplitude, dentro da faixa de condições operacionais investigadas, respectivamente 1,0 a 4,0 bar de pressão e 1 a 7 de amplitude.

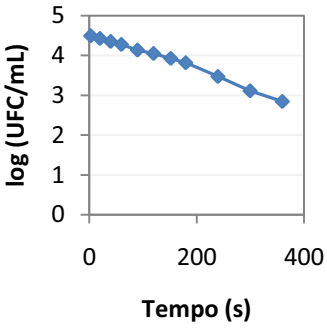
Figura 25 - Curvas de sobreviventes [log (UFC/mL)] em função do tempo de tratamento da MS para as condições de pressão e amplitude aplicados.



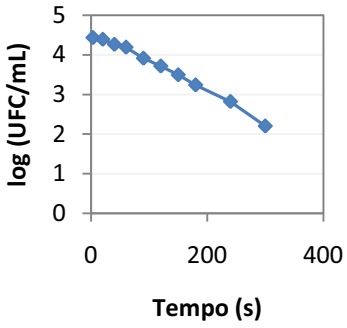
(a) P: 1,5 e A: 2 = 92W



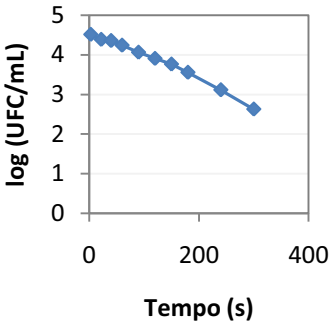
(b) P: 1 e A: 4 = 95W



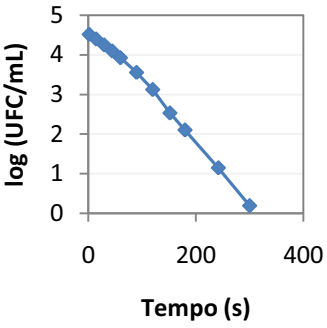
(c) P: 2,5 e A: 1 = 102W



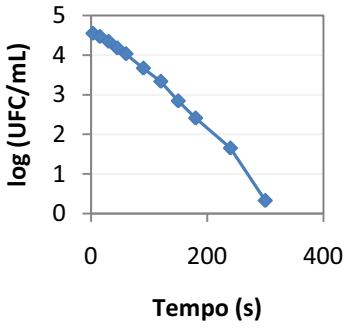
(d) P: 1,5 e A: 6 = 144W



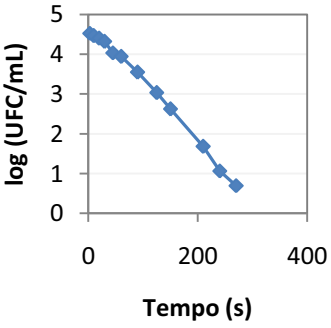
(e) P: 3,5 e A: 2 = 144W



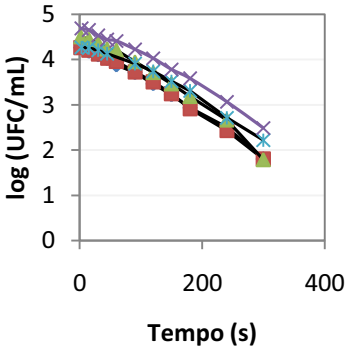
(f) P: 4,0 e A: 4 = 200W



(g) P: 2,5 e A: 7 = 210W



(h) P: 3,5 e A: 6 = 240W

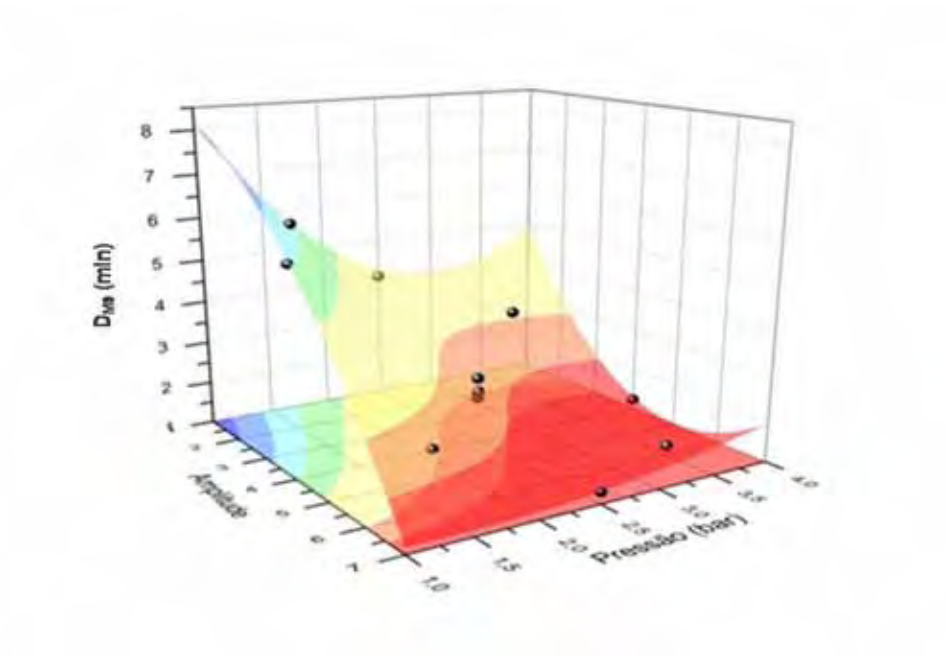


(i) P: 2,5 e A: 4 = 162W

Tabela 7. Valores D_{MS} para os tratamentos de manossonicação em extrato de carne bovina concentrado.

Amplitude (posição dial)	Pressão (bar)	D_{MS} (min)
2	1,5	5,95
4	1,0	5,75
1	2,5	4,07
6	1,5	2,35
2	3,5	3,03
4	4,0	1,21
7	2,5	1,27
6	3,5	1,21
4	2,5	2,06
4	2,5	2,16
4	2,5	2,22
4	2,5	2,53
4	2,5	2,53

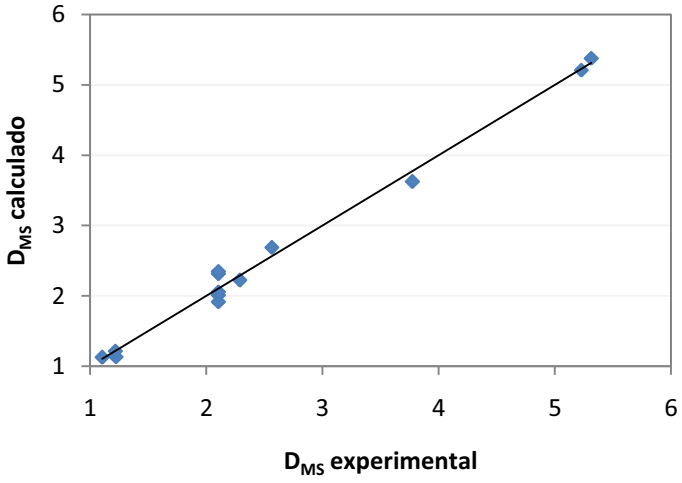
Figura 26 - Superfície de resposta obtida para o tratamento de MS do extrato de carne bovina concentrado.



$$D_{MS} = 13{,}51 - 6{,}23\ P + 1{,}15\ P^2 - 0{,}25\ A^2 - 0{,}15\ P^2\ A + 0{,}12\ P\ A^2 \qquad (17)$$

A Figura 27 mostra a qualidade do ajuste da Equação (17) quando comparados os valores estimados pela equação com os valores observados experimentalmente. Os fatores de ajuste (*Bias Factor*, Bf = 0,98) e precisão (*Accuracy Factor*, Af = 1,07), dados respectivamente pelas Equações (18) e (19), confirmam satisfatória qualidade com $R^2 = 0{,}99$.

Figura 27 - Qualidade do ajuste dos valores D_{MS} calculados pela Equação (17) a partir dos dados experimentais.



$$B_f = 10^{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\log_{10}\left(\frac{estimados_{(n)}}{observados_{(n)}}\right)} \qquad (18)$$

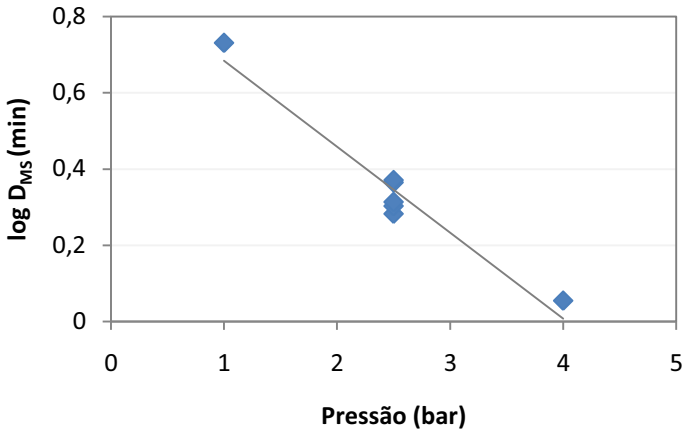
$$A_f = 10^{\sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left(\log_{10}\left(\frac{estimados_{(n)}}{observados_{(n)}}\right)\right)^2}} \qquad (19)$$

A repetibilidade dos experimentos foi verificada a partir da comparação dos resultados realizados no ponto central do delineamento (Tabela 7), conforme Figura 25-i, apresentando coeficiente de variação (CV) calculado de 9,46%, conforme Equação (20).

$$CV = \left(\frac{\sigma\ (desvio\ \ padr\ \tilde{a}o)}{x\ (m\acute{e}dia)}\right) * 100 \qquad (20)$$

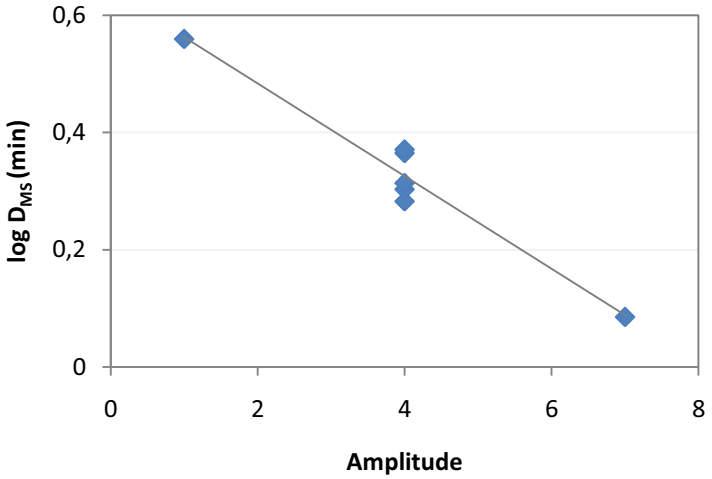
A influência dos fatores pressão e amplitude nos tratamentos pode ser observada respectivamente nas Figuras 28 e 29 onde pode-se observar a relação logarítmica entre a resposta (D_{MS}) e os efeitos da pressão e amplitude.

Figura 28 - Influência da pressão em uma mesma amplitude (4).



Para avaliar a influência da concentração de sólidos foram comparadas as curvas de sobreviventes do extrato de carne bovina desidratado diluído a 12% e a 24% de sólidos totais (duplicata), com os resultados do tratamento em solução tampão (triplicata). Na Figura 30 pode-se observar que quanto maior a concentração de sólidos, menor a inativação da bactéria em estudo.

Figura 29 - Influência da amplitude em uma mesma pressão (2,5 bar).



A Figura 31 apresenta a influência da potência transferida ao meio nos valores D_{MS} obtidos para o tratamento de MS com o extrato de carne bovina concentrado. Conforme era esperado, quanto maior a potência utilizada ou quanto maior a energia transferida ao meio, menor o tempo necessário para reduzir a população de *Listeria* em um ciclo logarítmico (log D_{MS}). No entanto, a partir da potência de 200 W o efeito parece perder eficiência. Na faixa de potência de 200 a 240 W aplicados ao meio (ou 8,7 a 10,4 W/ml) houve pequena variação no valor D_{MS}, ou seja, mesmo um aumento de 20% de energia nessa faixa a influência parece ser desprezível. Entretanto, esses resultados precisam ser confirmados com um maior número de experimentos na faixa entre 150 e 300 W, por exemplo.

Como pode-se verificar, os resultados mostram que o tempo de redução decimal à MS (D_{MS}) é função logarítmica da energia transmitida ao meio pelo ultrassom sob pressão assim, um valor Z_{MS} também pode ser definido de forma similar ao proposto para tratamentos térmicos (BIGELOW, 1921), para o qual obteve-se valor Z_{MS} de 204 W, valor coerente e superior ao encontrado por Arroyo e outros (2011) para o microrganismo *Cronobacter sakazakii* (134 W), confirmando a maior resistência da *Listeria* à MS.

Figura 30 - Efeito da concentração de sólidos no meio de tratamento na inativação do microrganismo.

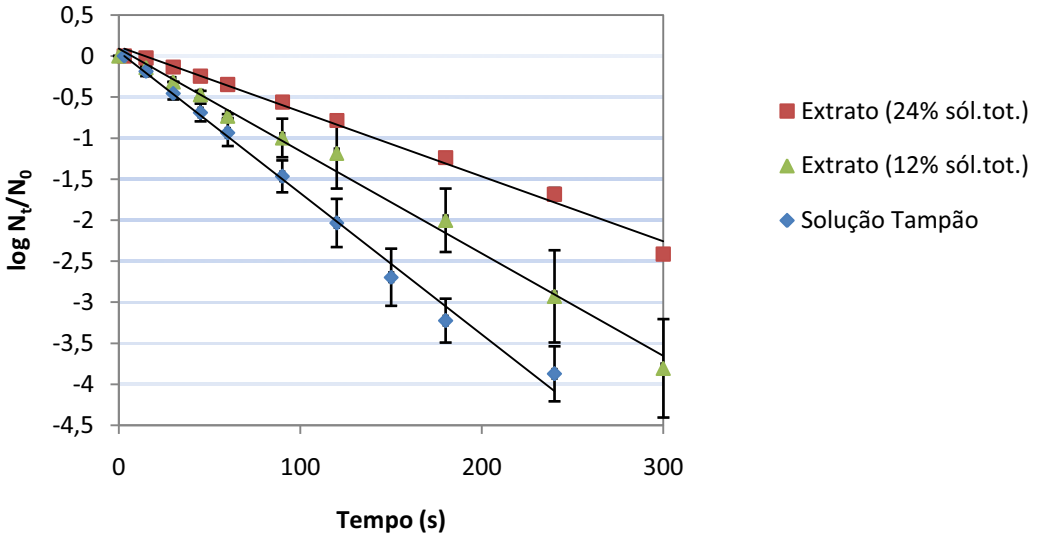
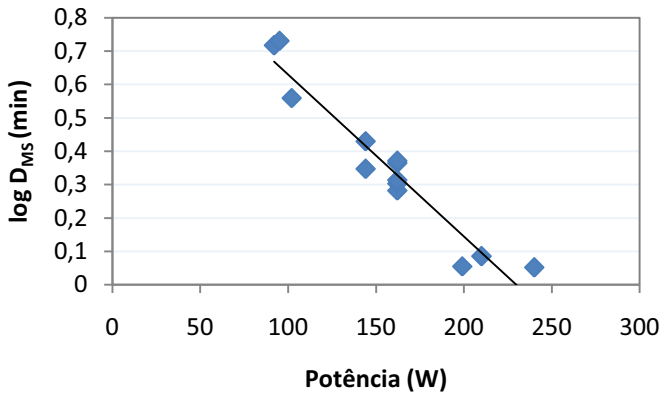


Figura 31 - Valor D_{MS} em função da potência aplicada ao meio.



Destaca-se que o nível de potência (máximo 240 W) do ultrassom em função da pressão e amplitudes utilizadas nos tratamentos do presente estudo, e consequentemente a potência transferida ao meio, foram superiores aos trabalhos publicados anteriormente, com máximo de 150 W (RASO et al., 1999; MAÑAS et al., 2000; ARROYO et al., 2011).

5.4 TRATAMENTO POR ULTRASSOM SOB PRESSÃO COM ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA - MANOTERMOSSONICAÇÃO (MTS)

5.4.1 Manotermossonicação (MTS) com o controle de temperatura

A Figura 32 apresenta as curvas de sobreviventes obtidas para os tratamentos do extrato de carne bovina desidratado diluído a 24% de sólidos totais tratados por ultrassom sob pressão com elevação e manutenção da temperatura nas condições experimentais investigadas (temperaturas de 40 a 60 ºC). Com base nas curvas de sobreviventes foram determinados os valores D_{MTS} como o tempo em minutos para a redução de um ciclo logarítmico (Tabela 8).

Figura 32 - Curvas de sobreviventes dos tratamentos de Manotermossonicação (MTS) em extrato de carne bovina desidratado nas diversas temperaturas.

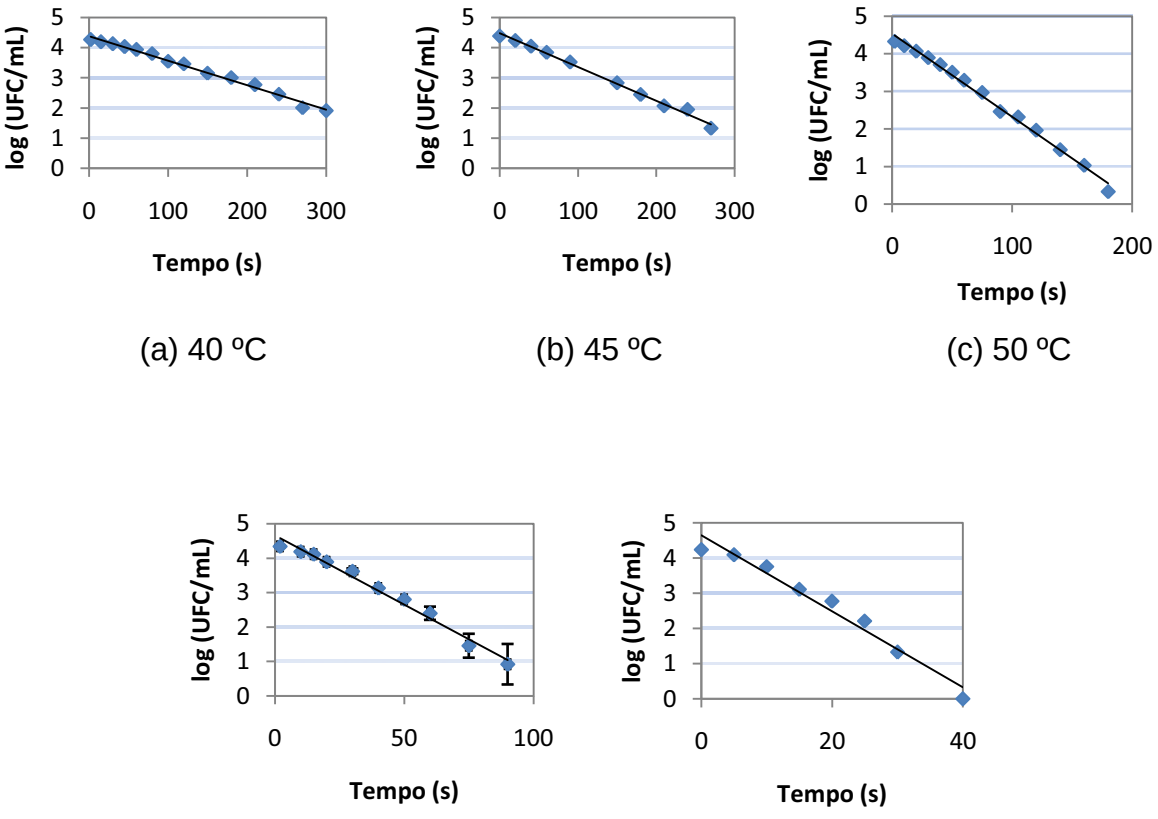


Tabela 8. Valores D_{MTS} para os tratamentos de manotermossonicação em extrato de carne bovina desidratado.

Experimento (figura)	Amplitude (dial)	Pressão (bar)	Temperatura (ºC)	D_{MS} (min)
(32-a)	4	2,5	40	2,25
(32-b)	4	2,5	45	1,57
(32-c)	4	2,5	50	0,80
(32-d)	4	2,5	55	0,43
(32-e)	4	2,5	60	0,16

5.4.2 Manotermossonicação (MTS) sem o controle de temperatura

A Figura 33 apresenta as curvas de sobreviventes obtidas para os tratamentos do extrato de carne bovina concentrado diluído a 24% de sólidos totais tratados por manossonicação (MS) e por manotermossonicação (MTS) sem o controle de temperatura (Figura 16). Pode-se observar que, mantendo-se a temperatura em torno de 35 ºC (Figura 14), as custas de um consumo de energia para refrigerar o meio e ter a MS isenta do efeito da temperatura, são necessários 5 minutos para reduzir 2 ciclos logarítmicos, enquanto que, em condições de temperatura não controlada (MTS sem o controle de temperatura), sem o gasto extra de energia com refrigeração, necessita-se apenas 1,5 minutos para reduzir 4 ciclos. Essa significativa diferença é explicada pelo efeito adicional e sinérgico exercido a partir de determinada temperatura, nesse caso, a partir de 60 segundos quando a temperatura atinge 60 ºC, como mostram as Figuras 16 e 33.

Devido ao menor tempo de tratamento na condição de temperatura não controlada, a ponta emissora (ou sonotrodo) sofre menos erosão e o resultado pode ser visto na Figura 34. O sonotrodo da esquerda é novo, o do meio foi utilizado nos experimentos com refrigeração e o da direita o utilizado nos experimentos sem refrigeração.

Figura 33 - Comparação dos tratamentos com e sem refrigeração.

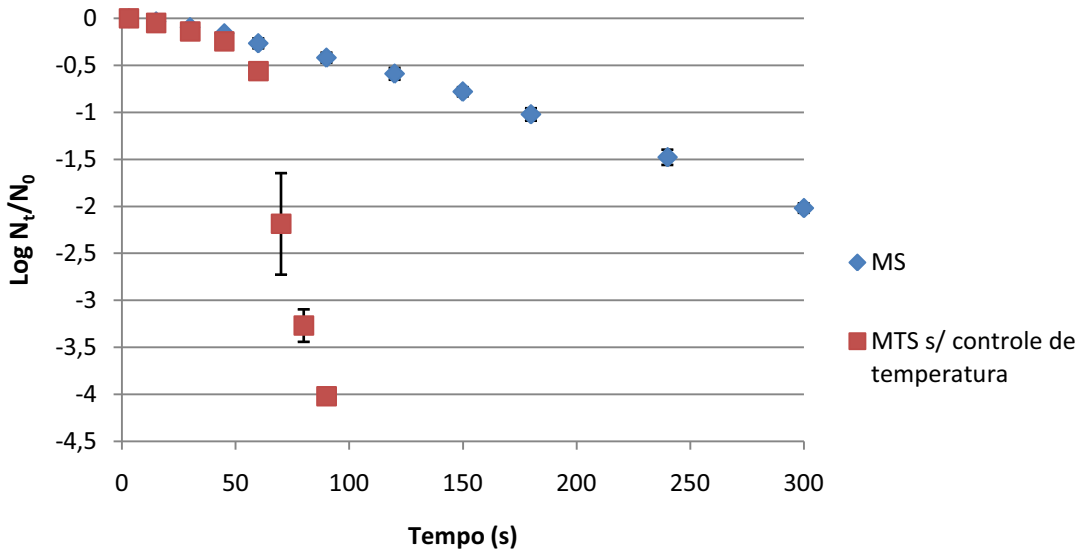
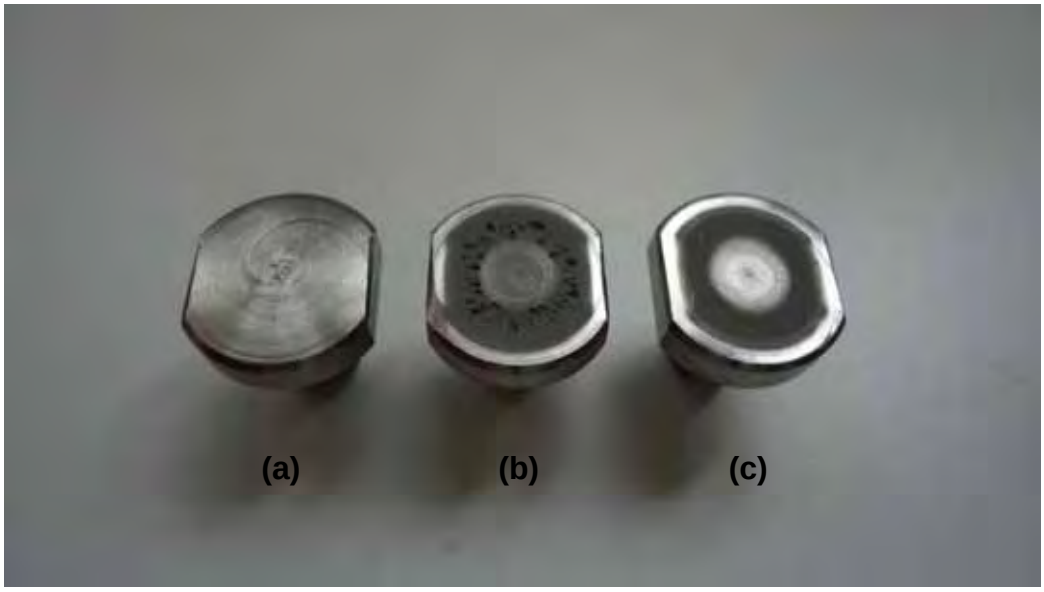


Figura 34 - Comparação entre sonotrodos: (a) novo; e os desgastados pelos experimentos (b) MS; (c) MTS.

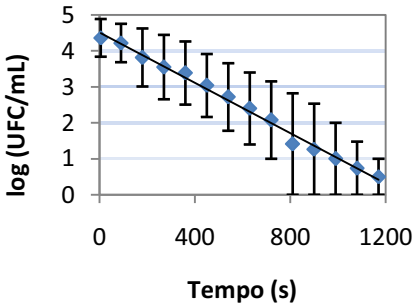


5.5 RESISTÊNCIA TÉRMICA DO MICRORGANISMO

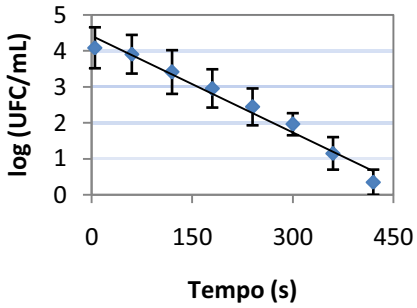
A Figura 35 apresenta as curvas de sobreviventes obtidas para o tratamento térmico do extrato de carne bovina desidratado diluído a 24% de sólidos totais nas condições de temperatura investigadas (53, 56, 59 e 62 ºC).

Com base nas curvas de sobreviventes foram determinados os valores D_T médios como o tempo em minutos para a redução de um ciclo logarítmico (Tabela 9).

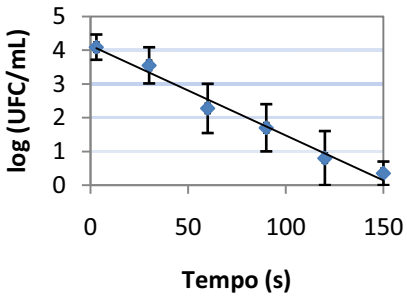
Figura 35 - Curvas de sobreviventes dos tratamentos térmicos em extrato de carne bovina desidratado nas diversas temperaturas.



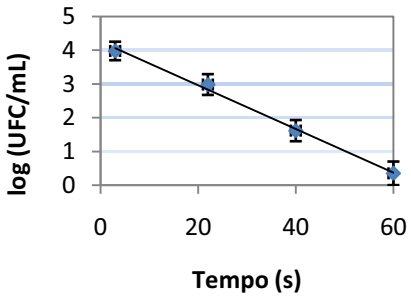
(a) 53 ºC



(b) 56 ºC



(c) 59 ºC



(d) 62 ºC

Tabela 9. Valores D_T médios para a *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina desidratado diluído a 24% de sólidos totais.

Temperatura (ºC)	D_T (min)
53	4,76
56	1,85
59	0,63
62	0,26

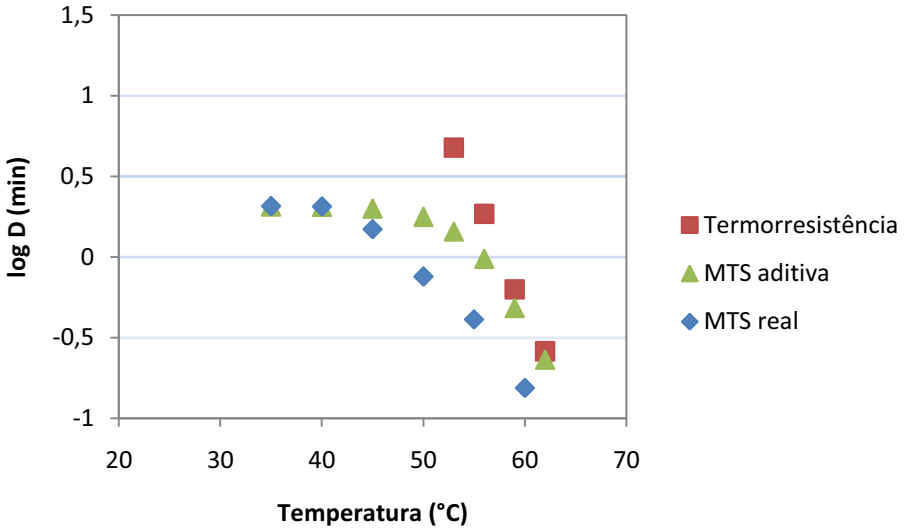
5.6 COMPARAÇÃO ENTRE MS, MTS e TERMORRESISTÊNCIA

Para avaliar eventual efeito sinérgico do ultrassom sob pressão e da temperatura, foi usada a expressão reescrita abaixo, sugerida por Raso e outros (1998a), a qual sugere efeito aditivo dos tratamentos.

$$D_{MTS\ calculado} = (D_T\ D_{MS})/(D_T + D_{MS}) \quad (21)$$

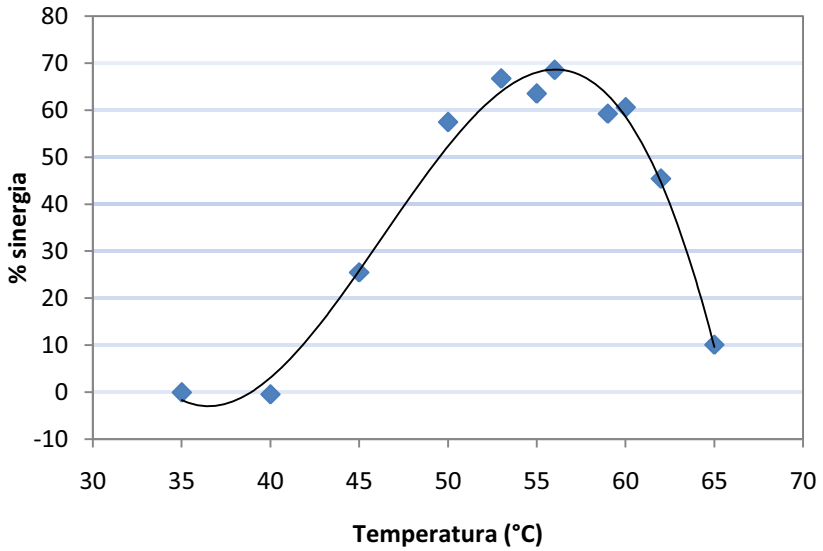
Os resultados obtidos nos tratamentos de manossonicação (MS), manotermossonicação (MTS) e termorresistência são mostrados comparativamente na Figura 36, na qual pode-se verificar que até a temperatura de 40 ºC, o efeito é devido somente a MS, sem influência da temperatura. Na temperatura de 45 ºC começa a aparecer um pequeno efeito térmico e entre 50 e 60 ºC há uma sinergia significativa. A partir desses dados, utilizando-se a Equação (22), pode-se calcular o efeito sinérgico para cada condição experimental. A Figura 37 apresenta os resultados de sinergia calculados com base na Equação (22).

Figura 36 - Comparação entre MS, MTS e Termorresistência.



$$\% \text{ sinergia} = [(D_{MTS\ (aditivo)} - D_{MTS\ real})/\ D_{MTS\ (aditivo)}]100 \quad (22)$$

Figura 37 - Porcentagem de sinergia entre calor e MS.



6 CONCLUSÕES

Nas condições operacionais utilizadas, os tratamentos de manossonicação (MS) indicaram que a pressão e a amplitude do ultrassom influenciam positivamente na redução da carga microbiana. Os tratamentos proporcionaram até 4 ciclos de redução logarítmica da população de *Listeria* após 5 minutos nas condições mais intensas (acima de 200W aproximadamente), potência essa que resultou em cerca de 8,7 W de potência efetivamente transferida para cada mililitro de meio tratado. Potências maiores parecem não agregar ao efeito letal de forma significativa.

Com a manotermossonicação (MTS) foi comprovada a grande influência da temperatura no tratamento; 2 ciclos de redução logarítmica em 5 minutos a 40 ºC versus 4 ciclos de redução em apenas 40 segundos a 60 ºC.

Os menores tempos de redução logarítmica obtidos foram D_{MS} de 1,12 min, determinado à 240W (pressão 3,5 bar e amplitude 6) para a manossonicação, e D_{MTS} de 0,16 min a 60 ºC (pressão 2,5 bar e amplitude 4) para a manotermossonicação.

Sem a refrigeração, além do ganho em eficiência do ultrassom em termos de redução na carga microbiana e redução do consumo de energia necessária para refrigerar o meio, a diminuição do tempo de tratamento resultou em menor desgaste do equipamento.

Quanto maior a concentração de sólidos no extrato de carne menor a inativação da bactéria investigada, sugerindo um certo efeito protetor dos sólidos presentes no meio.

A MTS mostrou ser mais eficiente entre 50ºC e 60ºC, temperatura relativamente baixa quando comparada com tratamentos térmicos convencionais, faixa na qual foi encontrada a máxima sinergia com a sonicação. Além disso, a redução dos tempos de tratamento e redução do desgaste do equipamento, devido à

intensa cavitação dos tratamentos, evidenciam a MTS como o tratamento mais eficaz.

Como conclusão geral, nas condições operacionais utilizadas, a manossonicação e a manotermosonicação mostraram ser tratamentos eficazes para destruição da *Listeria monocytogenes* em extrato de carne bovina.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar o efeito do uso de mais conjuntos de sonicação com mais emissores, dividindo a energia necessária entre eles e reduzindo seu desgaste, considerando que com níveis muito elevados de potência o equipamento sofre significativo desgaste e erosão da ponta emissora (sonotrodo).

Investigar um maior número de experimentos na faixa entre 6,5 W/ml (150W) e 13 W/ml (300 W), considerando o fato de que a partir da potência de 8,7 W/ml (200W) o efeito parece perder eficiência.

Pesquisas com os valores nutricionais e sensoriais antes e após os tratamentos em comparação com o tratamento térmico convencional poderiam definitivamente ampliar e consolidar o uso da MTS como técnica efetiva no processamento de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Disponível em: <www.abiec.com.br>. Acesso em: 20 ago. 2010.

ALLIGER, H. Ultrasonic disruption. *American Laboratory*, 1975.

ÁLVAREZ, I.; MAÑAS, P.; SALA, F.J.; CONDÓN, S. Inactivation of *Salmonella enterica serovar enteritidis* by ultrasonic waves under pressure at different water activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, v. 69, n° 1, p. 668-672.

ÁLVAREZ, I.; MAÑAS, P.; VIRTO, R.; CONDÓN, S. Inactivation of *Salmonella senftenberg* 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108, p. 218-225.

ARROYO, C.; CEBRIÁN, G.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 144, p. 446-454.

ARROYO, C.; CEBRIÁN, G.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by manothermosonication in buffer and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151, p. 21-28.

ARROYO, C.; CEBRIÁN, G.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S. Synergistic combination of heat and ultrasonic waves under pressure for *Cronobacter sakazakii* inactivation in apple juice. *Food Control*, 2012, 25, p. 342-348.

BIGELOW, W.D. The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infectious Diseases*, 1921, 29, p. 528-536.

BIRK, T.; KNØCHEL, S. Fate of food-associated bacteria in pork as affected by marinade, temperature and ultrasound. *Journal of Food Protection*. 2009, v. 72, n° 3, p. 549-555.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 304, de 22 de Abril de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 368, de 04 de Setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 26 de Agosto de 2003: Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Estratégico, 2009.

CHACÓN, D. et al. A procedure for the efficient selection of piezoelectric ceramics constituting high-power ultrasonic transducers. *Ultrasonics*, 2006, 44, p. e517-e521.

CHIVERS, R.C. Review Paper: Tissue characterization. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 1981, v. 7, p. 1-20.

CONDÓN, S.; ARRIZUBIETA, M.J.; SALA, F.J. Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology. *Journal of Microbiological Methods*, 1993, 18, p. 357-366.

CONDÓN, S.; RASO, J.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by ultrasound. In: Barbosa-Cánovas, G.V.; Tapia, M.S.; Cano, M.P. (Eds.), *Novel Food Processing Technologies*. Boca Ratón: CRC Press, 2005, p. 423-442.

CONDÓN, S.; MAÑAS, P.; CEBRIÁN, G. 2010. Manothermosonication for microbial inactivation. In: FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WEISS, J. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. 1. ed. New York: Springer, 2011, p. 287-319.

DAWSON, R.M.C. et al. *Data for Biochemical Research*. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974. 654 p.

DICKENS, J.A.; LYON, C.E.; WILSON, R.L. Effect of ultrasonic radiation on some physical characteristics of broiler breast muscle and cooked meat. *Poultry Science*, 1991, 70, p. 389-396.

DOLATOWSKI, Z.J.; STADNIK, J.; STASIAK, D. Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 2007*,* 6(3), p. 89-99.

FDA, U.S. Food and Drug Administration. Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies – Ultrasound, 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm103342.htm>. Acesso em: 24 mar. 2011.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WEISS, J. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. 1. ed. New York: Springer, 2011. 665 p.

FUENTE-BLANCO, S. et al. Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics*, 2006, 44, p. e523-e527.

GALLEGO-JUÁREZ, J.A. et al. Power ultrasonic transducers with extensive radiators for industrial processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2010, 17, p. 953-964.

GOSS, S.A.; JOHNSTON, R.L.; DUNN, F. Comprehensive compilation of empirical ultrasonic properties of mammalian tissues. *Journal of the Acoustical Society of America*. 1978, v. 64, n° 2, p. 423-457.

GOT, F. et al. Effects of high-intensity high-frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef. *Meat Science*, 1999, 51, p. 35-42.

HARVEY, E.N.; LOOMIS, A.L. The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *Journal of Bacteriology*, 1929, 17(5), p. 373-376.

JAYASOORIYA, S.D. et al. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: A Review. *International Journal of Food Properties*, 2004, v. 7, n° 2, p. 301-319.

KAYE, G.W.C.; LABY, T.H. Tables of physical and chemical constants: and some mathematical functions. 15. ed. Harlow, Essex: *Longman Scientific & Technical*, 1911. 477 p.

KLOTZ, B.; PYLE, L.; MACKEY, B.M. New mathematical modeling approach for predicting microbial inactivation by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, v. 73, n° 8, p. 2468-2478.

LANGEVIN, M. P. La théorie cinétique du magnétisme et les magnétons. In. *La Théorie du Rayonnement el les Quanta*. (Langevin, M.P. et Broglie, M.) – Rapports et Discussions de la Réunion tenue à Bruxelles, du 30 octobre au 3 novembre 1911, Paris, p. 393 – 406, 1912.

LYNG, J.G.; ALLEN, P.; MCKENNA, B. The influence of high intensity ultrasound bath on aspects of beef tenderness. *The Journal of Muscle Foods*, 1997, 8, p. 237-249.

LYNG, J.G.; ALLEN, P.; MCKENNA, B. The effect on aspects of beef tenderness of pre- and postrigor exposure to a high intensity ultrasound probe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 78, p. 308-314.

MAÑAS, P.; PAGÁN, R.; RASO, J. Predicting lethal effect of ultrasonic waves under pressure treatments on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 by power measurements. *Journal of Food Science*, 2000a, v. 65, n° 4.

MAÑAS, P.; PAGÁN, R.; RASO, J.; SALA, F.J.; CONDÓN, S. Inactivation of *Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium*, and *Salmonella senftenberg* by

ultrasonic waves under pressure. *Journal of Food Protection*, 2000b, v. 63, n° 4, p. 451-456.

MAÑAS, P.; MUÑOZ, B.; SANZ, D.; CONDÓN, S. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39, p. 1177-1182.

MASON, T.J.; PANIWNYK, J.P.; LORIMER, J.P. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1996, 3, S253-S260.

MASON, T.J.; Developments in ultrasound—Non-medical. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2007, 93, p. 166-175.

McCLEMENTS, D.J. Ultrasonic characterization of foods and drinks: principles, methods and applications. Critical Reviews in *Food Science and Nutrition*, 1997, 37, p. 1-46.

PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; SALA, F.J. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, v. 63, n° 8, p. 3225-3232.

PAGÁN, R.; MAÑAS, P.; RASO, J.; CONDÓN, S. Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999a, v. 65, n° 1, p. 297-300.

PAGÁN, R.; MAÑAS, P.; ALVAREZ, I.; CONDÓN, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 1999b, 16, p. 139-148.

PAGÁN, R.; MAÑAS, P.; PALOP, A.; SALA, F.J. Resistance of heat-shocked cells of *Listeria monocytogenes* to mano-sonication and mano-thermo-sonication. *Applied Microbiology*, 1999c, 28, p. 71-75.

PAGÁN, R.; MAÑAS, P.; RASO, J.; SALA, F.J. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media. *International Journal of Food Microbiology*, 1999d, 47, p. 59-66.

PIERCE, A.D. *Acoustics*: An Introduction to its Physical Principles and Applications. New York: Acoustical Society of America, 1981. 678 p.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 87, p. 207-216.

POHLMAN, F.W. et al. Effects of ultrasound and convection cooking to different end point temperatures on cooking characteristics, shear force and sensory properties, composition, and microscopic morphology of beef Longissimus and Pectoralis muscles. *Journal of Animal Science*, 1997a, 75, p. 386-401.

POHLMAN, F.W.; DIKEMAN, M.E.; KROPF, D.H. Effect of high intensity ultrasound treatment, storage time and cooking method on shear, sensory, instrumental colour and cooking properties of packaged and unpackaged beef pectoralis muscle. *Meat Science*, 1997b, 46 (1), p. 89-100.

POHLMAN, F.W.; DIKEMAN, M.E.; ZAYAS, J.F. The effects of low intensity ultrasound treatment on shear properties, colour stability and shelf-life of vacuum-packaged beef Semitendinosus and Biceps femoris muscle. *Meat Science*, 1997c, 45 (3), p. 329-337.

POSFAY-BARBE, K.M.; Wald, E.R. Listeriosis. *Pediatrics in Review*., 2004, 25, p. 151-159. In: Nufer, U.; Stephan, R.; Tasara, T. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes, Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 °C. *Food Microbiology*, 2007, 24, p. 444-451.

POVEY, M.J.W.; McCLEMENTS, D.J. Ultrasonics in food engineering: Introduction and experimental methods. *Journal of Food Engineering*, 1988, 8, p. 217-245.

POVEY, M.J.W. Ultrasonics in food engineering: Applications. *Journal of Food Engineering*, 1989, 9, p. 1-20.

POVEY, M.J.W. *Ultrasonic techniques for fluids characterization*. Leeds, UK: Academic Press, 1997. 214 p.

POVEY, M.J.W.; MASON, T.J. Ultrasound in food processing. *Thomson Science*, 1998.

RASO, J.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; SALA, F.J. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998a*,* v. 64, n° 2, p. 465-471.

RASO, J.; PALOP, A.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 1998b, 85, p. 849-854.

RASO, J.; MAÑAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1999*,* 5, p. 157-162.

RIERA, E. et al. M. High-power ultrasonic system for the enhancement of mass transfer in supercritical CO2 extraction processes. *Ultrasonics*, 2010, 50, p. 306-309.

ROBERTS, T.R. High intensity ultrasonics in food processing. *Society of Chemical Industry*, 1993, 4, p. 119-121.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1. ed. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

RODRÍGUEZ, G. et al. Experimental study of defoaming by air-borne power ultrasonic technology, *Physics Procedia*, 2010, 3, p. 135-139.

RONCALÉS, P. et al. Ultrasonication of lamb skeletal muscle fibres enhances postmortem proteolysis, *Z Lebensm Unters Forsch*, 1993, 196, p. 339-342.

SALA, F.J.; BURGOS, J.; CONDÓN, S.; LOPEZ, P.; RASO, J. Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In: GOULD, G.W. *New Methods of Food Preservation*. 2. ed. New York: Aspen Publishers, 1999. p. 176-204.

SCHERBA, G.; WEIGEL, R.M.; O´BRIEN, Jr. W.D. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, p. 2079–2084.

SMITH, N.B. et al. Tenderization of Semitendinosus muscle using high intensity ultrasound. *Ultrasonics Symposium*, 2, 1991, Orlando. p. 1371-1374.

SUSLICK, K.S. Sonochemistry. *Science*, 1990, 247, p. 1439-1445.

TORLEY, P.J.; BHANDARI, B.R. *Ultrasound in Food Processing and Preservation*, 2007.