

EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE A INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

FLÁVIA CONDE LAVINAS*
MARIA LÚCIA MENDES LOPES**
VERA LÚCIA VALENTE MESQUITA***

Efetuuou-se revisão da literatura sobre a aplicação da tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) na conservação de alimentos, seus efeitos sobre células vegetativas e esporos bacterianos, bem como a cinética de inativação dos microrganismos. Aspectos como a influência do nível, duração e temperatura do tratamento, tipo e idade dos microrganismos e composição do meio ou do alimento foram abordados. A APH, tecnologia não-térmica de processamento, é capaz de preservar as características nutricionais e sensoriais dos alimentos. Os estudos revisados evidenciaram que o processamento por APH apresenta eficiência comprovada na inativação de enzimas e microrganismos de interesse em alimentos e que, no entanto, alguns esporos bacterianos são resistentes ao tratamento. A APH constitui tecnologia de conservação promissora, que vem se destacando em nível mundial.

PALAVRAS-CHAVE: ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA; TRATAMENTO NÃO-TÉRMICO; CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS; INATIVAÇÃO MICROBIANA.

* Mestranda em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro (e-mail: flaconde@uol.com.br).

** Professora Assistente, Instituto de Nutrição Josué de Castro, UFRJ, Rio de Janeiro (e-mail: mlucia@nutricao@ufrj.br).

*** Professora Adjunta, Instituto de Nutrição Josué de Castro, UFRJ, Rio de Janeiro (e-mail: valentem@nutricao.ufrj.br).

1 INTRODUÇÃO

A exigência dos consumidores por produtos com alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias que propiciem segurança microbiológica e aumento de sua vida útil, com o mínimo de alteração na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (COSTA, DELIZA e ROSENTHAL, 1999). Tecnologias alternativas vêm sendo desenvolvidas para substituir processos que envolvem tratamentos térmicos, que podem acarretar perdas nutricionais e desenvolvimento de características sensoriais indesejáveis. Nesse sentido, as pesquisas têm demonstrado que o tratamento por alta pressão hidrostática (APH) permite a obtenção de produtos com elevada qualidade e grande capacidade de preservação, sem a utilização de aditivos químicos (PARK, LEE e PARK, 2002; SGROPPO, ANCOS e CANO, 2002).

A APH, tecnologia não-térmica, apresenta grande potencial de uso no processamento de alimentos. Sua aplicação pode estender a vida útil dos alimentos e promover alterações desejáveis na textura com a vantagem de manter sua cor, sabor e valor nutritivo. Além disto, é reconhecida a eficiência desse tratamento sobre os microrganismos (SANGRONIS et al., 1997).

O primeiro produto processado por APH foi introduzido no mercado japonês em 1990 e, gradualmente, outros alimentos processados por essa técnica surgiram em outros países. No mercado americano foi lançada com sucesso a pasta de abacate tratada por pressão (Guacamole) (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003). Na França, sucos de laranja e uva processados por APH estão disponíveis no mercado. De acordo com SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON (2002), a vida-de-prateleira de sucos de frutas não-tratados foi estendida de 5 a 8 dias para aproximadamente três semanas quando pressurizados e mantidos estocados sob refrigeração. Como os sucos de frutas apresentam baixo pH e características sensoriais que são degradadas quando submetidas ao tratamento térmico, esses produtos são indicados para preservação pelo tratamento de APH (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

Apesar do tratamento por APH em alimentos ter apresentado grande evolução, constituindo alternativa prática ao tratamento térmico, seu custo ainda é elevado (COELHO, 2002). Com o desenvolvimento tecnológico, a perspectiva é de que esses custos se tornem mais acessíveis possibilitando o surgimento no mercado de maior número de produtos submetidos a esse tratamento (SMELT, 1998). Desta forma, a APH apresenta grande potencial de utilização em nível industrial (DELIZA et al., 2005).

O objetivo desta revisão foi apresentar aspectos relacionados à aplicação da tecnologia de APH na conservação de alimentos, seus efeitos sobre células vegetativas e esporos bacterianos, bem como a cinética de inativação de microrganismos por ação da APH.

2 TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

A APH, como método para processar e conservar alimentos, é conhecida desde o século XIX. Entretanto, estudos relacionados com essa tecnologia foram intensificados somente na década de 80 (COSTA, DELIZA e ROSENTHAL, 1999; ARROYO e PRESTAMO, 1996). O desenvolvimento da APH para produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial e plásticos aumentou a possibilidade de sua utilização na área de alimentos (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

O processamento por APH consiste em submeter o produto à pressão hidrostática de 100 a 1000 MPa (equivalentes a 1000 e 10000 atmosferas, respectivamente), acima daqueles comumente empregados nos tratamentos convencionais. Essa tecnologia pode, ainda, ser combinada com o uso de temperatura positiva ou negativa (ZIMMERMAN e BERGMAN, 1993).

Para compreender os efeitos da APH sobre os alimentos é necessário conhecer dois princípios básicos. Pelo princípio isostático a pressão é transmitida de maneira uniforme e instantânea por todo o alimento, independente da sua forma, tamanho ou volume. Difere do tratamento térmico em que a penetração de calor depende do tempo de exposição e da geometria do produto (CHEFTEL, 1995). O

princípio de Le Chatelier estabelece que modificações na pressão podem acelerar ou retardar reações químicas se acompanhadas por diminuição ou aumento de volume, respectivamente (CHEFTEL e CULIOLI, 1997).

Existem três tipos de processos básicos de tratamento de APH, com ou sem variação de temperatura (SANGRONIS et al., 1997; MERTENS e DEPLACE, 1993):

- processos em que se aplicam pressões de 50-600 MPa e baixas temperaturas, denominados de pressão isostática a frio. Técnica essencialmente utilizada nas indústrias de metal, cerâmica, carbono-grafite e plásticos, alcançando maior aplicação na indústria de alimentos;
- processos nos quais a pressão é aplicada em combinação com temperaturas que variam entre 25 e 200°C, denominados de pressão isostática em média temperatura;
- processos em que se aplicam pressões de 100 a 400 MPa em combinação com temperaturas que podem chegar a 2.200°C, denominados de pressão isostática em alta temperatura. Processo aplicado nas indústrias de metais e de cerâmicas.

Os primeiros equipamentos desenvolvidos para a indústria de cerâmicas sofreram modificações a fim de se adequarem ao processamento de alimentos. O tempo de processamento foi aumentado, passando de 10 segundos a 1 minuto para 5 a 10 minutos em pressões superiores a 400 MPa (SANGRONIS et al., 1997).

O sistema de APH consiste de vaso de pressão, gerador de pressão, fluido condutor de pressão, dispositivo de controle de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998). O vaso de pressão, cerne do sistema, em muitos casos é um cilíndrico monolítico, construído em aço inoxidável de alta resistência à tensão. Determina-se a espessura da parede desse vaso pela pressão máxima de trabalho, diâmetro do vaso e pelo número de ciclos para o qual é projetado. Diferentes mecanismos para o fechamento do vaso podem ser usados, dependendo da aplicação a que se destina (MERTENS, 1995). Uma vez carregado e fechado, o vaso é preenchido com o meio de pressurização que na maioria dos casos consiste de água misturada com pequena percentagem de óleo solúvel para fins de lubrificação e anticorrosão. Após remoção de todo o ar do vaso, a APH é gerada por compressão direta, indireta ou aquecimento do meio de pressurização (MERTENS e DEPLACE, 1993). No sistema de compressão direta, o vaso é preenchido com o meio pressurizante, comprimido por pistão de grande diâmetro e movido por bomba de baixa pressão. No sistema de compressão indireta, um intensificador de alta pressão é utilizado para bombear o meio de pressão do reservatório para o vaso até que se alcance o nível de pressão desejado. Esse é o método mais empregado em escala industrial e seu efeito adquire maior intensidade quando combinado com alta temperatura (SANGRONIS et al., 1997).

No tratamento por APH, o produto é embalado em garrafas ou recipientes plásticos que são selados e colocados no interior do vaso de pressão. Ao final do processamento, o vaso é descomprimido, retira-se o produto tratado e o equipamento está pronto para começar novo ciclo (SANGRONIS et al., 1997). Produtos líquidos podem ser submetidos à pressão mediante sistema semicontínuo (fora da embalagem), constituído de três vasos de pressão e sistema de válvulas automáticas. Após o processamento, o produto é envasado assepticamente (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

O uso mais freqüente da APH no processamento de alimentos tem sido a esterilização comercial, com conseqüente prolongamento da vida-de-prateleira. Essa tecnologia permite várias aplicações para a indústria de alimentos como, desnaturação de proteínas e enzimas, redução da temperatura de congelamento e de descongelamento, extração de substâncias orgânicas e controle de reações químicas e sínteses orgânicas (VARDAG, DIERKES e KORNER, 1995). O processamento por alta pressão também pode induzir mudanças relevantes na textura dos alimentos (resultantes da redução no volume e de mudanças no pH) e na constante de solubilidade de seus componentes (WILLIAMS, 1994).

A preservação de vitaminas e compostos responsáveis pelo aroma e sabor se deve ao fato da APH

destruir ligações iônicas, hidrofóbicas e de hidrogênio dos alimentos, sem afetar as ligações covalentes. Somente ligações responsáveis pela estabilização de estruturas tridimensionais de moléculas como proteínas e polissacarídeos são alteradas (ALPAS e BOZOGLU, 2003; ROSENTHAL e SILVA, 1997).

3 EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE OS MICRORGANISMOS

Os primeiros estudos que avaliaram o efeito da pressão hidrostática sobre microrganismos em alimentos foram realizados na França, por CERTES, em 1884, e nos Estados Unidos, por HITE, entre 1899 e 1914. A partir de então, outros pesquisadores têm se dedicado ao estudo da APH em alimentos (CHEFTEL, 1995).

O tratamento de APH pode garantir a destruição de até 8 ciclos logarítmicos de células bacterianas, sem alterar o sabor e o valor nutricional dos alimentos (DOGAN e ERKMEN, 2004; KALCHAYANAND et al., 1998).

A APH produz alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que ocorrem na membrana e na parede celular dos microrganismos (SANGRONIS et al., 1997). Além disso, aumenta a permeabilidade da célula, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução de microrganismos (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998). Embora muitos estudos abordem o efeito da APH sobre os microrganismos, as causas da inativação microbiana são ainda pouco compreendidas (CHEFTEL, 1995). Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão como compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares, coagulação de proteínas citoplasmáticas e liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular, entre outros (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

Uma hipótese para inativação microbiana por APH está ligada à redução da atividade da ATPase, dependente de sódio e potássio, localizada na capa de fosfolípidios da membrana celular e envolvida no transporte ativo através da membrana. Desta forma, a ATPase torna-se incapaz de manter o efluxo de prótons provocando redução do pH interno e causando a morte celular (CHEFTEL, 1995).

As moléculas de DNA são mais estáveis à APH do que as proteínas devido ao fato da alta pressão favorecer as pontes de hidrogênio, principal responsável pela estrutura dos ácidos nucléicos. Contudo, o processo de replicação e transcrição do DNA é inibido quando as células são submetidas à APH pela inativação das enzimas envolvidas nesses processos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999).

As condições de inativação de vários microrganismos por APH podem ser observadas pelos exemplos constantes do Quadro 1.

3.1 CÉLULAS VEGETATIVAS

A capacidade de destruição ou inativação de microrganismos pelo processo de APH varia conforme o nível, o tempo e a temperatura de pressurização, tipo e fase de crescimento do microrganismo, além da composição do meio ou do alimento (pH e atividade de água) (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998; ROSENTHAL e SILVA, 1997). Os fatores que influenciam a inativação dos microrganismos devem ser conhecidos e otimizados a fim de se obter produto com qualidade e seguro sob o ponto de vista microbiológico (SANGRONIS et al., 1997).

3.1.1 Nível e duração do tratamento de alta pressão hidrostática

Nível de pressão elevado, geralmente, leva ao aumento da inativação dos microrganismos. Entretanto, o aumento da duração do tratamento de alta pressão não potencializa necessariamente

seu efeito letal (PALOU et al., 1999). DOGAN e ERKMEN (2003) mostraram que a sensibilidade de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e submetida à APH foi maior com a elevação do nível de pressão do que com o aumento do tempo de exposição ao tratamento. Entretanto, não existe relação proporcional entre o aumento do nível de pressão e a redução da população microbiana. KALCHAYANAND et al. (1998) sugeriram que a pressurização por longo tempo associada com baixo nível de pressão, utilizado para minimizar efeitos adversos na textura e cor do alimento, pode não ser vantajosa para a inativação microbiana.

QUADRO 1 - EXEMPLOS DE INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Microorganismo	Substrato	Tratamento	Inativação (ciclos logarítmicos)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leite de vaca	500 MPa , 15 min, 25°C	3,4
	Leite UHT	600 MPa, 30 min, 20°C	3,0
	Tampão fosfato	600 MPa, 15 min, 20°C	2,2
	Tampão fosfato	400 MPa, 20 min, 20°C	9,0
	Carne de vaca	500 MPa, 15 min, 55°C	2,0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Suco de laranja (pH 3,9)	550 MPa, 5 min, 30°C	7,0
	Carne de ave	700 MPa, 30 min, 20°C	3,0
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Leite	500 MPa, 15 min, 20°C	1,4
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Tampão fosfato	375 MPa, 15 min, 20°C	2,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 2433	Tampão fosfato	375 MPa, 15 min, 20°C	6,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Geléia de maçã	200 MPa, 5 min, 20°C	2,8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite UHT	340 MPa, 60 min, 23°C	7,0
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	ovo	450 MPa, 10 min, 20°C	6,63
<i>Salmonella typhimurium</i>	Tampão fosfato	400 MPa, 15 min, 20°C	6,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	Tampão fosfato	500 MPa, 1 min, 20°C	7,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Molho de espaguete	253 MPa, 10 min, 25°C	3,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne suína	30 MPa, 10 min; 25°C	6,0

Fonte: SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002; PATTERSON et al., 1995

3.1.2 Temperatura durante o tratamento de alta pressão hidrostática

A temperatura durante o tratamento de APH pode exercer diferentes efeitos sobre a inativação das células microbianas. Alguns autores observaram maior resistência de células microbianas endógenas, ou inoculadas, quando submetidas à pressão em temperaturas entre 15 e 30°C. Já a resistência decresce, significativamente, abaixo ou acima dessa faixa de temperatura (CHEFTEL, 1995; CARLEZ, ROSEC e CHEFTEL, 1993; SMELT e RIJKE, 1992). ALPAS e BOZOGLU (2003) demonstraram que o tratamento com 350 MPa a 40°C apresentou grande potencial de inativação de *Listeria monocytogenes* CA inoculada em diferentes sucos de frutas. Para TEO, RAVISHANKAR e SIZER (2001), o tratamento com 615 MPa /2 minutos a 15°C exerceu efeito potencial na inativação de estirpes de *Escherichia coli* O157:H7 e espécies de *Salmonella* inoculadas em sucos de uva, laranja e cenoura.

A menor resistência de células vegetativas, submetidas a APH em temperaturas inferiores a 5°C, pode ser devida a mudanças na estrutura e fluidez da membrana pelo enfraquecimento de interações hidrofóbicas e cristalização dos fosfolipídios. Por outro lado, a associação com temperaturas de aquecimento entre 40 e 60°C pode, também, garantir a inativação de microrganismos em níveis de pressão mais baixos (PALOU et al., 1999). Nesse sentido, ALPAS et al. (1999) mostraram que a

combinação de pressão de 345 MPa com temperatura de 50°C pode ser usada na inativação de algumas estirpes de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* com redução de mais de 6 ciclos logarítmicos. CHEN e HOOVER (2003) relataram inativação de 8 ciclos logarítmicos de *Listeria monocytogenes* Scott A inoculada em leite UHT, submetido a 500 MPa por 5 minutos a 50°C. Para alcançar esse mesmo grau de inativação a 22°C sob o mesmo nível de pressão foram necessários 35 minutos de tratamento. BAYMDIRLI et al. (2006) estudaram a eficiência da APH na inativação de *Staphylococcus aureus* 485, *Escherichia coli* O157:H7 933 e *Salmonella enteritidis* FDA inoculados em sucos de maçã, laranja, damasco e cereja ácida. Demonstraram que a combinação do tratamento com 350 MPa, por 5 minutos, a 40°C reduziu mais de 8 ciclos logarítmicos de todos os microrganismos. IWAHASHI et al. (1991) observaram que choque térmico a 51°C, por 10 minutos, protegeu células de *Saccharomyces cerevisiae* em posterior tratamento por pressão a 150 MPa.

A aplicação de tratamentos com níveis de pressão mais baixos e/ou por curto período de tempo torna possível o uso de equipamentos mais baratos com considerável diminuição do custo de operação (CHEFTEL, 1995).

3.1.3 Tipo e idade dos microrganismos

Em geral, células bacterianas vegetativas podem ser inativadas em pressões entre 400 e 600 MPa, enquanto que os esporos (formas mais resistentes) podem suportar até 1000 MPa em temperatura ambiente (PALOU et al., 1999). Segundo alguns autores, o efeito letal da APH sobre as células vegetativas é provocado pela ionização e concomitante precipitação de complexos protéicos (SANGRONIS et al., 1997).

As bactérias Gram positivas são mais resistentes aos efeitos da APH do que as Gram negativas. Os fungos filamentosos e leveduras são muito sensíveis, enquanto que os vírus são bastante resistentes (CHEFTEL, 1995). A parede celular das bactérias Gram positivas é mais fina (apresentam membrana externa), quando comparada com a estrutura das Gram negativas. A rigidez da parede celular confere fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade frente à aplicação da APH (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003). EARNSHAW (1995) relatou que o *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais resistente entre as bactérias Gram positivas e pode sobreviver a tratamentos com 500 MPa por mais de 60 minutos. Outro patógeno resistente à pressão é a *Escherichia coli* O157: H7. TAKAHASHI et al. (1993) demonstraram que para reduzir 6 ciclos logarítmicos desse microrganismo é necessário tratamento com 700 MPa por 13 minutos.

Algumas estirpes de microrganismos patogênicos são mais resistentes à APH do que outras da mesma espécie (ALPAS et al., 2000). ALPAS et al. (1999) estudaram a resistência de estirpes de quatro patógenos veiculados por alimentos (*Staphylococcus aureus* 485 e 765, *Listeria monocytogenes* CA e OH₂, *Escherichia coli* O157: H7 933 e 931, *Salmonella enteritidis* FDA e *Salmonella typhimurium* E21274). Mostraram que *S. aureus* 484, *L. monocytogenes* CA, *E. coli* O157: H7 933 e *S. enteritidis* FDA foram mais resistentes à pressão do que as outras estirpes da mesma espécie. ALPAS e BOZOGLU (2003) evidenciaram que a perda de viabilidade variou de 0,92 a 3,53 ciclos logarítmicos entre nove estirpes de *Listeria monocytogenes*, inoculadas em água peptonada a 1%, quando submetidas ao tratamento com 350 MPa a 25°C por 5 minutos.

Embora CHEFTEL (1995) mencione que a flora endógena é mais resistente à APH do que os microrganismos inoculados no alimento, MUSSA, RAMASWAMY e SMITH (1999) demonstraram que *Listeria monocytogenes* Scott A inoculada em leite cru apresentou maior resistência à pressão do que a flora natural do leite.

A idade dos microrganismos influencia sua taxa de inativação por APH (SAN-MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002). Microrganismos em fase de crescimento logarítmico são mais sensíveis à APH. De acordo com PALOU et al. (1998), isto provavelmente se deve ao fato dos

microrganismos na fase estacionária apresentarem tamanho pequeno e esférico em comparação com a forma alongada que assumem durante o crescimento logarítmico. Esses autores observaram aumento na resistência ao tratamento com APH de células de *Zygosaccharomyces bailii* na fase de crescimento estacionária, quando comparada com células na fase exponencial. MACKEY, FORESTIÈRE e ISSACS (1995) relataram que células de *Listeria monocytogenes*, inoculadas em meio de cultura e expostas a 200 MPa de pressão, foram mais sensíveis na fase de crescimento exponencial que na estacionária. Após 10 minutos a 400 MPa, o número de células viáveis na fase exponencial foi reduzido em 7 ciclos logarítmicos e em apenas 1,3 ciclos logarítmicos na fase estacionária.

3.1.4 Composição do meio ou alimento

A sensibilidade dos microrganismos à alta pressão depende do meio em que se encontram. Microrganismos classificados como sensíveis à alta pressão (mediante estudos com tampões) podem ser resistentes a esse tratamento, quando presentes em alimentos (GARCIA-GRAELLS, MASSEHALEK e MICHIELS, 1999). Os constituintes dos alimentos e de meios enriquecidos parecem proteger os microrganismos do efeito da APH, enquanto que soluções não-nutritivas parecem reduzir a barotolerância dos microrganismos (DOGAN e ERKMEN, 2003; PALOU et al., 1999). PATTERSON et al. (1995) sugeriram que proteínas, vitaminas e carboidratos fornecem proteção às células microbianas. STYLES, HOOVER e FARPAS (1991) mostraram que a inativação de *Listeria monocytogenes* foi mais eficaz em meio de cultura do que em leite. Entretanto, PRÉSTAMO et al. (1999) relataram que o nível de pressão necessário para inativar esse microrganismo inoculado em geléia de maçã ou ameixa não foi maior do que em meio de cultura. De acordo com o trabalho de DOGAN e ERKMEN (2004), o tratamento com APH foi menos efetivo sobre a *Listeria monocytogenes* e bactérias aeróbicas em leite do que em meio de cultura e sucos de frutas. Sugeriram que o teor de proteínas e lipídios presente no leite aumenta a resistência das bactérias ao tratamento. SOLOMON e HOOVER (2004) investigaram a resposta ao tratamento com APH de *Campylobacter jejuni* ATCC 35919 e 35921 inoculados em meio de cultura, tampão fosfato e em alguns alimentos (leite de vaca, extrato solúvel de soja e purê de galinha). Observaram que os alimentos ofereceram efeito protetor aos microrganismos e que foi necessário nível de pressão adicional de 50 a 75 MPa para atingir inativação similar à obtida em meio de cultura e tampão fosfato. SMIDDY et al. (2005) compararam a resistência de bactérias Gram negativas (*Vibrio mimicus* 9583 e *Escherichia coli* O157: H45) e Gram positivas (*Listeria innocua* MP2418 e *Listeria monocytogenes* LO28) inoculadas em ostras e tampão fosfato salino. Verificaram que com nível de pressão maior do que 400 MPa, a inativação de todas as bactérias estudadas foi menor nas ostras do que na solução. Desta forma, é importante ressaltar que nem todos os resultados obtidos em tampões ou meios laboratoriais podem ser extrapolados para tratamentos em alimentos.

Em baixo pH, os microrganismos geralmente tornam-se mais sensíveis à inativação por APH enquanto a recuperação de células injuriadas por esse tratamento é dificultada (FDA, 2000). Além do pH, efeitos não-específicos de ácidos orgânicos foram observados e podem ser justificados pelo favorecimento da ionização (causada pela pressão), bem como pelo fato dos ácidos orgânicos serem inibidores na forma não-dissociada (SMELT, 1998). MACKEY, FORESTIÈRE e ISSACS (1995) observaram que a redução do pH de meio inoculado com *Listeria monocytogenes* causou aumento na sensibilidade das células à APH. De acordo com esses autores não foi observada inativação em pH 7,1 após aplicação de 300 MPa por 10 minutos. Já em pH 5,3, o mesmo tratamento reduziu o número de células viáveis em torno de 1,8 ciclos logarítmicos. JORDAN et al. (2001) observaram, após tratamento a 500 MPa, redução de 5 ciclos logarítmicos em estirpes de *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes* inoculadas em suco de maçã (pH = 3,5) e suco de tomate (pH = 4,1) e de apenas 1 a 2 ciclos logarítmicos em suco de laranja (pH = 3,8). Afirmaram que diferenças na sobrevivência dos microrganismos inoculados nos sucos não devem ser atribuídas somente às variações de pH e que a maior inativação obtida em suco de tomate, comparada ao suco de laranja, pode ser atribuída à

presença de 0,7% de NaCl no primeiro.

OXEN e KNORR (1993) relataram que a baixa atividade de água (a_w) geralmente proporciona efeito protetor nas células, tornando-as mais resistentes ao tratamento com APH. Observaram que a 400 MPa, por 15 minutos e em temperatura ambiente, maior número de células de *Rhodotorula rubra* foi inativado em a_w acima de 0,96. Segundo KNORR, citado por PALOU et al. (1999), o aumento da barorresistência de microrganismos em baixa a_w pode ser atribuído à desidratação parcial da célula. Isso se deve ao gradiente de pressão osmótica entre os fluídos internos e externos, que pode resultar em células pequenas e membranas espessas. O desenvolvimento de tratamentos de APH que garantam a estabilidade microbiológica dos alimentos depende da compreensão da relação entre os microrganismos e os componentes dos alimentos (DOGAN e ERKMEN, 2003).

3.1.5 Recuperação microbiana após tratamento sob alta pressão hidrostática

Tem sido relatado na literatura que dependendo do tipo de microrganismo e do nível de pressão aplicado, algumas células bacterianas sobrevivem ao processamento e outras são inativadas ou sofrem diferentes níveis de injúria (BOZOGLU, ALPAS e KALETUNÇ, 2004). A incompleta inativação dos microrganismos por APH pode resultar em células injuriadas com capacidade de recuperação em condições ótimas de crescimento durante o armazenamento (FDA, 2000). A recuperação dos microrganismos é importante para alimentos com baixa acidez tratados por APH, uma vez que se pode subestimar a segurança desses durante a estocagem. Por outro lado, em alimentos muito ácidos a injúria não pode ser reparada (BOZOGLU, ALPAS e KALETUNÇ, 2004). RUSSELL (2002) mostrou completa recuperação de *Listeria monocytogenes* durante a estocagem a 4°C com aplicação de níveis de pressão entre 450 e 550 MPa. Nesse caso, a recuperação da bactéria em temperatura de refrigeração foi associada com sua natureza psicotrófica.

3.2 ESPOROS BACTERIANOS

Um dos desafios na preservação de alimentos por APH é a inativação de esporos bacterianos, uma vez que são muito resistentes (LECHOWICH, 1993). Tal resistência é creditada à estrutura e espessura da capa protetora dos esporos, considerando que suas proteínas estão protegidas pelo ácido dipicolínico que impede a solvatação, a excessiva ionização e a conseqüente precipitação das mesmas. De acordo com SANGRONIS et al. (1997) a aplicação de alta pressão pode não ser suficiente para inativar os esporos, por isso tem sido empregada em combinação com temperaturas mais elevadas. A inativação de esporos requer germinação prévia, obtida mediante aplicação de níveis de pressão menores que os utilizados no processamento propriamente dito. Posteriormente, o alimento é submetido a pressões mais elevadas para inativação das células vegetativas (COSTA, DELIZA e ROSENTHAL, 1999). BUTZ et al. (1990) investigaram os efeitos de níveis de pressão entre 150-400 MPa e temperaturas entre 25 e 40°C sobre os esporos. Verificaram que o pré-tratamento, num nível de pressão relativamente baixo (60-100 MPa) foi eficaz na inativação dos esporos.

Vários autores têm relatado o efeito da combinação de pressão e temperatura elevadas sobre a inativação de esporos. REDDY et al. (1999) demonstraram redução de 5 ciclos logarítmicos de esporos de *Clostridium botulinum* tipo E, após o processamento a 827 MPa por 5 minutos a 55°C. LEE, DOUGHERTY e KANG (2002) relataram que esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, inoculados em suco de maçã, foram inativados pela combinação de alta pressão (207 a 621 MPa) com temperaturas elevadas ou moderadas (45, 71, ou 90°C), pois somente a APH não foi suficiente para reduzir o número desses esporos. BARRAUD et al. (2004) relataram associação sinérgica entre a APH e o calor e verificaram a inativação de esporos de *Bacillus antracis* com valor D de aproximadamente 4 minutos, a 500 MPa e 75°C, comparado a 160 minutos a 500 MPa e 20°C. A inativação foi maior com tratamento de 280 MPa a 45°C do que com tratamento de 500 MPa a 20°C.

O pH, a atividade de água e a presença de nutrientes afetam a resistência dos esporos a altas pressões. A inativação dos esporos é maior próxima à neutralidade, já que sua germinação (induzida pela pressão) é maior nessa faixa de pH (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999). A presença de solutos, como NaCl e mais efetivamente CaCl₂, diminui a inativação de esporos por APH (SALE, GOULD e HAMILTON, 1970).

3.3 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A cinética de inativação de microrganismos pelo calor tem sido extensivamente pesquisada. Entretanto, são limitados os estudos relacionados à cinética de inativação por APH, especialmente em condições de aplicação simultânea de alta pressão e outras técnicas de processamento (BUZRUL e ALPAS, 2004). PALOU et al. (1999) observaram em estudos com diferentes microrganismos, que a cinética de inativação por APH mostrou-se bastante variável. Alguns autores sugerem que essa seja de primeira ordem, em que $\log(N/N_0) = -kt$. O N corresponde ao número de microrganismos sobreviventes após o tratamento de APH por determinado tempo t (minutos), o N₀ ao número inicial de microrganismos e k à taxa constante de inativação (minuto⁻¹) (PALOU et al., 1999). DOGMAN e ERKMEN (2004) analisaram a cinética de inativação por APH de *Listeria monocytogenes* inoculada em meio de cultura, leite fresco e em sucos de laranja e de pêssego. Demonstraram que o logaritmo do número de células reduziu-se linearmente com o tempo do tratamento, indicando cinética de primeira ordem. A bactéria foi inativada mais rapidamente com o aumento do nível de pressão. Esses mesmos autores mostraram que a inativação de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e nos mesmos alimentos, também obedeceu à cinética de primeira ordem em níveis de pressão entre 300 e 700 MPa. Outros autores sugeriram padrão de inativação com ocorrência de duas fases. Na primeira, a população de microrganismos é inativada mais rapidamente e na segunda os microrganismos apresentam alta resistência à pressão (SOLOMON e HOOVER, 2004). AOYAMA et al. (1995), estudando a cinética de inativação por APH de leveduras inoculadas em tampão fosfato, mostraram que a curva de sobrevivência foi sigmóide entre 300 e 350 MPa e tendeu à linearidade quando o nível de pressão aumentou. Alguns trabalhos indicam que o modelo linear não é apropriado para a descrição dos dados (CHEN e HOOVER, 2003; CHEFTEL, 1995).

Na indústria de alimentos, os valores D (taxa decimal de inativação) e Z (constante de resistência) são freqüentemente usados como constantes na cinética de inativação (DOGMAN e ERKMEN, 2004). Esses parâmetros de inativação microbiológica por APH são análogos aos utilizados em termobacteriologia, em que D é o tempo necessário de tratamento em determinada pressão para reduzir em um ciclo logarítmico a população de microrganismos. Já o valor Z corresponde ao aumento necessário na pressão de tratamento para reduzir em um ciclo logarítmico o valor de D (PARISH, 1998).

4 CONCLUSÃO

A tecnologia de APH apresenta reconhecido potencial de aplicação no processamento de alimentos, não apenas com objetivo de conservação, mas para modificar a funcionalidade e melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos. Essa tecnologia apresenta comprovada eficiência na inativação de importantes microrganismos em alimentos, bem como na atividade de enzimas relacionadas com sua qualidade.

As perspectivas de aplicação da tecnologia de APH no processamento de alimentos dependem de estudos futuros em níveis acadêmico e industrial. O desenvolvimento de pesquisas nessa área pode levar ao aprimoramento tecnológico que, conseqüentemente, proporcionará redução dos custos do processo e aumento na variedade de alimentos preservados pela aplicação de APH.

ABSTRACT

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON MICROORGANISMS INACTIVATION

This article presents a review of the scientific literature on the high hydrostatic pressure (HHP) technology application in food preservation and its effects on vegetative cells and bacterial spores as well as microorganisms inactivation kinetics. Factors as level influence, period and temperature of high pressure treatment, type and age of microorganisms, composition of the suspension media, or food and microorganisms were approached. HHP, a non-thermal technology, is capable to maintain the food sensorial attributes and nutritional value. The researches reviewed showed that HHP processing has the ability to inactivate many types of microorganisms and several enzymes of food interest, although, some bacterial spores are resistant to the treatment. HHP is a preservation technology with great potential for the food industry applications in a world-wide level.

KEY-WORDS: HIGH HYDROSTATIC PRESSURE; NON-THERMAL TREATMENT; FOOD PRESERVATION; MICROBIAL INACTIVATION.

REFERÊNCIAS

- 1 ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; RAY, B. Interactions of high pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.33-42, 2000.
- 2 ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.269-273, 2003.
- 3 ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.4248-4251, 1999.
- 4 AOYAMA, Y.; ASAKA, M.; NAKANISHI, R.; MURAI, K. Sterilization of yeast by pressure treatment. In: HAYASHI, R.; BALNY, C. (Org.) **High pressure bioscience and biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 1995. p.419-422.
- 5 ARROYO, G.; PRESTAMO, G. Respuesta de los microorganismos contaminantes de productos vegetales a la acción de las altas presiones. **Alimentaria**, v. 273, p.103-107, 1996.
- 6 BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. **Conservación no térmica de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1999.
- 7 BARRAUD, C.C.; GAUBERT, A.; MASSON, P.; VIDAL, D. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.635-637, 2004.
- 8 BAYMDIRLI, A.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F.; HIZAL, M. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, v.17, p.17, 52-58, 2006.
- 9 BOZOGLU, F.; ALPAS, H.; KALETUNÇ, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. **Immunology and Medical Microbiology**, v.40, p.243-247, 2004.
- 10 BUTZS, P.; TRANGOTT, V.; LUDWING, H.; WEBER, H. The high pressure inactivation of bacteria and bacterial spores. **Die Pharmazie**, v.52, p.487-491, 1990.
- 11 BUZRUL, S.; ALPAS, H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. **FEMS Microbiology Letter**, v.238, p.29-36, 2004.
- 12 CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.1, p.3-11, 1998.
- 13 CAMPOS, F.P.; DOUSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.6, n.2, p.351-357, 2003.
- 14 CARLEZ, A.; ROSEC, J.P.; CHEFTEL, J.C. High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. **Lebensm.-Wiss. Technonology**, v.26, p.357-363, 1993.
- 15 CHEFTEL, J.C. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology**, v.1, p.75-90, 1995.
- 16 CHEFTEL, J.C.; CULIOLI, J. Effects of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, v.46, p.211-236, 1997.

- 17 CHEN, H.; HOOVER, D.G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, p.25-34, 2003.
- 18 COELHO, G.L.V. Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v.21, n.1, p.105-110, 2002.
- 19 COSTA, M.C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL A. Revisão: tecnologias não-convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim do CEPPA**, v.17, n.2, p.187-210, 1999.
- 20 DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; ABADIO, F.B.D.; SILVA, C.H.O.; CASTILHO, C. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.241-246, 2005.
- 21 DOGAN, C.; ERKMEN, O. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juice. **Journal of Food Engineering**, v.62, p.47-52, 2004.
- 22 DOGAN, C.; ERKMEN, O. Ultra high hydrostatic pressure inactivation of *Escherichia coli* in milk, and orange and peach juices. **Food Science and Technology International**, v.9, n.6, p.403-405, 2003.
- 23 EARNSHAW, R.G. Kinetics of high pressure inactivation of microorganism. In: LEDWARD, D. A.; JOHNSTON, D. E.; EARNSHAW, R. G.; HASTING, A. M. P. (Org.) **High pressure processing of foods**. Leicestershire: Nottingham University Press, 1995. p.37-46.
- 24 FDA/CFSAN. Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies - High Pressure Processing**. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>>. Acesso: em 18 out. 2005.
- 25 GARCIA-GRAELLS, C.; MASSEHALEK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1248-1254, 1999.
- 26 IWAHASI, H.; KAUL, S.C.; OBUCHI, K.; KOMATSU, Y. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiology Letter**, v.30, p.325-328, 1991.
- 27 JORDAN, S.L.; PASCUAL, C.; BRACEY, E.; MACKEY, B.M. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Journal of Applied Microbiology**, n.91, p.463-469, 2001.
- 28 KALCHAYANAND, N.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. **Food Microbiology**, v.15, p.207-214, 1998.
- 29 LECHOWICH, R.V. Food safety implications of high hydrostatic pressure as food processing method. **Food Technology**, v.47, n.6, p.170-172, 1993.
- 30 LEE, S.Y.; DOUGHERTY, R.H.; KANG, D.H. Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.4158-4161, 2002.
- 31 MACKEY, B.M.; FORESTIÈRE, K.; ISSACS, N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v.9, p.1-11, 1995.
- 32 MERTENS, B. Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. In: GOULD, G.W. (Ed.) **New methods of food preservation**. Glasgow: Chapman & Hall; 1995. p. 135-158.
- 33 MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. **Food Technology**, v.47, n.6, p.164-169, 1993.
- 34 MUSSA, D.M.; RAMASWAMY, H.S.; SMITH, J.P. High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. **Food Research International**, v.31, v.5, p.343-350, 1999.
- 35 OXEN, P.; KNORR, D. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.23, p.220-223, 1993.
- 36 PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High-pressure treatment in food preservation. In: RAHMAN, M. S. (Org.) **Handbook of food preservation**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 533-576.
- 37 PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailli*. **Journal of Food Protection**, v.61, n.9, p.1213-1215, 1998.
- 38 PARISH, M.E. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and

- pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, v.18, n.1, p.57-65, 1998.
- 39 PARK, S.L.; LEE, J.I.; PARK, J. Effects of combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. **Journal of Food Science**, v.67, n.5, p. 1827-1834, 2002.
- 40 PATTERSON, M.F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n.5, p.524-529, 1995.
- 41 PRÉSTAMO, G.; SANZ, P.D.; FONBERG-BROCZEK, M.; ARROYO, G. High pressure response of fruit jams contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.313-316, 1999.
- 42 REDDY, N.R.; SOLOMON, H.M.; FINGERHUT, G.A.; RHODEHAMEL, E.J; BALASUBRAMANIAM, V.M.; PALANIAPPAN S. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. **Journal of Food Safety**, v.19, p.277-88, 1999.
- 43 ROSENTHAL, A.; SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de Alimentos**, v.14, p.37-39, 1997.
- 44 RUSSELL, N.J. Bactericidal membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.27-34, 2002.
- 45 SALE, A.J.H.; GOULD, G.W.; HAMILTON, W.A. Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. **Journal Genetically Microbiology**, v.60, n.3, p323-334, 1970.
- 46 SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÁNOVAS; G.V.; SWANSON, B.G. Food processing by hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.6, p.627-645, 2002.
- 47 SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A.M.; IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. **Alimentaria**, n.283, p.33-43, 1997.
- 48 SGROPPO, S.; ANCOS, B.; CANO, M.P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of Science Food Agricultural**, v.82, n.8, p.90–96, 2002.
- 49 SMELT, J.; RIJKE, G. High pressure treatment as tool for pasteurization of foods. **High Pressure Biotechnology**, v.224, p.361- 364, 1992.
- 50 SMELT, J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends Food Science and Technology**, v.9, p.152-158, 1998.
- 51 SMIDDY, M.; O’GORMAN, L.; SLEATOR, R.D.; KERRY, J.P.; PATTERSON, M.F.; KELLY, A.L.; HILL, C. Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. **Food Science Emergent Technology**, v.6, n.1, p.83-90, 2005.
- 52 SOLOMON, E.B.; HOOVER, D.G. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. **Letter in Applied Microbiology**, v.38, p.505-509, 2004.
- 53 STYLES, M.F.; HOOVER, D.G.; FARFAS, D.F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio paraharmolyticus* to high pressure. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1404-1407,1991.
- 54 TAKAHASHI, Y.; OHTA, H.; YONEI, H.; IFUKU, Y. Microbicida effect of hydrostatic pressure on satsuma mandarin juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.28, p.95-102, 1993.
- 55 TEO, A.Y.; RAVISHANKAR, S.; SIZER, C.E. Effect of low-temperature, high-pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* 157:H7 and *Salmonella* in unpasteurized fruit juices. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1122-1127, 2001.
- 56 VARDAG, T.; DIERKES, H.; KORNER, P. High pressure food processing. **Food Technology Europe**, v.3, n.2, p. 106-110, 1995.
- 57 WILLIAMS, A. A new technology in food preservation and processing: part 11. **Nutrition and Food Science**, v.1, p.20-23, 1994.
- 58 ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. **Food Technology**, v.47, n.6, p.162-163, 1993.