



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

Fernanda Fidler

**CONSERVAÇÃO DE OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*) UTILIZANDO CO₂ EM
OSTRAS COZIDAS E INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM OSTRAS CRUAS**

Florianópolis

2020

Fernanda Fidler

**CONSERVAÇÃO DE OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*) UTILIZANDO CO₂ EM
OSTRAS COZIDAS E INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM OSTRAS CRUAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em
Engenharia de Alimentos
Orientador: Prof.^a Dra. Alcilene Rodrigues Monteiro
Fritz

Florianópolis

2020

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

Fidler, Fernanda

Conservação de ostras (*Crassostrea gigas*) utilizando CO₂
em ostras cozidas e inativação fotodinâmica em ostras cruas.
/ Fernanda Fidler ; orientadora, Alcilene Rodrigues
Monteiro Fritz, 2020.

142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Conservação de Ostras. 3.
Atmosfera Modificada com Solubilização de CO₂. 4. Inativação
Fotodinâmica. 5. Micropartículas de Curcumina. I. Fritz,
Alcilene Rodrigues Monteiro . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Fernanda Fidler

Conservação de ostras (*Crassostrea gigas*) utilizando CO₂ em ostras cozidas e inativação fotodinâmica em ostras cruas.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Katherine Helene Oliveira de Matos
SIG Combibloc

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Germán Ayala Valencia
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. João Borges Laurindo
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira.
Coordenadora

Profa. Dra. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Orientadora

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, é importante exprimir meus mais sinceros agradecimentos à todas as pessoas que me ajudaram em mais essa etapa da minha vida e que durante estes anos na pós-graduação.

Agradeço a minha família, à minha mãe por sempre me apoiar e me incentivar a nunca desistir. E minha irmã por toda parceria e se fazer sempre presente, é muito importante para mim.

Ao Ezequiel, pelo amor, carinho e dedicação nesta caminhada. Por sempre me apoiar, e não deixar desanimar nos momentos difíceis.

A todos os amigos e colegas do laboratório PROFI e de todos os outros laboratórios do EQA, pela amizade, pelos ensinamentos, opiniões, ajudas.

Ao grupo de pesquisa Nanobiofood por todas as trocas de experiência e discussões, além dos bons momentos compartilhados. Ao Leno, muito obrigada pela parceria e que esta permaneça.

A minha orientadora Prof^a Alcilene R. M. Fritz pela orientação, dedicação, paciência e incentivo.

Agradeço o Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio ao longo dos últimos anos, e a CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

A todos, que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Martin Luther King Jr.)

RESUMO

As ostras são alimentos altamente perecíveis, e Santa Catarina é o maior estado produtor deste molusco no Brasil, motivando o desenvolvimento de técnicas de processamentos para este alimento, afim de diminuir as perdas por deterioração para indústria e garantir mais segurança, melhor qualidade e maior conveniência para o consumidor. Diante disso, o objetivo da pesquisa foi: i) aplicar o tratamento térmico combinado com o armazenamento em atmosfera modificada com diferentes concentrações de CO₂ para aumentar a vida útil de ostras; ii) aplicar a inativação fotodinâmica (IFD) combinando micropartículas de curcumina e luz UV-A para descontaminação de ostras. Para a atmosfera modificada, as ostras foram cozidas em vapor d'água (100 °C por 15 min), e posteriormente desconchadas, e resfriadas até 4 °C antes do envase. As ostras cozidas foram acondicionadas em embalagens com atmosfera modificada injetadas diretamente no interior da embalagem, MAP₁ (80% N₂/ 20% CO₂) e MAP₂ (100% CO₂). Outro grupo de ostras foi submetido ao processo de solubilização do CO₂ (SGS) antes do envase na embalagem, e posterior envase em embalagem sem atmosfera. O acondicionamento das ostras em MAP₁ resultou a menor concentração de CO₂ dissolvido na ostra (18 mg CO₂. kg⁻¹ produto), seguido da MAP₂ (108 mg CO₂. kg⁻¹ produto), e do processo SGS (750 mg CO₂. kg⁻¹ produto). A alta concentração de CO₂ dissolvido no produto pelo processo SGS e a atmosfera MAP₂ inibiram o desenvolvimento microbiano durante o armazenamento, comparadas as atmosferas MAP₁ e controle. Nas embalagens MAP₂ o volume de CO₂ do *headspace* reduziu, devido a absorção pelas ostras e causando encolhimento da embalagem, enquanto as amostras do SGS e em MAP₁ (presença de N₂ na composição gasosa) não apresentaram este efeito. As propriedades físico-químicas e a estrutura proteica das ostras não foram influenciadas pelas atmosferas aplicadas. O tratamento térmico teve impacto na estrutura proteica das ostras, contribuindo para exsudação pelas amostras durante o armazenamento. No estudo do processo de inativação fotodinâmica em ostras. A técnica de precipitação antissolvente foi aplicada para reduzir o tamanho das partículas e para aumento da solubilidade da curcumina. As partículas de curcumina obtidas apresentaram uma boa distribuição de tamanho entre 0,391 e 0,400 µm (micropartículas), sem alteração na composição química. Na IFD, observou-se que a concentração de 40 µM de micropartículas de curcumina, expostas à radiação UV-A durante 5 min, com uma dose de energia de 2,3 J cm⁻², foi suficiente para reduzir a contagem de *Vibrio* spp. em ostras cruas abaixo do limite detectável < 2 log UFC. g⁻¹. Além disso, a exposição das ostras em solução de curcumina por tempo superior a 8 min sob luz UV-A não aumentou a eficiência do tratamento. O processo de IFD combinando micropartículas de curcumina e radiação UV-A pode ser uma alternativa ao tratamento térmico, para descontaminação de ostras sem alterar as características do produto. Os métodos utilizados para redução da contagem de micro-organismos naturalmente presentes em ostras, e de conservação por atmosfera modificada em ostras cozidas mostraram resultados positivos no prolongamento da vida útil e potencial para aplicação tecnológica para conservação desses moluscos.

Palavras-chave: Micropartículas de curcumina, fotossensibilizador, atmosfera modificada, solubilização do CO₂.

ABSTRACT

Oysters are highly perishable foods, and Santa Catarina is the largest producer of this bivalve mollusks in Brazil, motivating the development of processing techniques for this food, in order to reduce losses due to deterioration for the industry and ensure more safety, better quality and greater convenience for the consumer. Therefore, the main objective was: i) to apply the thermal treatment combined with the storage in the modified atmosphere with different concentrations of CO₂ to increase the useful life of oysters; ii) apply photodynamic inactivation (IFD) combining microparticles of curcumin and UV-A light for decontamination of oysters. For the modified atmosphere, the oysters were cooked in water vapor (100 °C for 15 min), and then shelled, and cooled to 4 °C before packaging. Cooked oysters were modified atmosphere packaging, injected directly into the pack, MAP₁ (80% N₂ / 20% CO₂), and MAP₂ (100% CO₂). Another group of oysters was subjected to the CO₂ solubilization process (SGS) before packaging and later pack in packaging without atmosphere. Packing oysters in MAP₁ resulted in the lowest concentration of CO₂ dissolved in the oyster (18 mg CO₂. Kg⁻¹ product), followed by MAP₂ (108 mg CO₂. Kg⁻¹ product), and the SGS process (750 mg CO₂. Kg⁻¹ product). The high concentration of CO₂ dissolved in the product by the SGS process and the MAP₂ atmosphere inhibited microbial development during storage, compared to MAP₁ and control atmospheres. In the MAP₂ packages, the CO₂ volume of the headspace reduced, due to absorption by the oysters and causing shrinkage of the package, while the SGS and MAP₁ samples (presence of N₂ in the gas composition) did not show this effect. Physicochemical properties and oysters protein structure were not influenced by the several atmospheres. The heat treatment influenced the protein structure of oysters, contributing to the water exudation from samples during storage. For microbial photodynamic inactivation process in raw oysters, first of all, the native curcumin was modified by the anti-solvent precipitation technique to reduce particle size and to increase curcumin solubility. The curcumin particles obtained showed a good size distribution between 0.391 and 0.400 μm (microparticles) and chemical structure was maintained. For IFD treatment, it was observed that oysters immersed in curcumin microparticles solution at 40 μM of, exposed to UV-A radiation for 5 min, at energy dose of 2.3 J cm⁻², was sufficient to reduce the *Vibrio* spp. count in raw oysters below of the detectable limit <2 log CFU. g⁻¹. In addition, oysters into curcumin solution beyond 8 min exposed to UV-A did not showed better efficiency. Thus, 5 min was choosing for IFD treatment. IFD technique, using microparticles of curcumin and UV-A radiation can be an alternative to heat treatment, for oysters' decontamination without changing the characteristics of the product. The methods used to reduce microorganisms naturally present in raw oysters, as well as modified atmosphere showed positive results to extend the shelf life of oysters, will can be a technological potential for ready oyster preservation

Keywords: curcumin microparticles, photosensitizer, modified atmosphere, solubilization of CO₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Anatomia das ostras (<i>Crassostrea gigas</i>).....	21
Figura 2.2- Mecanismos potenciais da alta concentração de CO ₂ em micro-organismos.....	28
Figura 2.3- Diagrama de Jablonski- ilustração gráfica do processo fotodinâmico para produção de ROS e oxigênio singlete.	34
Figura 2.4. Estrutura química da curcumina.....	39
Figura 2.5 – Formação das micropartículas por precipitação antissolvente.....	42
Figura 3.1. Fluxograma do procedimento adotado para o processamento e tratamentos das ostras (<i>Crassostrea gigas</i>).	46
Figura 3.2- Ilustração do aparato experimental para solubilização de CO ₂ em alimentos.....	48
Figura 3.3- Analisador de gases para leitura de composição gasosa do interior de embalagens.	51
Figura 3.4- Níveis de CO ₂ e O ₂ no <i>headspace</i> da embalagem durante o armazenamento de ostras cozidas sob atmosfera modificada.	58
Figura 3.5- Concentração CO ₂ absorvida pelas ostras durante o armazenamento em atmosfera MAP ₁ e MAP ₂	60
Figura 3.6- Embalagens das amostras de ostras no final do período de armazenamento. (a) MAP ₂ (100% CO ₂) redução do volume (aparência de vácuo) e (b) MAP ₁ (80/20 % N ₂ /CO ₂) sem deformação.	61
Figura 3.7- Perda de água por exsudação durante refrigeração por 30 min de ostras após tratamento térmico e remoção das conchas.	63
Figura 3.8- Imagem do gel de eletroforese SDS- PAGE para amostras de ostras após tratamento térmico (a) e <i>in natura</i> (b).	64
Figura 3.9. Termograma de DSC das amostras ostras crua e ostra após tratamento térmico...	65
Figura 3.10- Contagem total de mesófilos em ostras cozidas durante o armazenamento refrigerado 4 °C.	68
Figura 3.11- Contagem total de psicrotróficos em ostras cozidas durante o armazenamento refrigerado 4 °C	68
Figura 4.1. Esquema representativo da preparação das micropartículas de curcumina	75
Figura 4.2. Visão geral da câmara de radiação UV. (a) Lâmpada UV desligadas. (b) Todas as lâmpadas ligadas. (c) Um grupo parcial de lâmpadas ligadas.	78
Figura 4.3. Câmara de radiação UV-A.	79

Figura 4.4. Fluxograma das principais fases do procedimento experimental adotado.....	81
Figura 4.5. Microscopia eletrônica de varredura da curcumina não tratada (a) e das micropartículas de curcumina (b) obtidas pela precipitação antissolvente.	88
Figura 4.6. Espectro FTIR das partículas de curcumina não tratada e das micropartículas de curcumina.	89
Figura 4.7. Termograma das partículas de curcumina não tratada e das micropartículas de curcumina.	90
Figura 4.8. Difratoogramas das partículas de curcumina.	91
Figura 4.9. Atividade antioxidante das partículas de curcumina não tratada e após processo de precipitação antissolvente, expressa em percentual da atividade antioxidante (AA %).	92
Figura 4.10. Espectros de absorção da curcumina e da luz UV-A.	93
Figura 4.11. Perfil de temperatura da amostra, câmara de inativação e lâmpada UV-A durante a irradiação.	94
Figura 4.12. Dose de energia nas amostras em relação ao tempo de exposição.	95
Figura 4.13- Cinética de inativação de <i>Vibrios</i> em ostras inteira pela inativação fotodinâmica.	101
Figura 4.14 – Aparência das ostras em solução de micropartículas de curcumina (40 µM) (a) antes da exposição a luz UV-A, (b) após tratamento de inativação fotodinâmica.	103
Figura 4.15 – Aparência das ostras após tratamento de inativação fotodinâmica.	103
Figura 7.1- Curva de calibração para determinação da concentração de diclorometano (DCM).	140
Figura 7.2 – Curva de degradação da curcumina em solução exposta a luz UV-A	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Estudos de conservação de moluscos sob atmosfera modificada MAP.....	31
Tabela 2.2 – Tratamento de fotoativação com curcumina, relacionados a alimentos.....	36
Tabela 2.3. Técnicas encontradas na literatura para redução de partículas de curcumina.	40
Tabela 3.1- Valores de contagem microbiológica para aeróbios mesófilos e psicrotróficos (log UFC g ⁻¹) e ausência de <i>Vibrio</i> spp em ostras crua e após tratamento térmico (100 °C).	56
Tabela 3.2. Valores de pH de ostras acondicionadas sob atmosfera modificada tradicional e SGS armazenada a 4 °C por 15 dias.....	66
Tabela 4.1. Condições dos tratamentos de inativação fotodinâmica da primeira etapa.	83
Tabela 4.2. Condições dos tratamentos de inativação fotodinâmica da segunda etapa.....	84
Tabela 4.3. Efeito dos tratamentos aplicados em ostras trituradas.....	96
Tabela 4.4- Efeito dos tratamentos de inativação fotodinâmica em ostras inteiras e desconchadas.	98
Tabela 4.5- Efeito da inativação fotodinâmica (MC 40 µM, 2,3 J cm ⁻²) e somente MC (40 µM) no crescimento de <i>Vibrio</i> spp. naturalmente presentes em ostras, armazenadas a 4 °C por 8 dias.	104
Tabela 4.6- Efeito da inativação fotodinâmica (MC 40 µM, 2,3 J cm ⁻²) e somente MC (40 µM) na inativação de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas presentes em ostras.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.P.H.A - *American Public Health Association*

Aa – Atividade de Água

C – Curcumina não tratada (não tratada)

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CO₂ - Dióxido de Carbono

C_{CO₂}^t - Concentração de CO₂ no tempo t (mgCO₂ kg de produto⁻¹)

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

DR-X - Difração de Raio X

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FDA - *Food and Drug Administration's*

F_{res} - Força resultante (N)

FS – Fotossensibilizador

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

g - Aceleração da gravidade (m² s⁻¹)

g/p – Relação Volumétrica gás/produto

GRAS - Composto geralmente reconhecido como seguro

ICMFS - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IFD – Inativação fotodinâmica

IDA- Ingestão diária recomendada

LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

m_a - Massa do alimento (kg)

MAP – Atmosfera Modificada

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MC- Micropartículas de curcumina

M_{CO₂} - Massa molar de CO₂ (44.01 g molCO₂⁻¹)

M_{CO₂} - Massa molar de CO₂ (g mol CO₂⁻¹)

m_p - Massa de produto (kg)

N₂ – Nitrogênio

O₂ – Oxigênio

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCA - *Plate Count Agar*

pH - Potencial Hidrogeniônico

PROFI – Laboratório de Propriedades Físicas do Alimentos

$P_{\text{CO}_2}^{t=0}$ - Pressão parcial de CO₂ inicial (Pa, kPa, atm, bar)

$P_{\text{CO}_2}^{t=\infty}$ - Pressão parcial de CO₂ ao final do SGS (Pa, kPa, atm, bar)

R - Constante universal dos gases ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

ROS - Espécies reativas de oxigênio

rpm - Rotações por minuto

S_0 - Estado fundamental singleto

S_1 - Estado singleto excitado

S_3 - Estado tripleto

SGS - *Soluble Gas Stabilization*

T - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$, K)

t - Tempo (s, min, h)

TCBS - Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose

T_d – Temperatura de desnaturação ($^{\circ}\text{C}$)

TPO₂ - Taxa de permeabilidade de Oxigênio

TPVA – Taxa de Permeabilidade ao vapor de água

UFC - Unidade formadora de colônia

UV - Radiação ultravioleta

V - Volume (m^3)

V_g – Volume do gás (m^3)

V_{HS} - Volume de gás no *headspace* (m^3)

V_p – Volume do Produto (m^3)

V_{CO_2i} - Volume de CO₂ no tempo inicial (m^3)

V_{CO_2t} - Volume de CO₂ no tempo t (m^3)

ΔH_d – Variação da entalpia de desnaturação

ρ_a - Massa específica do alimento (kg m^{-3})

ρ_f - Massa específica do fluido (kg m^{-3})

SUMÁRIO

Capítulo 1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
Capítulo 2. Revisão bibliográfica	20
2.1 Ostras	20
2.2 Microbiota das Ostras	21
2.3 <i>Vibrio</i> spp.	23
2.4 TECNOLOGIAS DE PROCESSAMENTO PARA OSTRAS	24
2.4.1 Tratamento térmico	25
2.4.2 Conservação	26
2.3.3 Inativação fotodinâmica	33
Capítulo 3. APLICAÇÃO De atmosfera modificada em ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) cozidas	43
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.2 Material e métodos	45
3.2.2 Análises dos gases	49
3.2.3 Análises físico-químicas	51
3.2.4 Propriedades térmicas	52
3.2.5 Análise de proteína	53
3.2.6 Análises microbiológicas	54
3.2.7 Análise estatística	55
3.3 Resultados.....	56
3.3.1 Microbiologia das ostras após tratamento térmico	56
3.3.2 Armazenamento de ostras cozidas em atmosfera modificada	58
3.3.3 Análises físico-químicas	62
3.4 Conclusão	70

Capítulo 4. APLICAÇÃO Do tratamento de inativação Fotodinâmica para inativação de <i>Vibrios</i> SPP EM OSTRAS (<i>Crassostrea gigas</i>).....	72
4.1	Introdução..... 72
4.2	Material e métodos 74
4.2.1	Materiais..... 74
4.2.2	Preparação e caracterização das micropartículas de curcumina 74
4.2.3	Câmara UV-A 78
4.2.4	Ensaio de fotoativação para determinação da concentração de curcumina 80
4.2.3	Análise estatística..... 86
4.3	Resultados E Discussão 87
4.3.1	Caracterização das micropartículas de curcumina..... 87
4.3.2	Inativação fotodinâmica..... 93
4.3.3	Avaliação da Inativação fotodinâmica..... 95
4.4	CONCLUSÃO..... 106
Capítulo 5. Conclusões gerais.....	108
Capítulo 6. Sugestões para trabalhos futuros.....	110
Capítulo 7. Referências.....	111

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Conservação de ostras (*Crassostrea gigas*) utilizando CO₂ em ostras cozidas e inativação fotodinâmica em ostras cruas

Porquê?

- As ostras possuem uma carga microbiana natural, devido acumular contaminantes das águas costeiras onde vivem. O elevado conteúdo de água e pH próximo a neutralidade, a torna um produto de alta perecibilidade e meio propício para desenvolvimento micro-organismos, e muitas vezes associadas a surtos alimentares, causado por micro-organismos patogênicos.
- A maricultura é uma atividade relevante para o mercado do litoral do estado de Santa Catarina, maior estado produtor de moluscos bivalves do país, sendo uma das principais fontes de renda para muitos maricultores. Por isso, há um interesse na busca de soluções tecnológicas para aumento da vida útil, agregação de valor e facilidade de comercialização deste produto.
- No Brasil, o processamento de moluscos ainda é bastante artesanal, apresentando deficiências tanto no processo produtivo, quanto a segurança microbiológica destes produtos.

O que já foi feito?

- As pesquisas têm avançado nos últimos anos em relação a métodos para aumento da vida útil de ostras: tratamentos térmicos, tratamentos não térmicos a alta pressão, uso de antimicrobianos, aplicação de atmosfera modificada combinados com a conservação a baixas temperaturas são os mais estudados.
- A atmosfera modificada tem sido aplicada como método de conservação, para inúmeros produtos cárneos. Entretanto, poucos trabalhos avaliam a vida útil de ostras embaladas em atmosfera modificada com CO₂ em relação a concentração de CO₂ dissolvida no produto.
- O interesse atual das pesquisas e industrial, está no desenvolvimento e aplicação de tecnologias não térmicas, que buscam reduzir as alterações nas características do produto, como: irradiação, dióxido de carbono a alta pressão, processamento a alta pressão hidrostática.

- Outra tecnologia é inativação fotodinâmica, uma técnica bem difundida na área da saúde e que tem ganhando destaque na inativação de micro-organismos indesejáveis em alimentos.

Hipóteses

- A aplicação do processo SGS é capaz de aumentar a vida útil de ostras cozidas em relação a atmosfera modificada tradicional.
- O uso de micropartículas de curcumina possui efeitos favoráveis no tratamento de inativação fotodinâmica em relação as partículas de curcumina não tratadas para descontaminação de ostras.
- A tecnologia inativação fotodinâmica pode se tornar uma alternativa viável para redução da microbiota natural e inativação de *Vibrio spp.* de ostras.

Métodos

- Aplicar atmosfera modificada no interior da embalagem, e processo SGS para potencializar o efeito bacteriostático do CO₂, em ostras cozidas;
- Avaliar o efeito bacteriostático das atmosferas modificada no aumento da vida útil de ostras armazenadas sob refrigeração;
- Avaliar as propriedades das micropartículas de curcumina produzidas, e seu efeito na inativação fotodinâmica;
- Avaliar o efeito do tratamento de inativação fotodinâmica combinando micropartículas de curcumina e luz UV-A na descontaminação de ostras;
- Aplicar luz UV-A em ostras desconchadas, utilizando micropartículas de curcumina para inativar *Vibrio spp.*

Respostas

- Condições da composição gasosa de atmosfera modificada para aumento da vida útil de ostras cozidas e armazenadas sob refrigeração;
- Definir um equipamento para aplicação de radiação UV para descontaminação de alimentos e aplicação do tratamento de inativação fotodinâmica;
- Micropartículas de curcumina com atividade de fotossensibilização melhorada;

- Redução da microbiota natural de ostras pelo processo de inativação fotodinâmica, combinando curcumina e luz UV-A.

CAPITULO 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de ostras da América Latina, com destaque para o estado de Santa Catarina que detêm mais de 90% da produção nacional, comercializando, em 2017, uma safra de 2.490 toneladas de ostras (EPAGRI, 2019; FAO, 2016). A espécie de ostra mais cultivada no litoral de Santa Catarina é a *Crassostrea gigas*, devido ao seu potencial de crescimento rápido e a sua ampla tolerância a diferentes condições ambientais (FAO, 2010).

As ostras, são moluscos bivalves filtrantes, e tem a sua qualidade microbiológica diretamente associada a qualidade do meio de cultivo. Sendo assim, são susceptíveis a contaminação por bactérias patogênicas naturais do ambiente marinho, tais como família *Vibrionaceae*, *Listeria spp.*, *Clostridium botulinum*, e outros micro-organismos deteriorantes (OLIVEIRA et al., 2011).

A vida útil de ostras frescas, armazenadas sob refrigeração dura em média quatro dias, entretanto, é comum observar a venda destes moluscos a temperatura ambiente, em mercados locais, na forma *in natura*. Produtos processados como ostras enlatadas, congeladas e embaladas a vácuo existem, mas representam uma pequena parcela do mercado (HICKS, 2016; HUSS, 1997a).

A aplicação de calor é uma prática comum no processamento de moluscos, para redução da carga microbiana natural. Quando aplicado em condições de tempo e temperatura adequadas, é capaz de garantir produtos livre de patógenos (SKIPNES et al., 2002). No entanto, os pescados no geral, são produtos bastante susceptíveis a alterações de ordem físico-química, microbiológica e sensorial no decorrer da vida de prateleira. Diante disso, o uso de tecnologias combinadas pode ser uma alternativa para a comercialização, e agregação de valor desses produtos, como por exemplo, depuração, alta pressão, aplicação de antimicrobianos, congelamento, irradiação, atmosfera modificada, inativação fotodinâmica.

A atmosfera modificada (MAP) é uma tecnologia bastante utilizada para estender o tempo de vida de prateleira e manter a qualidade de produtos perecíveis, e tornou-se popular nos últimos anos, pela efetiva extensão da vida útil de alimentos, e facilidade de distribuição e comercialização. De maneira geral, a MAP consiste em substituir a atmosfera natural que rodeia o alimento no interior da embalagem, por outra mistura de gases. Os principais gases utilizados são o dióxido de carbono (CO₂), e nitrogênio (N₂), e algumas vezes combinados com oxigênio (O₂) (MANTILLA et al., 2010).

O CO₂ é o gás com maior importância em sistemas de atmosfera modificada por seu efeito bacteriostático, a dissolução do CO₂ nos alimentos é capaz de modificar o pH do alimento, que interfere na respiração microbiana e na taxa de crescimento (SIMPSON; ACEVEDO; ALMONACID, 2009). Assim, como inibidor de crescimento microbiano, seu efeito é proporcional a quantidade de CO₂ dissolvido no alimento (DEVLIEGHERE; DEBEVERE; VAN IMPE, 1998). A solubilização do CO₂ em alimentos antes da embalagem é uma ótima estratégia para aumentar a quantidade de CO₂ dissolvido no alimento, este método é conhecido como estabilização de gás solúvel (SGS), e tem demonstrado resultados promissores em diversos alimentos, como peito de frango, camarão, queijo, bacalhau e outros (CABRAL et al., 2019; MENDES; GONÇALVES, 2008a; ROTABAKK et al., 2006; SIVERTSVIK et al., 2003).

Como uma alternativa na descontaminação de alimentos e garantir a segurança microbiológica, os tratamentos não térmicos têm ganhado o interesse da indústria, principalmente para alimentos, como as ostras, que são consumidas quase sem nenhum tratamento.

O processo de inativação fotodinâmica, é um tratamento não térmico, capaz de eliminar bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras, e vírus, sem afetar outras células ou gerar produto químico tóxico, e não alterar as características do produto. Essa tecnologia envolve o uso de corantes ou fotossensibilizadores (FS), ativados por uma fonte de luz, com um determinado comprimento de onda, capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), que têm efeito bactericida (PENHA et al., 2017). Existem diversos tipos de fotossensibilizadores, com destaque para a curcumina, que tem efeito contra uma série de micro-organismos contaminantes de alimentos, como de suco de laranja (BHAVYA; HEBBAR, 2019), maçãs cortadas (TAO et al., 2019), ostras (LIU et al., 2016; WU et al., 2015), grãos de milho (TEMBA et al., 2016), salsicha e alface (DE OLIVEIRA; TIKEKAR; NITIN, 2018; TOSATI et al., 2018). Todos esses estudos aconteceram com adição da cultura (algum micro-organismo específico) diretamente na superfície do alimento antes do tratamento, em nenhuma delas foi considerado o meio natural de contaminação. De fato, é de interesse que a tecnologia seja testada em alimentos com sua contaminação natural.

Levando em consideração esses fatos, e estudos evidenciando o potencial de desenvolvimento de tecnologias não térmicas para conservação e inativação de micro-organismos em alimentos; a proposta de tese foi estudar o uso de atmosfera modificada como

método de conservação de ostras, e a tecnologia de inativação fotodinâmica utilizando micropartículas de curcumina para redução da contaminação naturalmente presentes em ostras.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi estudar a influência da aplicação de atmosfera modificada na conservação de ostras cozidas e aplicação da inativação fotodinâmica com micropartículas de curcumina em ostras cruas.

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da atmosfera modificada na vida útil de ostras cozidas;

Analisar o processo de solubilização do CO₂ no produto antes do envase na embalagem, como uma opção a atmosfera modificada;

Determinar a concentração do CO₂ absorvida pelas ostras em cada atmosfera modificada;

Avaliar o efeito bacteriostático da atmosfera modificada e seu efeito na estrutura proteica das ostras;

Produzir e caracterizar micropartículas de curcumina pelo método de precipitação antissolvente;

Desenvolver uma câmara de radiação UV para descontaminação de alimentos;

Obter parâmetros da inativação fotodinâmica para descontaminação de ostras utilizando curcumina e radiação UV-A;

Avaliar a eficiência das micropartículas de curcumina produzidas na técnica de IFD para descontaminação de ostras.

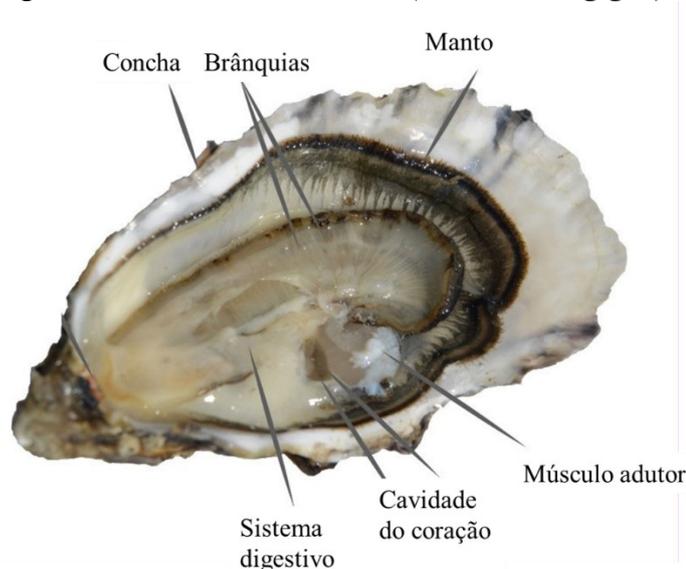
CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OSTRAS

O mercado mundial de moluscos bivalves movimenta cerca US\$ 19 bilhões ao ano. Os moluscos são o segundo maior produto aquícola produzido no mundo (24%), ficando atrás apenas da produção de peixes (64%), sendo a ostra o molusco mais cultivado, com uma produção em torno de 4,6 milhões de toneladas (FAO, 2018).

No Brasil, o Estado de Santa Catarina concentra a produção em uma faixa que inclui 12 municípios, estendendo-se do município de São Francisco do Sul (norte do estado) até Palhoça (região centro-leste) (SUPLICY, 2018). A espécie de ostra cultivada no Estado de Santa Catarina é a *Crassostrea gigas*, também conhecida como ostra-do-Pacífico, ou ostra japonesa. Ela pertence ao Filo Mollusca e à classe Bivalvia. É uma espécie exótica, nativa do sudoeste asiático, cultivada mundialmente, por ser bem adaptada ao cultivo planejado (PAREJO, 1989; RIOS, 1994; SANTOS; MARCHIORI; GIUSTINA, 2016). Em Santa Catarina, a produção iniciou nos anos 90, e desde então a atividade é uma importante fonte de renda à população das comunidades pesqueiras (ANDRADE, 2016).

Os moluscos bivalves possuem o corpo protegido por uma concha calcária, formada por duas valvas articuladas unidas por ligamentos e músculos adutores, que permitem a abertura e fechamento da concha. A espécie *Crassostrea gigas*, apresenta o corpo composto por: conchas, músculo adutor, brânquias, manto, conforme ilustrado na Figura 2.1 (PAREJO, 1989).

Figura 2.1. Anatomia das ostras (*Crassostrea gigas*)

Fonte: (France Naissain & Vendée Naissain)

Embora constituam um suprimento de proteína de alta qualidade muito apreciado, os pescados podem acarretar problemas de saúde pública por serem preferencialmente cultivados em áreas costeiras, que são muito mais susceptíveis a contaminação por agentes químicos e biológicos do que os ecossistemas de mar aberto, e agravados pelo hábito tradicional de consumo cru e in natura de determinadas espécies de produtos marinhos (HUSS et al., 2000; JAY, 2005).

2.2 MICROBIOTA DAS OSTRAS

A ostra obtém seu alimento por filtração de partículas em suspensão trazidas pela água. Suas duas valvas são mantidas ligeiramente abertas e os alimentos introduzidos. Estes passam através das cavidades do manto e pelas brânquias, que funcionam como um filtro, e concentram partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal, e às vezes, podem reter em seu interior micro-organismos presentes nas águas de cultivo (FROELICH; NOBLE, 2014; RASZL et al., 2016).

A microbiota das ostras é associada ao ambiente marinho que elas vivem, variando com fatores como salinidade, carga bacteriana na água, temperatura, dieta e condição de criação (TRABAL FERNÁNDEZ et al., 2014; WANG et al., 2014). Além, da poluição de origem do

deságue de dejetos domésticos, industriais e pesticidas agrícolas (OLIVEIRA et al., 2011). Alguns outros fatores que contribuem para a contaminação destes moluscos estão associadas aos períodos de chuvas excessivas, temperaturas altas e aumento nas populações de plâncton (GREER; NG; FISMAN, 2008).

Segundo Huss, (1997b), existem dois grupos de bactérias que contaminam moluscos e podem oferecer risco para a saúde dos consumidores, as naturalmente presentes no ambiente marinho: *Aeromonas hydrophila*, *C. botulinum*, *Vibrio* spp. e *Listeria monocytogenes*. E, as bactérias que advém da contaminação dos resíduos humanos, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Escherichia coli*.

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como os coliformes a 45°C e a *E. coli*, são utilizadas como indicadores de qualidade sanitária das águas de cultivo de moluscos (BRASIL, 2019a). Estudos realizados em Santa Catarina, investigaram os níveis dessas bactérias na água dos locais de produção de moluscos e nos moluscos cultivados. Os resultados indicaram que os níveis mais críticos desses micro-organismos ocorre nas regiões mais próximas aos centros urbanos (RAMOS et al., 2012). Devido ao aumento do descarte de esgoto nas águas litorâneas, aumentou-se a detecção de patógenos bacterianos e virais tanto nas águas de cultivo como nos próprios animais (SOUZA et al., 2014).

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde apontam que o pescado, que inclui peixe, crustáceos e moluscos bivalves foi responsável por cerca de 2,1% dos surtos notificados no Brasil, entre os anos de 2009 a 2018 (BRASIL, 2019b). Em estudo com ostras provenientes de fazendas marinhas da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Ramos et al. (2010) identificaram a presença de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E. coli* nas amostras de águas salinas e de carne das ostras. No ano de 2019, os três agentes mais relacionados aos surtos alimentares no Brasil foram *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2019b).

Em São Paulo, ostras *C. rhizophorae* testaram positivo para *V. vulnificus*, *Aeromonas*, e *Salmonella* (RISTORI et al., 2007). E ainda, o relatório apresentado por Baptista; Rodrigues; Sant'ana, (2020) mostrou presença de bactérias como *V. parahaemolyticus* e outros *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* e coliformes, *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. em frutos do mar no Brasil, apresentando a necessidade de técnicas de processamento destes alimentos. Além disso, podem ser encontrados micro-organismos deteriorantes, que provocam alterações no produto reduzindo a vida útil do produto. Dos quais já foram isoladas, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*. No início e no desenvolvimento da deterioração de frutos do mar em geral

refrigerados predominaram as bactérias do gênero *Pseudomonas* e a *Acinetobacter-Moraxella* spp. (JAY, 2005). Por isso, garantir a segurança alimentar e extensão da vida útil de moluscos bivalves, que são tradicionalmente consumidos crus, é o desafio das indústrias processadoras desses produtos.

2.3 *VIBRIO* SPP.

Os vibrios são bactérias originárias de habitats marinhos, gram-negativas, oxidase positivas, anaeróbias facultativas e, normalmente são identificadas como bastonetes curvos, embora às vezes não exibam a morfologia característica em forma de vírgula (JAY, 2005). A maioria das espécies é halofílica, ou seja, o NaCl estimula seu crescimento, e são encontrados em temperatura que variam de 10-30 °C e, por isso estão mais presentes nos períodos em que as temperaturas são mais elevadas (RONHOLM; LAU; BANERJEE, 2016).

Frequentemente são associados como agentes causadores de gastroenterite, resultante do consumo de frutos do mar crus ou pouco cozidos (COLE et al., 2015; ESTEVES et al., 2015). O gênero *Vibrio* inclui 30 espécies, das quais, ao menos, quatorze são reconhecidas patogênicas para o homem. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera* e *Vibrio vulnificus* são frequentemente relacionadas aos casos de surtos provocados por frutos do mar (BROBERG; CALDER; ORTH, 2011; CAMPBELL-PLATT, 2017).

Embora o Brasil possua poucos dados de surtos alimentares vinculados à *Vibrio*, alguns estudos relatam a presença de *V. parahaemolyticus*, *V. cholera* e *V. vulnificus* em amostras de águas de cultivos provenientes e em amostras de ostras e outros frutos do mar (COSTA SOBRINHO et al., 2011; RAMOS et al., 2014; RASZL et al., 2016). Pesquisa realizada por Ramos et al. (2014) no período de outubro a março em fazendas de moluscos bivalves da Ilha de Santa Catarina, revelou que 48% das amostras de ostras analisadas estavam contaminadas com uma ou mais espécies de *Vibrio*, e 73% das amostras de água de cultivo apresentaram sinais de contaminação por uma ou mais espécies de *Vibrio*.

Talvez, pouco se sabe sobre a ocorrência de infecções causadas por *Vibrio*, pela falta de um programa de monitoramento oficial sobre limites específicos de contaminação.

A legislação brasileira, não estabelece um limite para *Vibrio* para (BRASIL, 2019a). O Estado de Santa Catarina possui a Instrução Normativa N° 7 de 2012, que estabelece requisitos mínimos necessários para a garantia da inocuidade e qualidade dos moluscos

bivalves, mas não faz menção sobre os limites de contaminação por *Vibrios* (CIDASC, 2012). Na América do Sul, o Chile, que apesar de numerosos surtos de *V. parahaemolyticus* terem sido relatados, também não estabelece limites máximos para pescados. Por outro lado, Peru exige ausência *V. parahaemolyticus* em 25 g para todos os frutos do mar (RASZL et al., 2016). O limite exposto pelo Estados Unidos é igual ou $< 1 \times 10^4$ UFC g⁻¹ para produtos de pesca prontos para consumo com cozimento mínimo pelo consumidor (FDA, 2019a). Entretanto, exames em amostras de moluscos bivalves após surtos de 1998 nos EUA, mostraram que os níveis de *V. parahaemolyticus* na maioria das ostras foram de menos de 1.000 células de *Vibrio* por grama e algumas com menos de 100 células por grama, níveis bem abaixo do máximo recomendado pelo FDA, mostrando que orientação não é suficiente para proteger os consumidores de ostras cruas (KAYSNER; DEPAOLA, 2004).

Atualmente, um número crescente de relatórios que mostram ocorrência de doenças transmitidas por frutos do mar, especialmente para frutos do mar crus e mal cozidos (BAKER-AUSTIN et al., 2013; RASZL et al., 2016). Em o relatório apresentado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), a incidência da contaminação por *Vibrio* aumentou 79% em 2019 em relação aos anos de 2016-2018, nos EUA (TACK et al., 2020). Como os moluscos bivalves filtradores do ambiente aquático, o consumo desse produtos crus ou pouco cozidos, tende a aumentar a prevalência de surto de *Vibrio* (OLIVEIRA et al., 2011; TACK et al., 2020).

2.4 TECNOLOGIAS DE PROCESSAMENTO PARA OSTRAS

As ostras, assim como os demais moluscos bivalves são muito suscetíveis à deterioração. O alto conteúdo de glicogênio e o conteúdo livre de aminoácidos, a alta atividade de água, o elevado conteúdo proteico, o pH neutro, e enzimas autolíticas, propiciaram um ambiente favorável ao desenvolvimento de micro-organismos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Após a morte do pescado, diferentes reações bioquímicas e microbianas, provocam uma rápida deterioração dos pescados, diminuindo a vida útil do produto (MASNIYOM; BENJAMA; MANEESRI, 2011). Por isso, técnicas de processamento e armazenamento desempenham papel crítico em relação a deterioração (CHEN et al., 2017).

O método de conservação mais comum para este tipo alimento, ainda cru é a refrigeração, entretanto, este método não elimina micro-organismos, apenas retarda seu crescimento (ZHANG et al., 2013). Contudo, o predomínio pela preferência de ostras frescas e

a falta de fiscalização, torna-a popular nos mercados abertos, sendo comum encontrar, ostras sendo comercializadas a temperatura ambiente.

Após a colheita de moluscos, as bactérias acumuladas em suas brânquias crescem rapidamente, à medida que a temperatura de acondicionamento aumenta. A recomendação do FDA, é que após a colheita a temperatura interna dos moluscos deve ser reduzida para 10 °C, em curto intervalo de tempo (FDA, 2019a). Em pesquisa realizada por Gooch et al. (2002), as populações de *V. parahaemolyticus* em ostras não refrigeradas aumentaram de 50 – 790 vezes seu nível inicial dentro de 24 h quando expostas a 26 °C. Jones et al. (2017) relataram que a exposição pós-colheita de ostras por 5 horas a temperatura ambiente, já é suficiente para aumentar de 1 a 2 log UFC. g⁻¹ as contagens de *Vibrio*. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de técnicas de redução/inativação da microbiota presente em ostras para que combinadas com a refrigeração possam garantir a segurança microbiológica e a qualidade do alimento.

Com o propósito de evitar perdas sensoriais e nutricionais causadas por alterações microbiológicas, inúmeros métodos de redução de bactérias patogênicas e deteriorantes em ostras são estudados: depuração (PARDÍO-SEDAS, 2015), pasteurização a baixa temperatura e alta pressão (CRUZ-ROMERO; KELLY; KERRY, 2007), alta pressão hidrostática (HSU et al., 2009; LINGHAM et al., 2016; YE et al., 2015), raio-X (HATTAWAY, 2006), água ozonizada (CHEN et al., 2014; RONG et al., 2010), irradiação (THUPILA; RATANA-ARPORN; WILAI PUN, 2011), tratamento térmico (ANDREWS; PARK; CHEN, 2000; LEKJING; KARRILA; SIRIPONGVUTIKORN, 2017), uso de antimicrobianos, quitosana (FANG et al., 2015; PARK; CHUNG; HA, 2018; XI; LIU; SU, 2012), dióxido de carbono supercrítico (MATOS et al., 2018). E há algumas tecnologias emergentes, mas que ainda são pouco aplicadas a pescados: tecnologia de luz pulsada, campo elétrico pulsado, processamento de micro-ondas, radiofrequência e ultrassom (CORTESE et al., 2009).

2.4.1 Tratamento térmico

O tratamento térmico é um procedimento comum utilizado para inativação microbiana em alimentos (MAÑAS; PAGÁN, 2005). No processamento de moluscos bivalves, é importante não somente para reduzir a contagem microbiana no produto cozido e eliminar os

patógenos, mas também por facilitar a remoção da concha e separação da parte cárnea (LIMA, 2014).

Soares et al. (2015) aplicaram o tratamento térmico em ostras (*Crassostrea gigas*), com vapor à 99,6 °C por 10 min e observaram reduções na contagem de bactérias totais e inativação de *Vibrio* spp. Andrews et al. (2000) e Cruz-Romero et al. (2007) observaram, que populações naturais de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* foram reduzidos para níveis não detectáveis, após ostras sofrerem aquecimento durante 10 minutos em água a 50 °C, mantendo as características sensoriais das ostras. *Vibrio* spp. normalmente são eliminados durante o cozimento, mas as condições de tempo e temperatura varia de acordo com a morfologia do molusco bivalve, quantidade tratada. A Federação Europeia de Refrigerados, sugere como critério para tratamento térmico a inativação de *L. monocytogenes*, pois é considerada mais resistente ao calor dos patógenos não esporulantes (70 °C por 2 min) e recomenda o armazenamento a temperaturas inferiores a 3 °C (ECFF, 2006).

Mesmo após o tratamento térmico, os frutos do mar possuem um prazo de validade limitado, principalmente devido ao potencial de deterioração por micro-organismos, e contaminação cruzada pós processamento (DE LIMA; MELO; MONTEIRO, 2013). Assim, os setores industriais utilizam-se de vários métodos para aumentar a vida útil dos produtos.

2.4.2 Conservação

As características intrínsecas dos moluscos bivalves como, alta atividade de água, elevado conteúdo proteico, pH neutro, presença de bactérias psicrotróficas e enzimas autolíticas, torna-os altamente perecíveis, gerando um elevado volume de perdas aos comerciantes. Além da qualidade, ou frescor do produto, a temperatura de armazenamento tem um efeito relevante na vida útil de pescados. A refrigeração aplicada à conservação de frutos do mar é essencial, visto que evita o crescimento de diversos grupos de micro-organismos (ASHIE; SMITH; SIMPSON, 1996).

Além disso, o uso de embalagens de com atmosfera modificada juntamente com a refrigeração, já se tornou um método bem estabelecido para inibir bactérias de alimentos, além de ser usado como uma barreira as condições externas, cada vez mais popular (ABEL; ROTABAKK; LERFALL, 2019).

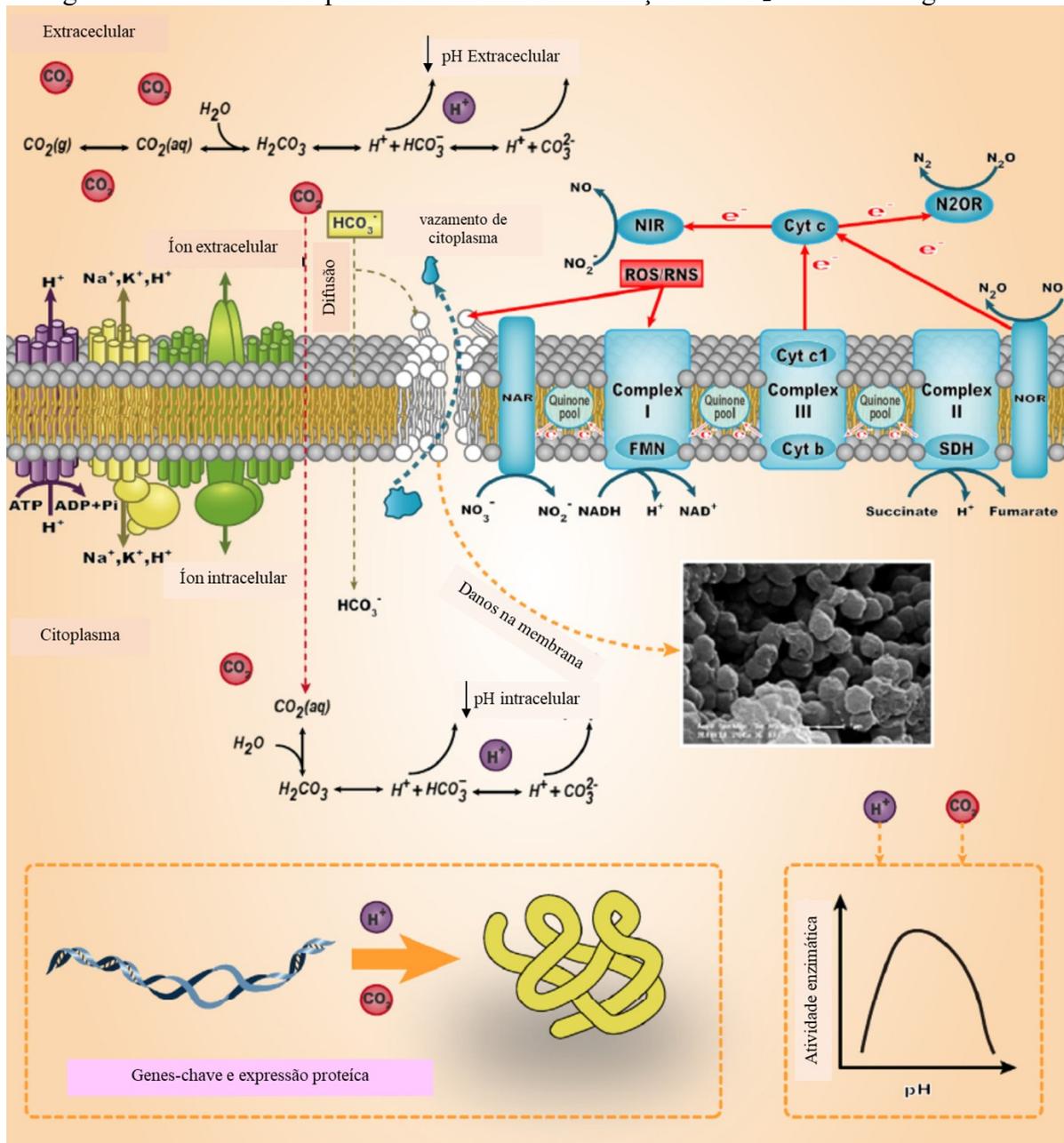
2.4.2.1 *Atmosfera modificada*

A atmosfera modificada é usada como método de conservação desde à década de 1930, pois pode prolongar a vida útil de alimentos, pela inibição do crescimento de micro-organismos e de reações oxidativas (DEWITT; OLIVEIRA, 2016; SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002). A tecnologia de embalagem em atmosfera modificada, consiste na remoção ou alteração da composição normal do ar atmosférico, por uma mistura gasosa adequada capaz de aumentar a vida útil do produto (SØRHEIM; NISSEN; NESBAKKEN, 1999). Geralmente utiliza-se uma mistura de gases que inclui o CO₂, O₂ e nitrogênio N₂ (DEWITT; OLIVEIRA, 2016).

Moluscos bivalves são produtos com alto risco de deterioração, devido ao pH neutro, elevada atividade de água e presença de enzimas autolíticas, sendo assim recomendada a aplicação de uma atmosfera rica em CO₂ combinada com a refrigeração para potencializar a conservação desses produtos (SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002). A maioria das misturas de gás de pescados não incluem o O₂, uma vez que sistemas com elevado teor de O₂ proporcionam um benefício limitado à extensão da vida útil, pois, o processo de oxidação pode ser agravado (DEWITT; OLIVEIRA, 2016; SIVERTSVIK, 2007; TSIRONI; TAOUKIS, 2010). Atmosferas com N₂ são comumente usadas em pescados, como alternativa à embalagem a vácuo, ou juntamente com o CO₂ para substituir o O₂, com a finalidade de retardar reações oxidativas e inibir o crescimento de micro-organismos aeróbios (DEWITT; OLIVEIRA, 2016).

O CO₂ é o gás com maior importância em sistemas de atmosfera modificada, uma vez que possui efeito bacteriostático e, não é tóxico (SILVA et al., 2017; SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002). O efeito bacteriostático do CO₂ é proporcional à concentração de CO₂ dissolvido no produto, quanto maior a concentração de CO₂, mais baixa é a respiração de micro-organismos e sua velocidade de crescimento (DEVLIEGHERE; DEBEVERE; VAN IMPE, 1998; SIMPSON; ACEVEDO; ALMONACID, 2009). O efeito bacteriostático do CO₂ é bem conhecido sobre várias espécies de bactérias, e existem algumas explicações para o mecanismo de inibição do CO₂ sobre os micro-organismos, representado esquematicamente pela Figura 2.2.

Figura 2.2- Mecanismos potenciais da alta concentração de CO₂ em micro-organismos.



Fonte: Adaptado de Yu; Chen (2019)

Algumas possíveis explicações sobre o mecanismo do CO₂ na inibição de micro-organismos foram sugeridas: a dissolução do CO₂ leva a redução do pH extracelular, e desse modo, reduz o pH intracelular quando excede a capacidade de equilíbrio do pH no sistema (KILLEFFER, 1930; SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002). Além disso, a inativação da proteína reguladora de íons levar à diminuição do pH intracelular. Esses efeitos e a possível influência direta do CO₂, destroem a integridade da membrana celular (GARCIA-GONZALEZ et al., 2007). A destruição da membrana celular, causaria o vazamento de material intracelular, como: proteína, ácido nucleico, K⁺ e Mg⁺ (YAO et al., 2014). A exposição a altas concentrações

de CO₂ reduz também a atividade de algumas enzimas chaves, e impacta no metabolismo de micro-organismos (KIM et al., 2007). E ainda, o CO₂ causaria acúmulo de substâncias reativas ao nitrogênio (RNS), e como resultado disso, a inibição do transporte e consumo de elétrons intracelulares (YAO et al., 2014). E, segundo Zhao et al. (2016) genes-chave e a expressão proteica são afetadas por altas concentrações de CO₂. Ou ainda, provavelmente, uma combinação de todas estas atividades representa o efeito bacteriostático do CO₂.

Segundo Dalgaard (1995), a vida útil dos pescados depende de sua contaminação inicial, temperatura que é submetido e atmosfera. Lima et al. e Soares et al. (2015) sugeriram uma atmosfera modificada contendo CO₂ e N₂ (50/50) para aumento da vida de mexilhões *Perna perna* cozido e de ostras *Crassostrea gigas* cozidas, se mantidas sob refrigeração a 3 °C. Caglak, Cakli e Kilinc (2008) acondicionaram mexilhões *in natura* em atmosfera contendo 80 % CO₂/ 20 % N₂ a 2 °C com aumento da vida útil de 5 para 8 dias, em relação aos mexilhões acondicionados em embalagens com ar.

A capacidade de absorção de CO₂ pelos alimentos é dependente não só da quantidade de água presente no alimento, bem como da relação entre volume de gás e volume de produto (g/p) na embalagem, a qual o alimento é exposto, juntamente com a pressão parcial de CO₂, temperatura, características biológicas do produto, como, a relação entre os conteúdos água/gordura. De maneira geral, para garantir que a concentração de CO₂ dissolvido no produto seja suficiente para exercer o efeito bacteriostático, é necessária uma relação g/p de 2:1 ou 3:1 (volume do gás duas a três vezes superior ao volume do alimento) (SIVERTSVIK; BIRKELAND, 2006). Além disso, em alimentos com alto teor de água/gordura, como aves, carne bovina, e peixes, há uma absorção excessiva de CO₂, devido a solubilidade do CO₂, frequentemente causando colapso das embalagens flexíveis de MAP, fazendo com que o produto fique com uma leve aparência de embalagem a vácuo (SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002).

2.4.2.2 Solubilização do CO₂ antes da embalagem

Uma alternativa a atmosfera modificada, e que contribui para o aumento da quantidade de CO₂ dissolvida no produto, é pela dissolução do CO₂ no produto antes de ser embalado (SIVERTSVIK et al., 2004; SIVERTSVIK; BIRKELAND, 2006).

Este método foi baseado na influência da temperatura (a solubilidade do CO₂ aumenta com a diminuição da temperatura), e pelo aumento da pressão total e parcial do gás,

comportamento descrito pela Lei de Henry (SIVERTSVIK et al., 2004). O método denominado de *Soluble Gas stabilization* (SGS), foi proposto por Sivertsvik et al. (2003), baseados nas considerações de Zhao, Wells, McMillin (1995), em que a ação do CO₂ no crescimento bacteriano, é causado pela absorção de CO₂ da atmosfera da embalagem para o produto. A relação do nível de CO₂ da atmosfera e a quantidade de CO₂ dissolvido é dada por:

$$P_{CO_2}^{i=\infty} = H_{CO_2,p} \times C_{CO_2}^{t=\infty} \quad (1)$$

Onde $P_{CO_2}^{i=\infty}$ é a pressão parcial de CO₂ (Pa), $C_{CO_2}^{t=\infty}$ é a concentração de CO₂ dissolvida (ppm) quando é atingido o equilíbrio, $H_{CO_2,p}$ é a constante de Henry (Pa ppm⁻¹). Soares et al. (2015) determinaram estes parâmetros para ostras (*Crassostrea gigas*) à 1 °C e 200 kPa e obtiveram m valor médio da constante de Henry igual: 34,45 (Pa ppm⁻¹). De acordo com esta lei o aumento da pressão parcial de CO₂ no *headspace* deve refletir mais CO₂ dissolvido no produto.

A técnica proposta de Sivertsvik et al. (2004), consiste em dissolver o CO₂ no produto, utilizando uma câmara de pressão em baixas temperaturas (≈0 °C), onde o alimento é colocado, e é feita a injeção de 100% de CO₂ durante alguns minutos, até pressões de 200 a 400 kPa, e em seguida, o produto é embalado com uma relação g/p muito baixo ou até sob vácuo mas com o mesmo efeito ou até melhor da atmosfera modificada tradicional. Devido as condições de processo (baixas pressões e baixas temperaturas), Sivertsvik et al. (2004) considerou que para um recipiente fechado com volume e temperatura constantes, a variação de CO₂ no *headspace* desse recipiente podem estar diretamente relacionadas com a solubilidade do CO₂ no produto e que o processo obedece a Lei dos gases ideais. Sendo assim, a variação do número de mols entre o instante inicial e final do processo pode ser representada pela diferença de pressão, em um método manométrico, conforme mostrado a partir da Equação 2.

$$C_{CO_2}^{t=\infty} = \frac{g/p (P^{t=0} - P^{t=\infty}) M_W}{RT\rho_P} \quad (2)$$

Em que $C_{CO_2}^{t=\infty}$ concentração de CO₂ final (mg kg⁻¹), g/p é a relação gás produto, P é a pressão absoluta nos instantes inicial (t = 0) e final (t = ∞) (Pa), M_w é a massa molar do CO₂ (g

mol^{-1}), R é a constante universal dos gases ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T é a temperatura do processo (K) e ρ_p é a massa específica do produto (g cm^{-3}).

Com o aumento da pressão total e parcial do gás, a dissolução prévia do CO_2 puro no alimento, durante o período de 3 horas, resulta na mesma quantidade de CO_2 dissolvido no alimento sujeito a 50% de CO_2 durante 48 horas (ROTABAKK et al., 2006; SIVERTSVIK; JENSEN, 2005; SIVERTSVIK; ROSNES; JEKSRUD, 2004; SOARES et al., 2015). E, portanto, tendo potencial de aumentar a eficiência da extensão da vida útil do produto, em relação à atmosfera modificada tradicional. Mexilhões *Perna perna* cozidos, submetidos a solubilização de CO_2 antes do envase em atmosfera modificada (70/30% CO_2/N_2) tiveram aumento de 5 para 7 dias na sua vida útil, em estudos realizados por Lima (2012), em relação aos mexilhões apenas embalados em atmosfera modificada (50/50% CO_2/N_2).

O uso desta técnica tornou-se favorável para inibir a deterioração microbiana de uma série de produtos, como carnes (ROTABAKK; SIVERTSVIK, 2012), queijos (CABRAL et al., 2019), peixes (MENDES; PESTANA; GONÇALVES, 2008; ROTABAKK et al., 2008; SIVERTSVIK et al., 2004), carne cozida (SIVERTSVIK; JENSEN, 2005), frutos do mar (LIMA et al., 2015; MENDES et al., 2011; SIVERTSVIK; BIRKELAND, 2006; SOARES et al., 2015). De acordo com os resultados dessas pesquisas, a exposição das amostras de alimentos ao dióxido de carbono (CO_2) antes da embalagem aumenta a vida útil, sem influência negativa no sabor e na aparência visual do produto. Além disso, os alimentos saturados com CO_2 exigirão menos volume de embalagem em comparação com os métodos tradicionais, como embalagens com atmosfera modificada (MAP) e, posteriormente, contribuem para um menor desperdício e uma otimização na cadeia de transporte. A Tabela 2.1, apresenta alguns estudos que utilizaram atmosfera modificada, com alguma concentração de CO_2 para conservação de moluscos.

Tabela 2.1- Estudos de conservação de moluscos sob atmosfera modificada MAP.

Molusco – Pré tratamento	MAP	Referência
Mexilhões (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) - crus	Vácuo	(CAGLAK; CAKLI; KILINC, 2008)
	MAP1 (50% CO_2 / 50% N_2)	
	MAP2 (80% CO_2 / 20% N_2)	
	MAP3 (65% CO_2 / 35% N_2)	
Ostras (<i>Crassostrea plicatula</i>) - cruas	MAP1 (50% CO_2 / 50% N_2)	(CHEN et al., 2017)
	MAP2 (70% CO_2 / 30% O_2)	

	MAP3 (50% CO ₂ / 50% O ₂)	
Ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) – cobertura com alginato de sódio e acetato de sódio	MAP1 (75% CO ₂ / 25% N ₂) MAP1 (30% O ₂ / 40% CO ₂) MAP2 (50% O ₂ / 50% CO ₂) MAP3 (5% O ₂ / 95% CO ₂) MAP4 (75% N ₂ / 25% CO ₂) MAP5 (50% CO ₂ / 50% N ₂) MAP6 (75% CO ₂ / 25% N ₂) Ar; Vácuo;	(COSTA; CONTE; DEL NOBILE, 2014)
Vieiras	MAP1 (50% CO ₂ /50% N ₂) MAP2 (80 % CO ₂ /20% N ₂) MAP3 (100% CO ₂)	(COTON et al., 2013)
Ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) – alta pressão	Vácuo e MAP (40% CO ₂ / 60% N ₂)	(CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008a)
Mexilhões (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)- crus	Vácuo MAP1 (50% CO ₂ / 50% N ₂) MAP2 (80% CO ₂ / 20% N ₂) MAP3 (40% CO ₂ / 30% O ₂ / 20% N ₂)	(GOULAS et al., 2005)
Ostras (<i>Crassostrea belcheri</i>) – Branqueamento – pasteurização em bolsas à vácuo	Vácuo MAP1 (75% CO ₂ / 25% N ₂) MAP2 (75% CO ₂ /25% O ₂) MAP3 (75% CO ₂ /5% O ₂ / 20% N ₂)	(LEKJING; VENKATACHALAM, 2018)
Mexilhão (<i>Perna perna</i>) – tratamento térmico (VCk-VC)	MAP (50% CO ₂ / 50% N ₂)	(LIMA et al., 2017)
Mexilhões (<i>Perna viridis</i>) - crus	MAP1 (40% CO ₂ / 10% O ₂ / 50% N ₂) MAP2 (60% CO ₂ / 10% O ₂ / 30% N ₂) MAP3 (80% CO ₂ / 10% O ₂ / 10% N ₂) MAP4 (100% CO ₂)	(MASNIYOM; BENJAMA; MANEESRI, 2011)
Mexilhões (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) crus	MAP (80% O ₂ / 20% N ₂) com 100 mL de água doce estéril	(ODEYEMI et al., 2019)
Ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) – tratamento térmico	MAP (50% CO ₂ / 50% N ₂)	(SOARES et al., 2015)
Mexilhões (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) - crus	Vácuo e MAP (75% CO ₂ / 25% N ₂)	TURAN, 2015

Pré tratamento: neste caso refere-se ao tratamento que o molusco recebeu antes do envase para armazenamento, ou se foi armazenado cru (sem tratamento). *Produtos frescos são embalados sob vácuo, cozidos e resfriados na embalagem. **Processo integrado de cozimento e refrigeração à vácuo.

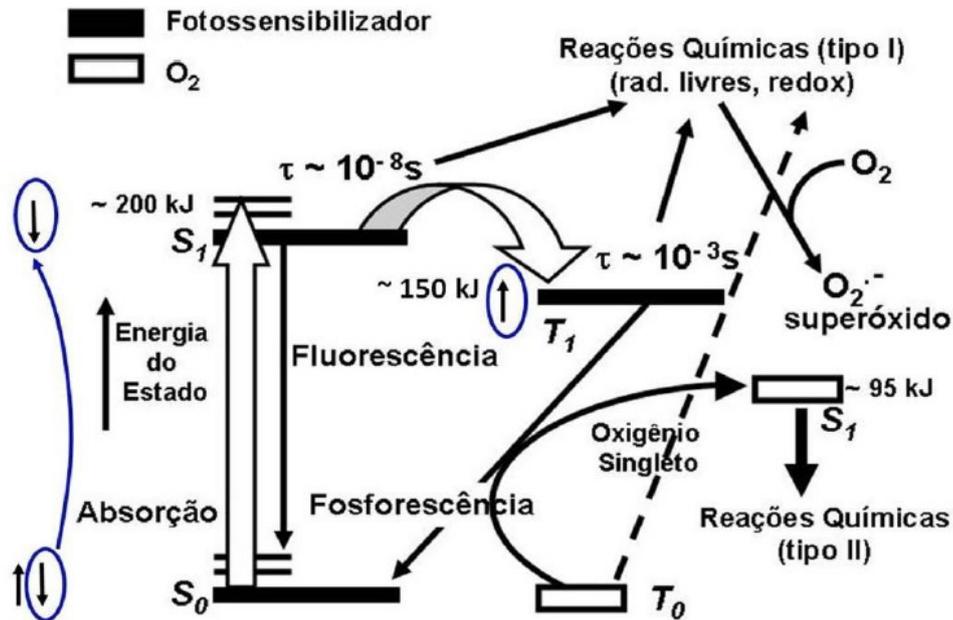
Nos estudos apresentados na Tabela 2.1, a ação bacteriostática do CO₂ é atribuída à concentração inicial de CO₂ na fase gasosa da embalagem, e não na quantidade dissolvida no alimento, dificultando a compreensão da relação de composição gasosa e do efeito bacteriostático. Portanto, este trabalho contribui no estudo do efeito bacteriostático da concentração de CO₂ dissolvido nas ostras, e sua relação na conservação destes produtos.

2.3.3 Inativação fotodinâmica

Uma tecnologia que vêm ganhando destaque em termos de efeito sobre as células bacterianas em alimentos frescos é a Inativação Fotodinâmica (IFD). A IFD é uma técnica derivada da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD), que é amplamente aceita no tratamento de diversas disfunções no tecido biológico, tais como o câncer e condições pré-cancerígenas, como também para diferentes patologias de origem bacteriana, viral, fúngica e inflamatória (LEE; KIM; MIN, 2015; LIU et al., 2016; ROBLERO-BARTOLÓN; RAMÓN-GALLEGOS, 2015). Mas ainda há poucos relatos sobre as aplicações da IFD para alimentos, e a maioria baseados em estudos *in vitro*.

A reação da IFD envolve o uso de três componentes: um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e o oxigênio molecular presente na célula a ser tratada ou inativada. O diagrama de Jablonski, representado na Figura 2.3, é uma forma detalhada de como ocorre a reação de IFD na inativação de micro-organismos.

Figura 2.3- Diagrama de Jablonski- ilustração gráfica do processo fotodinâmico para produção de ROS e oxigênio singleto.



Fonte: Hamblin (2016)

Quando a luz de comprimento de onda, que corresponda ao espectro de absorção do FS, é absorvida pela molécula do FS, no estado fundamental singlete (S_0), este é promovido para o estado excitado singlete (S_1) e após alguns processos interage com o meio biológico transferindo energia para o oxigênio molecular no estado tripleto (S_3), ou a partir do S_1 , pode retornar ao seu estado fundamental estável (S_0) pela liberação de energia sob a forma de luz (fluorescência) (LUKSIENE; BROVKO, 2013). O estado de tripleto excitado (S_3) é o principal mediador das reações fotodinâmicas, ao retornar ao estado fundamental, ele transfere energia para as moléculas de oxigênio, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BALTAZAR et al., 2015).

A geração de ROS, segue duas vias principais caracterizadas por diferentes mecanismos fotoquímicos denominados "tipo I" e "tipo II" (Figura 2. 3). O mecanismo tipo I envolve a transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto e componentes do sistema, ocorrendo a geração de superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila (ALVES et al., 2015; LUKSIENE; BROVKO, 2013). No mecanismo tipo II acontece a transferência de energia, no qual o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia para a molécula de oxigênio produzindo o oxigênio singleto, um agente altamente citotóxico, que pode interagir com um grande número de substratos biológicos, induzindo danos à parede celular de bactéria,

fungos, etc. (HAMBLIN, 2016; PENHA et al., 2017; REZUSTA et al., 2012). Os processos do tipo II são conhecidos na IFD como as principais vias de danos em células microbianas, e por isso, é importante que a fonte de luz seja absorvida pelo corante para que a IFD seja efetiva.

A luz deve ter um comprimento de onda específico e um nível baixo de energia, que consiga ser absorvido pelo fotossensibilizador e, dessa forma, desencadear uma reação preferencialmente do tipo II (BHAVYA; HEBBAR, 2019; LUKSIENE; BROVKO, 2013; TEMBA et al., 2016). Há, uma ampla variedade de luzes que podem ser utilizadas como, por exemplo: os lasers, os diodos emissores de luz, assim como as lâmpadas incandescentes e fluorescentes. Os principais parâmetros da luz envolvidos na inativação fotodinâmica são: a potência, que é a energia capaz de provocar maior ou menor reação fotodinâmica; irradiância, é através do controle de irradiância que o operador pode gerar fotoativação; a densidade de energia, que é a taxa de energia que está sendo aplicada no tecido e o comprimento de onda, que define a profundidade de penetração da luz (MEISEL; KOCHER, 2005).

Assim como o avanço no desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, estão os estudos para novas fontes de luz. As lâmpadas UV-A têm sido utilizadas como uma alternativa, em tratamentos de fotoativação de curcumina em cobertura de salsichas (TOSATI et al., 2018), redução da contaminação das superfícies de espinafre e tomate cereja (DE OLIVEIRA; TIKEKAR; NITIN, 2018) e alfaces (DE OLIVEIRA et al., 2018).

2.3.3.1 Fotossensibilizador

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar a relação antimicrobiana e a capacidade fotossensibilizadora de compostos orgânicos corantes. Ainda no início do século XX, quando observado que células quando tratadas com corante laranja de acridina poderiam ser mortas se o tratamento fosse realizado sob luz solar, enquanto a luz solar ou o corante separadamente não produziam efeito nenhum. Como regra, os fotossensibilizadores devem ser biologicamente estáveis, fotoquimicamente ativos, possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados tripleto ou singleto e minimamente tóxico para os tecidos do organismo (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

A escolha do fotossensibilizador está associada com suas propriedades físico-químicas e com o sistema biológico em que irá atuar. Existem diferenças estruturais entre as células de diferentes micro-organismos, que influenciam o modo que o fotossensibilizador interage com

a célula e a eficácia da IFD. A principal diferença entre as bactérias é a estrutura da parede celular externa, que influencia a permeabilidade da parede celular, e a maioria dos fotossensibilizadores exibiram-se mais eficazes contra bactérias Gram-positivas, devido à barreira adicional na membrana externa das espécies Gram-negativas (ALVES et al., 2015; PENHA et al., 2017).

Diferentes grupos de compostos tem sido estudados, incluindo porfinas, ftalocianinas, corantes de xanteno, clorofilina (PENHA et al., 2017). Dentre os vários encontrados na literatura, recentemente, estudos relataram a aplicação de atividade antimicrobiana da curcumina (DOVIGO et al., 2011; HAUKVIK et al., 2009; JIANG et al., 2014; PENHA et al., 2017; TEMBA et al., 2016; TORTIK; SPAETH; PLAETZER, 2014; WU et al., 2015). Para ostras, a curcumina têm apresentado perspectivas promissoras como FS para IFD. A vida útil de ostras foi prolongada de 8 dias para 12 dias após o tratamento IFD, além de notável retenção de odor no final da sua vida útil, em relação as ostras não tratadas (LIU et al., 2016).

A Tabela 2.2, apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura de IFD, que utilizaram a curcumina como fotossensibilizador.

Tabela 2.2 – Tratamento de fotoativação com curcumina, relacionados a alimentos

Referencia	Micro-organismo	Fonte de Luz / comprimento de onda	Alimento
(TEMBA et al., 2016)	<i>A. flavus</i>	Luz visível (420 nm)	grãos de milho
(AL-ASMARI; MEREDDY; SULTANBAWA, 2018)	<i>A. niger</i> ATCC 6275, <i>A. flavus</i> ATCC 9643, <i>Penicillium griseofulvum</i> ATCC 48927, <i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10106, <i>Fusarium oxysporum</i> ATCC 62606, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 e <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ATCC 42476.	Luz visível (420 nm)	Superfície de Ágar
(BONIFÁCIO et al., 2018)	<i>L. innocua</i> NCTC 11288	Luz Blue Led (400–500 nm)*	Solução – <i>in vitro</i>
(JIANG et al., 2014)	<i>S. aureus</i>	Luz Blue Led (470 nm)	Solução – <i>in vitro</i>
(RIBEIRO et al., 2013)	<i>S. aureus</i>	Luz Blue Led (450 nm)	Solução – <i>in vitro</i>

(PASCHOAL et al., 2013)	<i>S. mutans</i>	Luz Blue Led (450 nm)	Solução – <i>in vitro</i>
(WU et al., 2016)	<i>V. parahaemolyticus</i>	Luz Blue Led (470 nm)	Solução – <i>in vitro</i> Ostras – <i>V. parahaemolyticus</i> adicionado
(PENHA et al., 2017)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966, <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028, <i>E. coli</i> ATCC 25922 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Luz Blue Led (470 nm)	Solução – <i>in vitro</i>
(LIN et al., 2019)	<i>Burkholderia cepacia</i>	Luz Blue Led (425 nm)	Solução – <i>in vitro</i>
(TAO et al., 2019)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Luz Blue LED (420 nm)	Maças cortadas
(LIU et al., 2016)	<i>Bactérias totais aeróbias</i>	Luz Blue LED (470 nm)	Parte cárnea das Ostras
(DE OLIVEIRA; TIKEKAR; NITIN, 2018)	<i>E. coli</i> O157:H7 e <i>L. innocua</i>	Luz UV-A (320–400 nm)*	Solução – <i>in vitro</i> E superfícies de alface, espinafre e tomate
(AURUM; NGUYEN, 2019)	<i>E. coli</i>	Luz Blue LED (465 -470 nm)	Superfície de ágar e Superfície de uvas
(TOSATI et al., 2018)	<i>L. innocua</i>	Luz UV-A (320–400 nm)*	Superfície de embutidos
(BHAVYA; HEBBAR, 2019)	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Luz (LED) azul (462 nm)	Suco de laranja
(AL-ASMARI; MEREDDY; SULTANBAWA, 2018)	Controle de Fungos	Luz Blue Led (420 nm)	Tamara fresca
(WU et al., 2015)	Norovirus - MNV- 1	Luz Blue Led (470 nm)	Solução – <i>in vitro</i> e o MNV-1 bioacumulado nas ostras sem conchas

(LIN et al., 2019)	<i>E. coli</i> O157: H7, <i>Salmonella</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Luz Blue Led (460 nm)	Melões cortados
(DOS SANTOS et al., 2019)	<i>S. aureus</i>	Luz Blue Led (450 nm)	Solução – <i>in vitro</i> e queijo <i>coalho</i>
(RANDAZZO; AZNAR; SÁNCHEZ, 2016)	<i>Calicivírus felino</i> (FCV) e <i>Norovírus murino</i> (MNV)	Luz Blue Led (464 a 476 nm)*	Solução – <i>in vitro</i>
(GONG et al., 2020)	<i>Contagem de bactérias totais</i>	Luz de LED (470 nm)	Esturjão (peixe) – pedaços de 15 g cada
(HU et al., 2019)	<i>Contagem de bactérias totais</i>	Luz de LED (425 nm)	Água viva (<i>Rhopilema esculentum</i>)

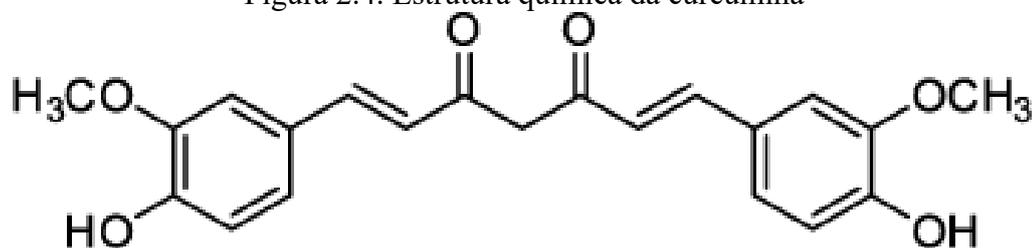
*comprimento de onda não informado, apenas faixa de emissão.

2.3.3.2 Curcumina

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dien 3,5 diona) é um pigmento usado desde a antiguidade para dar cor e sabor nas preparações alimentícias (AGGARWAL et al., 2013; MOGHADAMTOUSI et al., 2014). A curcumina é obtida dos extratos de açafrão, de rizomas moídos secos da *Curcuma longa* L, pertencente à família Zingiberácea (LEE et al., 2013). O extrato de açafrão é composto por três curcuminóides: curcumina (80%), demetoxcurcوبرina (18%) e bisdemetoxcurcوبرidade (2%). A curcumina é o curcuminóide mais utilizado e pesquisado, e vários estudos tem mostrado sua excelente atividade antioxidante, anti-inflamatórias e anticâncer (AGGARWAL et al., 2013).

A curcumina, é um polifenol hidrofóbico, sua estrutura química é composta por dois anéis metoxifenois, que são simetricamente ligados em conjugação através da porção β -dicetona, como pode ser observado na Figura 2.4, que desempenham um papel importante nas propriedades físico-químicas, e na atividade antioxidante da curcumina. Existem vários relatos da ação da curcumina em doenças hepáticas, auxiliando na redução dos níveis de colesterol sanguíneo, melhora na cicatrização de feridas diabéticas, propriedades anti-inflamatórias e inativação de bactérias (ANAND et al., 2007; BHAWANA et al., 2011; JEENGER et al., 2015; LEE et al., 2013; MAHMOOD et al., 2015).

Figura 2.4. Estrutura química da curcumina



Fonte: GOMES et al. (2014)

Devido às características químicas afetarem diferentes alvos moleculares, a curcumina tem sido reconhecida como agente pleiotrópico (pode atuar sobre diferentes tipos celulares) (JEENGER et al., 2015). Com o potencial terapêutico de: inibir e induzir importantes enzimas que regulam os processos anti-inflamatórios (devido à presença de grupos fenólicos na molécula), atividade antioxidantes (ela impede a peroxidação lipídica) (MUKHOPADHYAY et al., 1982), como antimicrobiano, interage fisicamente e inibe a atividade de muitas enzimas, receptores de fatores de crescimento (PRIYADARSINI, 2009).

Entretanto, devido as suas propriedades químicas, alta hidrofobicidade, baixa biodisponibilidade, técnicas para redução do tamanho das partículas de curcumina, visam melhorar sua solubilidade e aumentar sua atividade IFD. Vários estudos revelam que nanopartículas de curcumina, podem ter sua taxa de dissolução melhorada, a diminuição do tamanho aumentará subsequentemente a área da superfície, o que resulta no aumento da taxa de dissolução (LEE et al., 2013; VALEH-E-SHEYDA et al., 2015).

Na Tabela 2.3 são apresentadas algumas técnicas aplicadas para redução do tamanho de partículas de curcumina.

Tabela 2.3. Técnicas encontradas na literatura para redução de partículas de curcumina.

Referência	Processo	Tamanho das partícula obtidas
(ZHAO et al., 2015)	SEDS	325 nm
(XIE et al., 2015a)	SEDS	230 - 240 nm
(BHAWANA et al., 2011)	Moagem úmida – precipitação antissolvente	2 - 40 nm
(XIE et al., 2015b)	SEDS	< 100 nm
(JIA et al., 2015)	SAS* com ultra-som	< 100 nm
(KAKRAN et al., 2012)	Precipitação antissolvente (antissolvente água)	330 nm
	Precipitação antissolvente (antissolvente hexano)	150 nm
	Cristalização antissolvente/liofilização	2748 nm
(HOMAYOUNI et al., 2019)	Cristalização antissolvente homogeneização a alta pressão seguidos de liofilização	760 nm
(CARVALHO et al., 2015)	Precipitação antissolvente – moagem úmida	102,1 nm
(SILVA et al., 2017)	Moagem úmida	NI
(ADAHOUN et al., 2017)	Moagem úmida	359 nm
(PANDEY; CHATTE; DALVI, 2018)	Precipitação antissolvente	
(DONSÍ et al., 2010)	Homogeneização a alta pressão	600 nm
(YADAV; KUMAR, 2014)	Precipitação antissolvente	100-200 nm
(PRASAD; PATSARIYA; DALVI, 2017)	precipitação por redução de pressão de líquidos expandidos a gás (PPRGEL)	0,4 a 33,66 µm

SEDS: dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos e SAS: precipitação usando antissolvente supercrítico

Muitos são os métodos para obter nanopartículas/micropartículas para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos pouco solúveis tais como moagem e

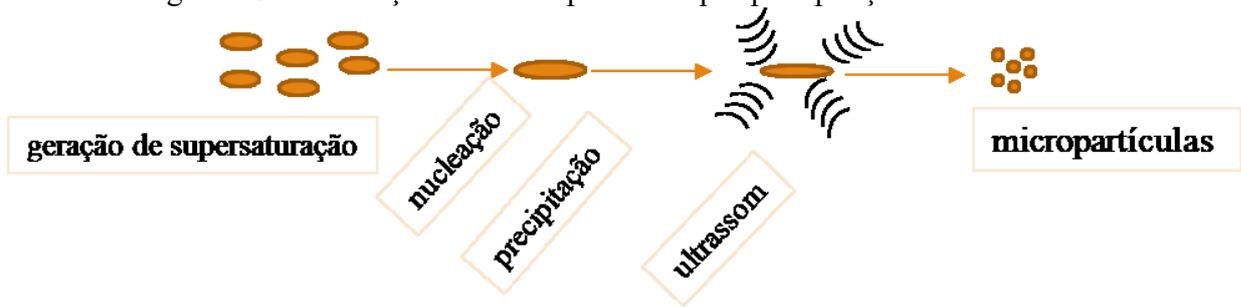
homogeneização de alta pressão, precipitação antissolvente, baixa injeção de fluxo, evaporação, precipitação e nanosuspensões são empregadas objetivando a redução do tamanho das partículas de curcumina (KAKRAN et al., 2012). Em geral, processos como precipitação com anti-solvente, são bastante simples, econômicas e fáceis de expandir, e como visto na Tabela 2.3, com aplicações para curcumina.

2.3.3.3 Precipitação antissolvente

A precipitação com antissolvente é uma técnica simples e de baixo custo. A atividade antimicrobiana de micropartículas de curcumina, preparadas por esta técnica foi melhorada em estudos *in vitro* com micro-organismos gram-positivos e gram-negativos em relação a curcumina nativa (SILVA et al., 2017). Dependendo das condições experimentais, a precipitação com antissolvente pode levar a cristais do tamanho de micron com uma área de superfície total alta (BHAWANA et al., 2011).

O processo de precipitação consiste em três etapas: geração de supersaturação, nucleação e subsequente crescimento de núcleos, ilustrado pela Figura 2.5. Inicialmente, o composto é dissolvido em um solvente, que rapidamente é misturado em um antissolvente, normalmente a água. Na adição do composto-solvente no antissolvente, a solubilidade do composto no solvente é reduzida em relação ao original, isso ocorre pelas alterações do equilíbrio de interações hidrofílicas e hidrofóbicas do sistema composto-solvente, e, dessa maneira, cria-se uma força motriz para a precipitação, chamada supersaturação. Essa etapa, é um pré-requisito para que a nucleação ocorra (KAKRAN et al., 2012; LIU; YANG, 2018). As partículas começam a precipitar quando o composto-solvente encontram um antissolvente e torna-se supersaturado. Muitos processos têm empregado o ultrassom, para poder facilitar o processo de nucleação e a fabricação de micropartículas (LIU; YANG, 2018). Quando as ondas de ultrassom penetram na solução saturada, a formação e a ruptura da bolha de cavitação, que pode promover um excesso de colisão de moléculas e uma saturação parcial excessiva, levando à nucleação primária, melhorando o controle na morfologia e tamanho das partículas (JIA et al., 2015; LIU; YANG, 2018).

Figura 2.5 – Formação das micropartículas por precipitação antissolvente.



Adaptado de Thorat; Dalvi (2014)

Os processos de redução de partículas dos compostos naturais utilizando técnicas antissolvente, desempenham um papel importante em diversos campos da indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica. Partículas com tamanhos nanométricos de 200-400 nm, tiveram sua biodisponibilidade elevada, em até 100%, em relação a partículas grandes (DURÁN et al., 2010). A atividade antimicrobiana das nanopartículas de curcumina foi mais eficaz contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. niger*, do que a curcumina nativa. Além disso, a atividade antimicrobiana é, mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas que bactérias Gram-negativas, e isso deve-se à estrutura de suas paredes celulares. Bactérias Gram-negativas, possuem uma barreira da permeabilidade externa (BHAWANA et al., 2011), dificultando a penetração do antimicrobiano. O aumento da solubilidade, contribui para a melhor permeabilidade da curcumina pela membrana (GERA et al., 2017).

As micropartículas de curcumina têm apresentado vantagens na aplicação como antimicrobiano, e na aplicação da TFD (PERNI et al., 2011). Neste trabalho buscamos melhorar a efetividade da IFD para aplicação em alimentos com alto teor de água.

CAPÍTULO 3. APLICAÇÃO DE ATMOSFERA MODIFICADA EM OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*) COZIDAS

Resumo

As ostras frescas possuem uma vida útil de aproximadamente 3 a 4 dias devido à carga microbiana natural, pH próximo da neutralidade e atividade de água superior a 0,90. Assim, o objetivo desta pesquisa foi aplicar diferentes atmosfera modificada com CO₂ e solubilização do CO₂ antes da embalagem em ostras para aumento da vida útil. Após o tratamento térmico, as conchas das ostras foram removidas, e a parte cárnea envasadas em embalagens com atmosfera modificada 80% N₂ e 20% CO₂ (MAP₁) e 100% CO₂ (MAP₂). Outra parcela das ostras foi submetida ao processo de solubilização de CO₂ (SGS), antes do envase em embalagem. As amostras foram armazenadas sob refrigeração, e a concentração de CO₂ no *headspace* da embalagem foi avaliado durante 15 dias. A concentração de CO₂ dissolvido nas amostras do SGS foi 750 mg CO₂ Kg do produto⁻¹, e para as amostras em atmosfera modificada tradicional foi 18 mg CO₂ Kg do produto⁻¹ para MAP₁ e 108 mg CO₂ Kg do produto⁻¹ para MAP₂. O menor teor de CO₂ dissolvido nas ostras embaladas em MAP₁ não foi capaz de reduzir o desenvolvimento microbiano nas ostras cozidas, condição obtida com as maiores concentrações de CO₂ dissolvida nas amostras MAP₂ e SGS. Os resultados de pH e estrutura de proteínas das ostras mostraram que as altas concentrações de CO₂, dissolvida no produto não causaram modificações significativas durante o armazenamento. Os resultados mostraram a possibilidade da solubilização do CO₂ no produto antes do envase em embalagem, como uma alternativa para aumentar a quantidade de CO₂ dissolvida no produto. E, para atmosferas com alta concentração de CO₂ para alimentos com alto teor de umidade, que ocorre uma excessiva absorção do gás pelo alimento durante o armazenamento e colapso das embalagens.

Palavras-chaves: Ostras cozidas, dióxido de carbono, estabilização de gás solúvel, concentração de CO₂ dissolvido.

3.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, 17,1 milhões de toneladas de moluscos (USD 29,2 bilhões) foram produzidos (FAO, 2018). As ostras representam 97% do mercado de moluscos. Entretanto, a

comercialização e consumo deste produto, na maior parte é na forma *in natura*. Estes produtos, desta forma *in natura*, são altamente perecíveis e sua deterioração é causada por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrios*, *Acinetobacter*, *Alteromonas* e *Flavobacterium*, comumente encontradas em ambientes marinhos (CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008b; HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011). O manejo inadequado pré e pós colheita também podem aumentar o desenvolvimento de bactérias naturalmente presentes e que causam deterioração (ANDREWS; PARK; CHEN, 2000). Além disso, a alta contaminação por *Vibrio* pode ser vista como uma ameaça ao organismo humano.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos e aprimorados nos últimos anos para redução de crescimento e inativação de bactérias deteriorantes e patogênicas em pescados, afim de aumentar a vida útil e a segurança no consumo destes produtos, sendo o mais comum, o tratamento térmico. O consumo desses produtos crus pode representar um risco a saúde do consumidor. De acordo com Andrews et al. (2000), o tratamento térmico das ostras imersas em água a 50 °C por 10 min foi suficiente para reduzir níveis de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* naturalmente presentes e intencionalmente adicionados, à níveis indetectáveis ($< 3 \text{ NMP g}^{-1}$).

O uso de embalagem com atmosfera modificada (MAP) tem crescido nos últimos anos como uma tecnologia eficiente para a conservação de peixes e moluscos. O dióxido de carbono (CO₂) é o principal gás utilizado nestes sistemas de embalagem, devido seu efeito bacteriostático (JAKOBSEN, M. BERTELSEN, 2002). A MAP pode ser aplicada na forma de injeção do gás diretamente no interior da embalagem, ou pela solubilização do gás ou composição gasosa diretamente no produto antes da embalagem de varejo.

O processo de solubilização do CO₂ antes da embalagem de varejo, conhecido como método estabilização de gás solúvel (SGS) ou *Soluble Gas Stabilisation*, além de assegurar a ação bacteriostática do CO₂, o processo tem como objetivo reduzir/evitar o colapso das embalagens, devido a solubilização ou dessorção do CO₂ que ocorre no conteúdo líquido e no conteúdo lipídico do alimento para o *headspace* da embalagem ou do *headspace* da embalagem para o alimento. Baseados na relação do aumento da solubilidade do CO₂ em baixas temperaturas pelo aumento da pressão parcial e total, Sivertsvik et al. (2004) propuseram que uma quantidade suficiente de CO₂ pode ser dissolvida dentro do período de 1-2 horas antes do envase, se houver o aumento da pressão parcial do gás e o volume de CO₂ disponível no *headspace*. Essa tecnologia têm mostrado resultados promissores a diversos alimentos, como queijo, mexilhão, sardinha, bacalhau, entre outros (JAKOBSEN; RISBO, 2009; LIMA et al.,

2015; MENDES; GONÇALVES, 2008a; ROTABAKK; LEKANG; SIVERTSVIK, 2007; SIVERTSVIK, 2007).

Neste estudo, o objetivo foi aplicar duas técnicas de atmosfera modificada para aumentar a vida útil de ostras cozidas: atmosfera modificada tradicional (MAP) e a estabilização de gás solúvel (SGS), usando o CO₂ e avaliar os efeitos da atmosfera modificada nas propriedades físico-químicas e microbiológica das ostras.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

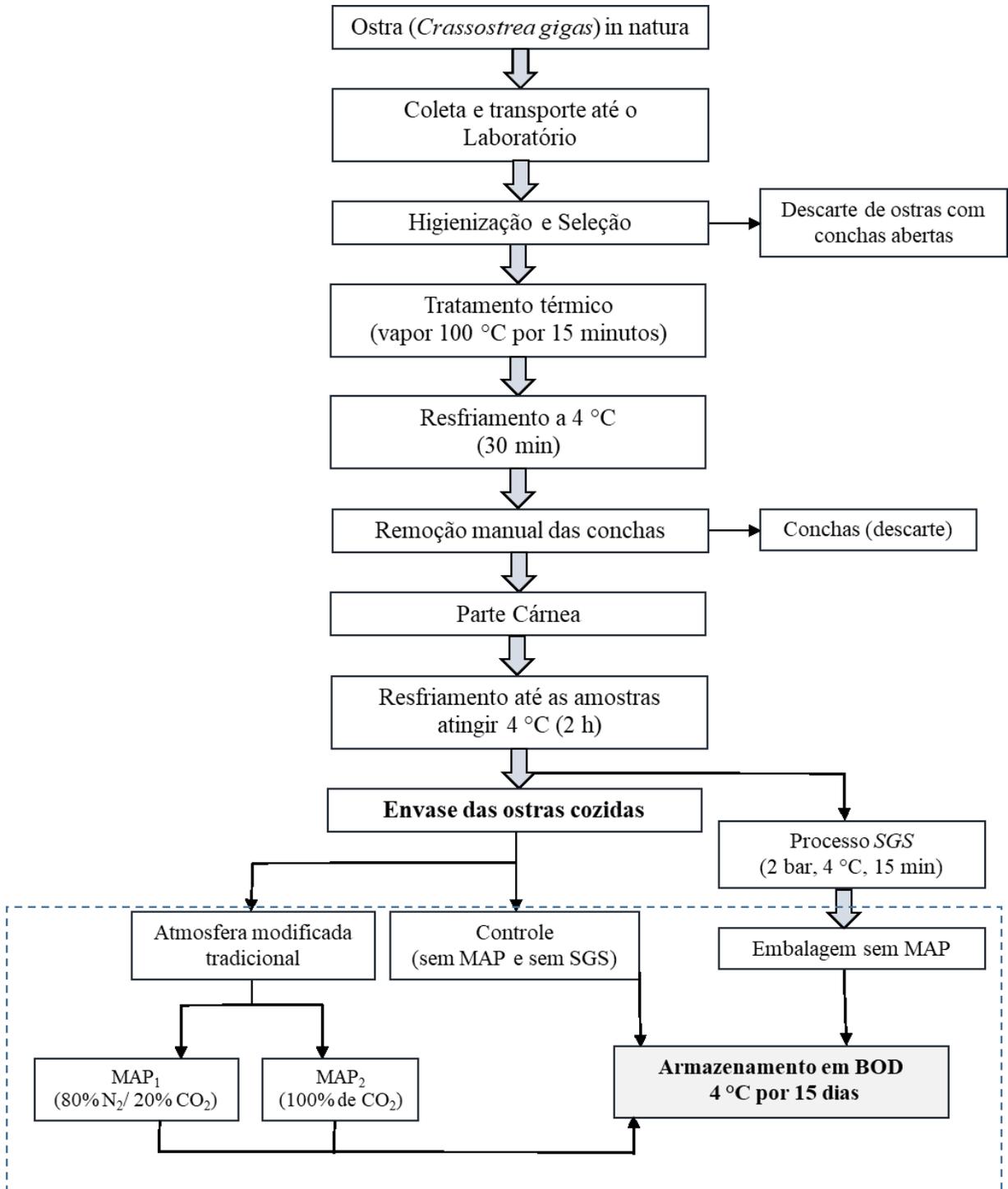
Matéria prima

A ostra (*Crassostrea gigas*) utilizada nos experimentos foi adquirida de um produtor local, da costa leste da ilha de Santa Catarina. As ostras eram colhidas no dia do processamento, possuíam em média 7 meses, e pesavam cerca de $97,13 \pm 10,09$ g. O transporte das ostras até o laboratório PROFI, foi realizado em caixas isotérmicas.

Processamento das ostras

As ostras foram processadas de acordo com o fluxograma demonstrado na Figura 3.1.

Figura 3.1. Fluxograma do procedimento adotado para o processamento e tratamentos das ostras (*Crassostrea gigas*).



No laboratório, as ostras foram lavadas em água corrente para remover sujidades aderidas à concha, e selecionadas, sendo descartadas as conchas abertas.

Após seleção, as ostras foram submetidas ao tratamento térmico para facilitar a abertura das conchas e redução da microbiota naturalmente presente.

O tratamento térmico foi realizado em bateladas, em cada uma delas foram processadas 7 dúzias de ostras (≈ 7 kg de ostras). O tratamento térmico foi realizado sob vapor à 100 °C e durante 15 minutos, em autoclave vertical (marca Phoenix, modelo AV-50, Brasil). A quantidade de ostras e o tempo do tratamento térmico foram determinados a partir de testes preliminares, através da otimização do processo de tratamento térmico, e resultados esperados (redução da microbiota das ostras).

Após atingido o tempo de tratamento térmico, as ostras foram dispostas em bandejas de polietileno de alta densidade, e resfriadas em câmara tipo BOD (Dist, Florianópolis, Brasil) a 4 °C por no mínimo 30 minutos, tempo suficiente para resfriar as conchas e permitir o desconchamento manual.

O desconchamento manual foi realizado sob condições estéril, e com faca própria para abrir as conchas das ostras. A parte cárnea da ostra era removida, colocadas em béqueres estéreis, e levadas a câmara tipo BOD a 4 °C por aproximadamente 2 horas, para que as amostras (parte cárnea das ostras) atingissem 4 °C, para posterior envase.

Envase das ostras cozidas

Neste trabalho foram utilizados dois métodos para adição de atmosfera modificada com CO₂, a adição da atmosfera modificada no interior da embalagem durante o envase (atmosfera tradicional), e pela adição do CO₂ diretamente no produto antes do envase na embalagem (solubilização do CO₂ – processo SGS)

Atmosfera tradicional

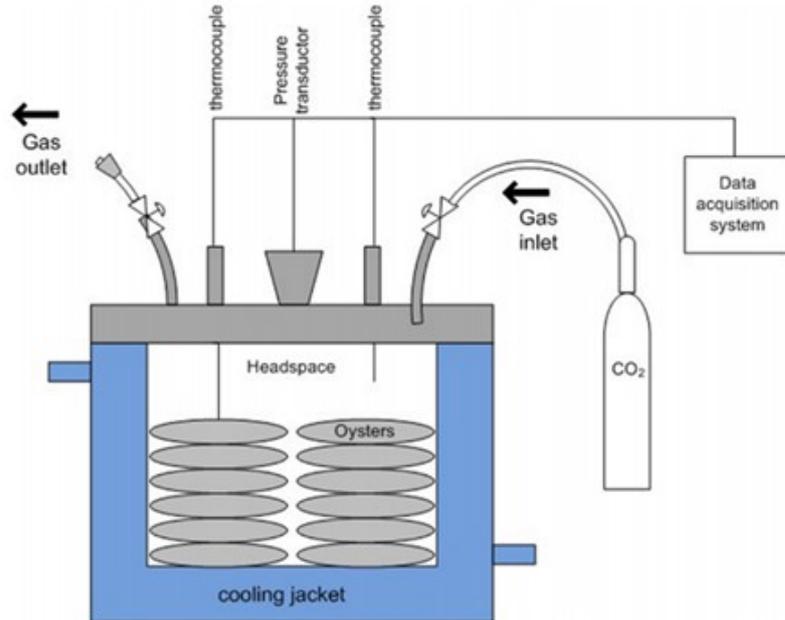
A parte cárnea das ostras cozidas e resfriadas foram divididas em porções de 100 ± 10 g e colocadas em embalagens flexíveis de alta barreira, composta de poliamida/polietileno/polietileno modificado, transparente e de espessura de 90 μm , fabricadas e cedidas pela Spel Embalagens Ltda, com permeabilidades ao oxigênio (TPO₂) 55 (cm^3 (stp) m^{-2} dia^{-1}) e ao vapor d 'água (TPVA) 62 (g m^{-2} dia^{-1}). E posterior, adição da atmosfera modificada por uma seladora (Selovac modelo 200b, Brasil). Para adição da atmosfera modificada, o ar atmosférico foi evacuado e posteriormente adição da atmosfera modificada 80% N₂/ 20% CO₂ (**MAP₁**) e 100% de CO₂ (**MAP₂**).

Para as amostras controle, procedeu-se apenas da remoção do ar atmosférico suficiente para a selagem da embalagem.

Solubilização de CO₂ em ostras antes da embalagem (processo SGS)

O aparato experimental utilizado nos tratamentos, representado na Figura 3.2 foi construído e validado pelo grupo de pesquisa (CABRAL, 2011; LIMA, 2014; SOARES et al., 2015).

Figura 3.2- Ilustração do aparato experimental para solubilização de CO₂ em alimentos.



Fonte: Soares et al. (2015)

O aparato constituía-se de uma câmara de solubilização em aço inoxidável com um volume total de 843 cm³, imersa em um banho termostático (Te- 184, Tecnal, Brasil) para controle de temperatura. Um transdutor de pressão (Warme WTP-4010, Brasil), duas válvulas tipo agulha (Swagelok) e dois termopares do tipo J (Salvi Casagrande – Brasil) calibrados. A válvula de entrada, conectada a um cilindro de CO₂ – grau alimentício (99.9%, White Martins, Brasil). E, a de saída conectada a uma bomba de vácuo (Prismatec 121A), usada no início da operação do sistema para remoção do ar atmosférico. Os termopares e o transdutor de pressão foram conectados a um sistema de aquisição de dados (Agilent, Data Acquisition 34970A, EUA), acoplado em um computador que armazena os dados através do software Benchlink Data Logger 3.0 (Agilent, 2009). Os dados experimentais de pressão e temperatura foram coletados a cada 10 segundos.

Antes de cada tratamento, eram realizados testes de vedação. Com o recipiente vazio, era injetado o gás CO₂ (cerca de 200 kPa) no interior do recipiente vazio, e controlada a temperatura. Após 24 horas foi verificado se haviam vazamentos através da manutenção da

pressão inicial e final. O procedimento foi realizado para certificar-se que a variação de pressão durante o processo de solubilização, era referente à absorção do gás pela amostra.

O CO₂ foi solubilizado nas ostras de acordo com o método *Soluble Gas Stabilisation* (SGS), proposto por Sivertsvik et al. (2004), seguindo o protocolo descrito por Lima et al. (2015). O tratamento SGS foi realizado em bateladas de 400 ± 10 g. As ostras eram colocadas na câmara de solubilização, e feita a remoção do ar atmosférico. Em seguida, as amostras foram sujeitas a uma concentração de CO₂, no interior da câmara, próxima de 100% (99.9%), a uma pressão de 2 bar, durante 15 min, tempo para que as amostras atingissem aproximadamente 750 ppm de CO₂ dissolvido nas ostras.

Após SGS, as ostras foram colocadas em embalagens flexíveis de alta barreira (descritas acima), que foram seladas sem adição de atmosfera modificada no interior da embalagem.

As embalagens de atmosfera modificada tradicional e SGS, e controle foram colocadas em câmara de refrigeração BOD a 4 ± 0,5 °C, e armazenadas e avaliadas durante 15 dias.

3.2.2 Análises dos gases

3.2.2.1 Determinação da quantidade de CO₂ dissolvido durante a solubilização

A concentração inicial de CO₂ nas ostras, após SGS foi calculada pela Equação 3, a qual representa um balanço de CO₂ entre o alimento e fase gasosa. Utilizando dados de pressão registrados durante o processo de solubilização do CO₂ nas ostras, a concentração do CO₂ absorvido pelas ostras foi calculada pela variação da pressão que ocorreu no sistema.

$$C_{\text{CO}_2}^{t=s} = \frac{g/p (P_{\text{CO}_2}^{t=0} - P_{\text{CO}_2}^{t=s}) M_{\text{CO}_2}}{RT\rho_p} \quad (3)$$

Em que: $C_{\text{CO}_2}^{t=s}$ é a concentração de CO₂ nas ostras instante t (t= antes do envase) (mg CO₂. kg de ostras⁻¹), ρ_p é a massa específica aparente do produto (kg cm⁻³), R é a constante universal dos gases (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹) e T é a temperatura da amostra em K. M_{CO_2} é a massa molecular de CO₂ (44,01 g mol⁻¹), $P_{\text{CO}_2}^{t=0}$ é a pressão parcial no início da solubilização do CO₂,

$P_{CO_2}^{f=s}$ é a pressão parcial do CO_2 ao final da solubilização e g/p é a relação entre o volume de gás e o volume de produto, sendo:

$$g/p = \frac{V_g}{V_p} = \frac{1000 V_g \rho_p}{m_p} \quad (4)$$

Onde: m_p é a massa do produto (kg), V_g e V_p representam o volume do gás e o volume de produto, respectivamente, no sistema (m^3).

3.2.2.2 Determinação do CO_2 absorvido pelas ostras durante o armazenamento

A concentração de CO_2 absorvido pelas ostras durante o armazenamento foi calculada através da variação do volume de gás dentro das embalagens flexíveis (*headspace*), baseada na metodologia de Rotabakk et al. (2007). O volume de gás no *headspace* das embalagens foi determinado pela imersão das embalagens sob água e a força resultante medida em um texturômetro (StableMicro System Ltd., TAXT plus Godalming, Inglaterra). O volume do *headspace* foi determinado a partir da Equação 5:

$$V_{HS} = \frac{F_{res}}{g \cdot \rho_f} + \frac{m_a}{\rho_f} - \frac{m_a}{\rho_a} \quad (5)$$

Em que, V_{HS} é o volume de gás no *headspace* (m^3), F_{res} é a força resultante (N), g é a aceleração da gravidade ($m^2 s^{-1}$), ρ_f é a massa específica do fluido ($kg m^{-3}$), ρ_a é a massa específica do alimento ($kg m^{-3}$), e m_a é a massa do alimento (kg).

Com a variação do volume de gás no *headspace* da embalagem a concentração do CO_2 foi calculada pela Equação 6:

$$C_{CO_2}^t = \frac{1000 (V_{CO_2i} - V_{CO_2t}) M_{CO_2}}{R \times T \times m_p} \quad (6)$$

Onde: $C_{CO_2}^t$ é a concentração de CO_2 no tempo t ($mg CO_2 kg produto^{-1}$), V_{CO_2i} é o volume de CO_2 no tempo inicial (m^3), V_{CO_2t} é o volume de CO_2 no tempo t (m^3), M_{CO_2} é a massa molar de CO_2 ($44,01 g molCO_2^{-1}$), m_p é a massa de produto (kg).

Para auxílio na realização dos cálculos das concentrações foram desenvolvidas rotinas computacionais para o *software* Matlab (R2012, Math Works Inc, MA, USA).

3.2.2.3 Análise de composição gasosa

A análise dos níveis de O₂ e CO₂ no *headspace* das embalagens foi realizada com um analisador de gases (Analisador Checkmate 9900, PBI-Dansensor, Ringsted, Dinamarca). A coleta das amostras de gás foi realizada através de um septum de borracha colado na parte externa da embalagem, e conectada ao analisador de gás para obtenção da concentração de CO₂ e O₂, conforme Figura 3.3. As análises eram realizadas antes da abertura das embalagens para análises físico-química logo após envase e durante o armazenamento.

Figura 3.3- Analisador de gases para leitura de composição gasosa do interior de embalagens.



3.2.3 Análises físico-químicas

Os parâmetros físico-químicos: pH, umidade e perda de água por exsudação das amostras foram avaliados nas ostras *in natura*, após tratamento térmico, e durante o período de armazenamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.1 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido diretamente nas ostras com um pHmetro para sólidos (Testo 205), previamente calibrado, composto por uma sonda para medição de pH e temperatura. As leituras foram realizadas em cinco unidades de ostras por embalagem, e em cada unidade foram realizadas 3 leituras, para determinação dos valores médios foram consideradas as leituras de três ostras.

3.2.3.2 Umidade

A determinação do teor de umidade para as ostras foi realizada conforme o método 925.09 da AOAC (2005). Cinco gramas de ostras foram pesados em balança analítica (Shimadzu AY220), e submetidas a secagem 105 °C em estufa (Marca Tecnal, TE - 394/2, Brasil) até peso constante (\approx 24 h).

3.2.3.3 Perda de água por exsudação

O exsudado do produto nas embalagens foi quantificado gravimetricamente para cada embalagem -. A massa do exsudado (g) foi dividida pela massa inicial do produto (g) e relatada como uma percentagem (%), conforme Equação 7, como sugerido por Lima et al. (2017) e Sivertsvik & Birkeland (2006).

$$\text{PPE (\%)} = \frac{m_a - m_e}{m_e} \quad (7)$$

Em que PPE é percentual de exsudado da amostra, m_a é a massa inicial da amostra e m_e é a massa do exsudado.

3.2.4 Propriedades térmicas

Para as análises relacionadas as proteínas das ostras foram utilizadas amostras do musculo adutor das ostras, por esta representar a parte mais firme da amostra e talvez a mais homogênea da amostra.

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), foi usada com objetivo de avaliar a influência do tratamento térmico e do armazenamento nas proteínas das ostras. As análises de DSC foram realizadas em amostras de ostra *in natura*, após tratamento térmico e em amostras após armazenamento sob atmosfera modificada. Cerca de 35 mg do músculo adutor das ostras foram usadas, em recipientes de alumínio, fechados hermeticamente, pesadas em balança analítica (Shimadzu, AY220, Filipinas) e analisadas em DSC Perkin-Elmer, Jade (Massachusetts), previamente calibrado com índio ($T = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ e $H = 28,71 \text{ J g}^{-1}$), utilizando-se gás de arraste N_2 com vazão de 45 ml min^{-1} . Os termogramas das amostras foram obtidos em um faixa de temperatura de 5 a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, com uma velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A temperatura de desnaturação (T_d) e a variação da entalpia total de desnaturação (ΔH_d) das proteínas foram estimadas de acordo com Kazemi et al. (2011) (medindo a área sob a curva de transição), utilizando o software Pyris da Perkin Elmer versão 9.02.0193.

3.2.5 Análise de proteína

A eletroforese SDS-Page foi realizada no laboratório de Imunologia Aplicada – LIA, UFSC. Para as análises de eletroforese em gel de poliacrilamida utilizou-se metodologia baseada no método descrito por Laemmli (1970).

Dos musculo adutores das amostras de ostras, cerca de 250 mg foram homogeneizados com 50 μL de PBS (tampão fosfato salino) em ultra-turrax (IKA). Esta solução foi armazenada em freezer até o momento de aplicação no gel. Para aplicação gel, as amostras foram preparadas por diluição em meio PBS e obtendo uma concentração final de 7 mg ml^{-1} . A estimativa da concentração de proteínas nas amostras foi realizada de acordo com método de Bradford, usando a albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

Após preparo dos géis de empilhamento e de resolução, procedeu-se a aplicação das amostras. No primeiro poço foram adicionados 15 μL do padrão de massa molar (BenchMark™ Protein Ladder), e nos outros poços foram adicionados 20 μL das amostras a serem analisadas.

A célula de eletroforese foi acomodada na cuba de eletroforese vertical Mini Protean III (Bio-Rad) e preenchida com tampão de corrida (contendo: 14 g de glicina, 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 3 g de Tris base e 1000 mL de água destilada) de modo a cobrir os poços do gel de empilhamento. A cuba foi fechada e ligada a uma fonte de alimentação de

energia com corrente constante de 30 A e uma voltagem de 250 V, até o marcador azul atingir o fundo do gel.

Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido, e o gel de resolução foi corado com solução corante azul brilhante (Blue R-250) durante aproximadamente 24 h. No dia seguinte, o gel foi descorado lavando-o com água destilada aquecida em micro-ondas até completa visualização das bandas.

3.2.6 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos 2, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Métodos utilizados para estes ensaios são descritos conforme American Public Health Association (A.P.H.A.) – (2001).

3.2.6.1 Contagem de bactérias aeróbios mesófilos totais e psicrotróficos totais.

Em cada ponto experimental, cerca de 100 gramas de ostras foram picadas com auxílio de uma pinça. Destas, 25 gramas foram homogeneizadas com água peptonada 0,1% (p/v), obtendo-se a diluição 1:10 (10^{-1}) para análises de aeróbios mesófilos totais e psicrotróficos totais. Em seguida, foram realizadas as demais diluições decimais seriadas, em tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada, as diluições foram realizadas até se atingir a diluição necessária para as contagens, que variaram com o tempo de armazenamento. Os tubos de ensaio com cada diluição foram agitados em agitador de tubos tipo Vortex (BIOMIXER, VTX-F). Após cerca de 100 μ L das diferentes diluições foram semeadas em duplicata em placas com cerca de 15 a 20 ml de meio PCA (Plate Count Agar) para psicrotróficos. Para mesófilos totais o plaqueamento foi por profundidade. As placas foram incubadas invertidas a 36 ± 1 °C por 24 horas para contagem de total de aeróbios mesófilos e a 7 ± 1 °C por 10 dias para contagem total de psicrotróficos.

*3.2.6.2 Presença ou ausência de *Vibrio* spp.*

Para identificação da presença de *Vibrio* spp, as amostras foram homogeneizadas em água peptonada 0,1% com 3% de NaCl. A partir dessa diluição (10^{-1}), preparou-se diluições

decimais até 10^{-3} . Destes tubos foram transferidas em duplicata 1 ml de cada tubo diluição para tubos com 10 ml de água peptonada alcalina (APA). E em seguida, os tubos (APA) foram incubados a 36 ± 1 °C por 24 horas.

A partir de cada tudo com turvação, foi coletada uma alçada do material para estriamento em meio TCBS (ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose) para isolamento de *Vibrio* ssp. As placas foram incubadas invertidas a 36 ± 1 °C por 24 horas e após realizada a identificação de colônias características. Verificou-se as placas quanto à presença de colônias suspeitas de serem *V. parahaemolyticus*, com as seguintes características no meio seletivo: colônias lisas, opacas e com bordas amarelas finas no Ágar TCBS, algumas colônias podem ser verdes ou incolores no Ágar TCBS devido a fermentação tardia da sacarose por cepas de *V. cholerae* (ACUMEDIA).

Para confirmação da presença *V. parahaemolyticus*, foi retirada uma alÍquota de 1ml da cultura obtida após o período de incubação da etapa do primeiro enriquecimento seletivo (APA). Essa alÍquota foi transferida assepticamente para um microtubo de 2 ml identificado e congelada a -20 °C para posterior confirmação por PCR em tempo real.

3.2.7Análise estatística

Todos os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo do teste de Tukey considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), utilizando o software Statistic versão 10.0 (Statsoft Inc. Tulsa, USA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Microbiologia das ostras após tratamento térmico

Além de facilitar a abertura das conchas, o tratamento térmico é aplicado em moluscos em geral para redução da contagem de bactérias totais. A redução obtida na contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, e inativação de *Vibrio* spp das ostras após o tratamento térmico são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Valores de contagem microbiológica para aeróbios mesófilos e psicrotróficos (log UFC g⁻¹) e ausência de *Vibrio* spp em ostras crua e após tratamento térmico (100 °C).

	Ostras crua	Após tratamento térmico (7 kg/ 15 min)
<i>Vibrio</i> spp	Presença	Ausência*
Mesófilos	3,24 ± 0,78	2,47 ± 0,30 ^a
Psicrotróficos	3,44 ± 0,67	<2,00 ± 0 ^b

*não houve crescimento em TCBS.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

A contagem inicial de micro-organismos mesófilos das ostras cruas foi 3,24 log UFC g⁻¹ e de micro-organismos psicrotróficos foi de 3,44 log UFC g⁻¹. Estes resultados são característicos de ostras crua, pois pela sua atividade filtrante, podem acumular matéria orgânica e inorgânica no seu interior, e que reflete as características microbiológicas do seu *habitat*, principalmente a qualidade da água (DE LIMA; MELO; MONTEIRO, 2013). Embora as contagens microbianas iniciais de moluscos variem dependendo de muitos fatores, os valores são geralmente entre 10² e 10⁵ UFC g⁻¹ (RONG et al., 2010).

O uso do tratamento térmico em moluscos tem como objetivo facilitar a abertura das conchas e redução da microbiota. As ostras, após tratamento térmico (100 °C por 15 min), a contagem total de micro-organismos mesófilos reduziu de 3,24 para 2,47 log UFC g⁻¹. E, a contagem de psicrotróficos reduziu de 3,44 para < 2 log UFC g⁻¹. A temperatura e o tempo de aquecimento utilizados no tratamento térmico devem ser otimizados para obter produtos de qualidade, isto é, propriedades sensoriais semelhantes às ostras frescas e vida útil satisfatória (CHAI et al., 1991). O efeito do tratamento térmico sob os micro-organismos dependem de uma série de fatores, como por exemplo, pH, água, número de micro-organismos, fase de crescimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008). No entanto, a maioria dos micro-organismos psicrotróficos e mesófilos não resistem ao processo térmico, porém práticas inadequadas

podem acarretar a recontaminação dos produtos, o que pode viabilizar o crescimento em baixas temperaturas (HUSS, 1997).

Soares et al. (2015) usou o tratamento térmico de ostras (*Crassostrea gigas*) para facilitar a abertura das conchas e redução da carga microbiana. Os autores usaram o tratamento térmico de vapor à 99,6 °C por 10 min em bateladas de 5 kg de ostras, e obtiveram redução nas contagens de 3,92 log UFC g⁻¹ para 1,40 log UFC g⁻¹ para micro-organismos mesófilos, e de 3,99 log UFC g⁻¹ para <1 log UFC g⁻¹ para micro-organismos psicrotróficos. COSTA (2013) aplicou tratamento térmico (80 °C por 10 min) em embalagens flexíveis termoprocessáveis, para mexilhões pré-cozidos e sem concha, e obteve reduções para contagem de micro-organismos mesófilos totais de 5,44 log UFC g⁻¹ para 4,44 log UFC g⁻¹ e de 5,79 log UFC g⁻¹ para 3,84 log UFC g⁻¹ para psicrotróficos.

Cavalheiro et al. (2013) também obtiveram reduções nas contagens microbiológicas após tratamento térmico (100 °C por 6 min) de mexilhões (*Perna perna*). A contagem total de micro-organismos psicrotróficos reduziu de 2,48 log UFC g⁻¹ para 2,00 log UFC g⁻¹ após o tratamento, e a contagem total de micro-organismos mesófilos reduziu de 2,48 log UFC g⁻¹ para 2,34 log UFC g⁻¹. O mesmo tratamento foi realizado por, Lima et al. (2017) para mexilhões (*Perna perna*). Os autores obtiveram reduções da contagem mesófila de 3,71 log UFC g⁻¹ para 2,00 log UFC g⁻¹. E, a contagem psicrotrófica de 3,08 log UFC g⁻¹ para 2,30 log UFC g⁻¹.

A Tabela 3.1 apresenta também os resultados de *Vibrio* spp em amostras de ostras. Observou-se que as ostras cruas apresentaram presença de *Vibrio* spp. E após o tratamento térmico (100 °C por 15 min) não houve crescimento de colônias características de vibrios nas placas. *Vibrio* spp é um micro-organismo sensível a desidratação e ao calor (FORSYTHE, 2002). Estudos realizados mostraram que amostras de ostras, aquecidas a 60 e 80 °C, havia poucos sobreviventes após 15 minutos. Quando a temperatura foi elevada para 100 °C nenhuma cepa foi encontrada (FRANCO, 2008).

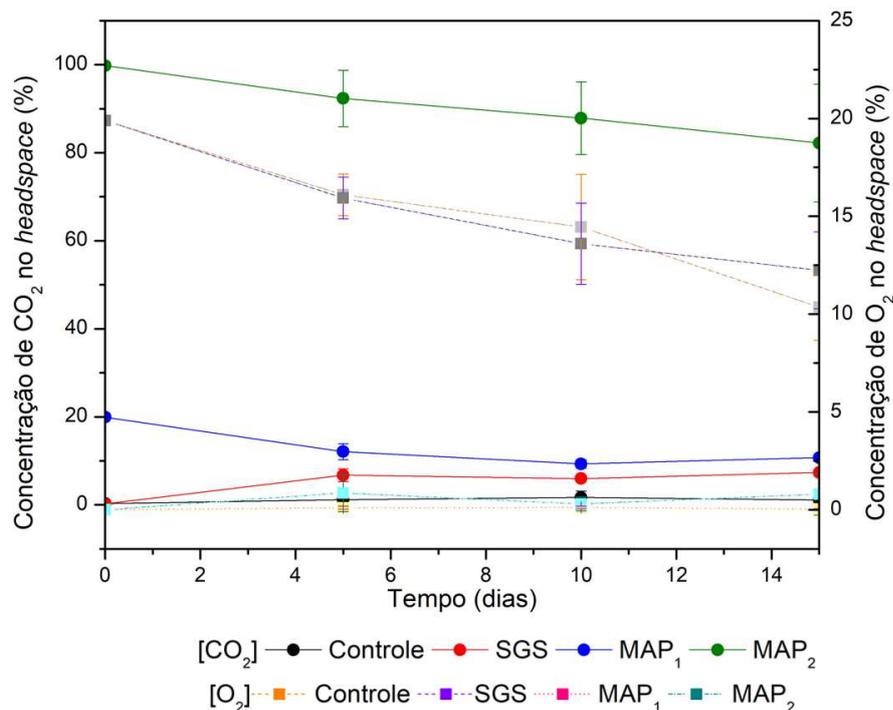
A identificação da presença ou ausência de vibrios foi realizada apenas nas amostras de ostras cruas e após tratamento térmico, uma vez que foi confirmado que o tratamento térmico foi eficiente na inativação deste micro-organismo, não deve ocorrer crescimento/desenvolvimento de vibrios durante o armazenamento sob atmosfera modificada.

3.3.2 Armazenamento de ostras cozidas em atmosfera modificada

3.3.2.1 Variação da composição gasosa do headspace da embalagem e da quantidade de CO₂ absorvido pelas ostras

As ostras envasadas, foram avaliadas em relação a mudança na composição do *headspace* da embalagem, no que se refere aos níveis de CO₂ e O₂, durante o armazenamento a 4 °C. Os resultados da concentração de CO₂ e O₂ do interior das embalagens são apresentados na Figura 3.4.

Figura 3.4- Níveis de CO₂ e O₂ no *headspace* da embalagem durante o armazenamento de ostras cozidas sob atmosfera modificada.



As amostras armazenadas a 4 °C sob atmosfera tradicional, MAP₁ e MAP₂, mostram redução nos níveis de CO₂ do interior da embalagem, principalmente no início do armazenamento. Até o 5 ° dia de armazenamento, as amostras MAP₁ tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de CO₂ de 19,9% para $12,1 \pm 1,8\%$, e as amostras MAP₂ reduziram de 99,8% para $92,3 \pm 6,4\%$. Essa redução é devida à dissolução de CO₂ na fase aquosa e na fase lipídica do tecido (DEVLIEGHERE; DEBEVERE; VAN IMPE, 1998). Após

este período, a redução nos níveis de CO₂ no interior das embalagens foi menor, e não houve reduções significativas ($p > 0,05$) nos níveis de CO₂ do interior da embalagem até o final do armazenamento. No final do armazenamento, para as embalagens de MAP₁ o nível de CO₂ foi de $10,7 \pm 0,4\%$, e a MAP₂, apresentou nível de CO₂ de $82,2 \pm 13,4\%$. A redução nos níveis de CO₂ presente no headspace durante o armazenamento é resultado da solubilidade do gás na ostra, com menos CO₂ para ser dissolvido na massa do produto, reflete na diminuição da taxa de absorção até o momento em que o equilíbrio termodinâmico do sistema será atingido (SIVERTSVIK et al., 2004).

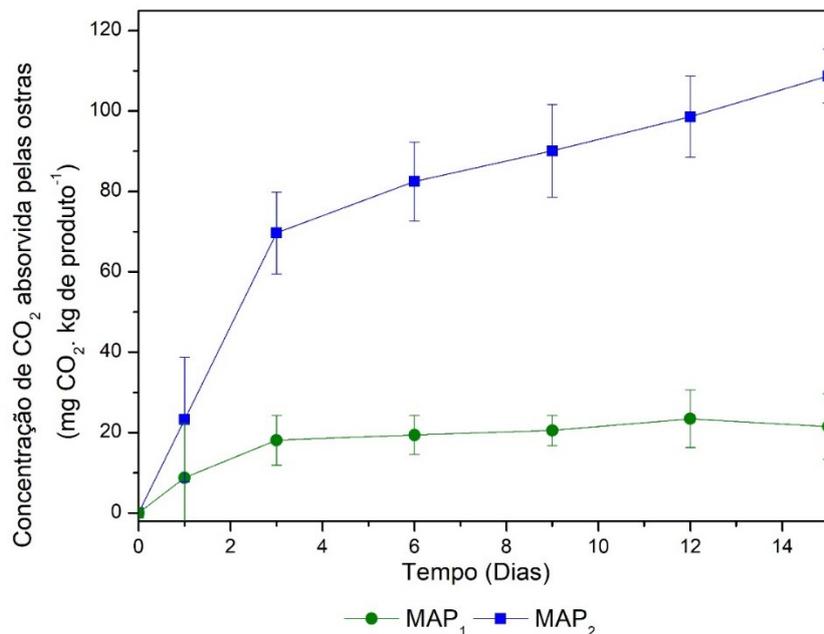
A amostra SGS, mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) de 0,2 para 7,4% nos níveis de CO₂ do interior da embalagem, e redução de 19,9 para $12,2 \pm 2,0\%$ nos níveis de O₂, no final do armazenamento. Esse aumento nos níveis de CO₂, ocorreu possivelmente devido a liberação do CO₂ pelas ostras, para o interior das embalagens, como também foi relatado por (SIVERTSVIK et al., 2004). No momento que o alimento é retirado do sistema de solubilização de CO₂, este pode estar supersaturado de CO₂, e quando é submetido a pressão normal, ocorre a dessorção do gás do alimento para a atmosfera, até o alimento encontre o equilíbrio. Soares et al. (2015) avaliaram a taxa de absorção e dessorção de CO₂ em ostras, e um dos fatores atribuídos a dessorção do CO₂ pelas ostras poderia ser à sua estrutura porosa, que pode conter gás sem estar necessariamente dissolvido na porção intracelular, o que pode potencializar a dessorção quando o produto é submetido a pressões normal. Sivertsvik; Birkeland (2006) submeteram camarão cozido ao processo de SGS com 100% de CO₂, por 2 horas em uma embalagem como $g/p > 14$, e observaram liberação de CO₂ dissolvido do camarão durante o tratamento SGS, quando o camarão foi submetido a baixa pressão parcial de CO₂ na embalagem final.

Por outro lado, na amostra controle os níveis de CO₂ do interior da embalagem aumentaram de 0,3 no dia 0 para 1,1% ao 15 ° dia de armazenamento, e os níveis de O₂ reduziram significativamente ($p < 0,05$) de 19,9% para $10,4 \pm 1,7\%$ até o 15 ° dia de armazenamento. Essa redução no O₂ e aumento do CO₂ no interior da embalagem controle, provavelmente é devido ao desenvolvimento microbiano e atividade enzimática. O aumento da contagem microbiana, principalmente de micro-organismos psicrotróficos que produzem CO₂ através de sua atividade metabólica (BONO; BADALUCCO, 2012). Durante o armazenamento a composição gasosa no interior de uma embalagem pode sofrer alterações, devido as reações do alimento (respiração do produto, difusão do gás através do produto), permeabilidade das

embalagens, crescimento microbiano. (GORRIS; PEPPELENBOS, 1999). Mendes; Pestana; Gonçalves (2008) observaram a mesma redução nos níveis de O_2 de filés de sardinha durante o armazenamento refrigerado após 2 dias e atribuíram o comportamento ao consumo devido ao metabolismo de micro-organismos e processos bioquímicos oxidativos.

A concentração de CO_2 absorvida pelas ostras envasadas em atmosfera tradicional durante o armazenamento a $4\text{ }^\circ\text{C}$ é mostrado na Figura 3.5. A quantidade de CO_2 absorvida pelas ostras envasadas em MAP_2 , que continha uma composição gasosa de 100% de CO_2 , foi maior em relação as ostras envasadas em MAP_1 , que continha 20% de CO_2 e 80% de N_2 na composição gasosa. Nas primeiras 48 horas do armazenamento, a concentração de CO_2 dissolvido nas ostras em MAP_2 foi $69,67\text{ mg } CO_2\text{ kg}^{-1}$ de produto, e em MAP_1 foi de $18\text{ mg } CO_2\text{ kg}^{-1}$ de produto. A maior concentração de CO_2 no *headspace* de embalagens, reflete na maior concentração de CO_2 dissolvido nas ostras. A lei de Henry afirma que um nível mais alto de CO_2 no *headspace* contribuiu para uma pressão parcial mais alta, que reflete num maior CO_2 dissolvido nos alimentos (MENDES; GONÇALVES, 2008b; ROTABAKK et al., 2008).

Figura 3.5- Concentração CO_2 absorvida pelas ostras durante o armazenamento em atmosfera MAP_1 e MAP_2 .



Os valores mais elevados de CO_2 absorvido pelas ostras foram obtidos pelo armazenamento em MAP_2 , ao final do armazenamento (15º dia), resultou numa concentração de $108\text{ mg } CO_2\text{ kg}^{-1}$ de produto. Por outro lado, pode-se observar na Figura 3.5 que a MAP_1 , atingiu o equilíbrio logo após 48 horas de armazenamento, sem aumento significativo na

concentração de CO₂ absorvido pelas ostras. Dois fatores caracterizam esse comportamento, a quantidade de CO₂ disponível no *headspace* das embalagens é diferente para as duas MAP, e alcance do equilíbrio pelo sistema, entre o *headspace* da embalagem e o produto.

A maior absorção de CO₂ pelas ostras causou redução na concentração do gás *headspace* das embalagens e, conseqüentemente redução do volume das embalagens MAP₂, causando uma aparência de embalagem à vácuo, conforme apresentado na Figura 3.6. De acordo com Al-Nehlawi (2013), nos alimentos com alto teor de água e gordura, como peixes, carnes e aves, a elevada absorção de CO₂ podem levar ao fenômeno conhecido como “colapso da embalagem”. Por outro lado, a MAP₁ que continha N₂ (80%) na composição, geralmente usado como gás de enchimento, onde não houve colapso de embalagem, a redução no volume da embalagem foi de apenas 9,5%. E, em MAP₂ a redução foi de 54,4% do volume em relação a condição inicial.

Figura 3.6- Embalagens das amostras de ostras no final do período de armazenamento. (a) MAP₂ (100% CO₂) redução do volume (aparência de vácuo) e (b) MAP₁ (80/20 % N₂/CO₂) sem deformação.



Neste trabalho, as ostras cozidas foram submetidas a atmosfera modificada com diferentes concentrações de CO₂, e de duas formas diferentes, modificação da composição gasosa do interior das embalagens com ostras, ou pela solubilização do CO₂ nas ostras antes do envase na embalagem.

No que se refere a atmosfera modificada pelo processo de solubilização de CO₂ nas ostras antes do envase, este resultou em uma concentração média dissolvida nas ostras de $757,54 \pm 1,30$ mg CO₂ kg⁻¹ produto, concentração 6 vezes maior que no acondicionamento sob

atmosfera modificada tradicional (MAP₁ e MAP₂). No processo de SGS, em que as amostras são sujeitas a uma atmosfera com 100% de CO₂ a uma pressão de 2 bar, faz com que se dissolva uma grande quantidade de CO₂ no interior do produto em pouco tempo. Sivertsvik et al. (2004) estudaram a solubilidade e a taxa de absorção de CO₂ em filetes de peixe cru e constataram que a solubilidade do CO₂ aumenta linearmente com o aumento de pressão parcial de CO₂. Estes autores observaram ainda que um filete de peixe exposto a 100% de CO₂ durante 4,6 horas atinge a mesma quantidade de CO₂ dissolvido no seu interior que um filete exposto a 50% de CO₂ durante 3 dias. Neste estudo, a quantidade de gás disponível para solubilizar na amostra durante o processo de SGS era 11 vezes maior que no MAP. Desta maneira foi possível obter uma alta concentração de gás dissolvido nas ostras, em pouco minutos (15 min), e ostras serem envasadas em embalagens com baixo g/p, mas com a mesma ou até maior extensão da vida útil que atmosfera tradicional.

Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos com produtos de pesca, que sugeriram a utilização de uma alta relação volume de gás em relação ao produto (g/p) para aumentar a absorção do CO₂ pelo produto. Soares et al. (2015) em estudo da taxa de absorção do CO₂ por ostras, observaram que a maior relação g/p, menor temperatura e maior pressão mostraram maiores taxas de absorção do CO₂. Rotabakk et al. (2008a), também observaram maior quantidade de CO₂ dissolvido em alabote do atlântico, quando o produto foi exposto as maiores pressão parcial de CO₂.

Além disso, a maior concentração de CO₂ inibiu o crescimento microbiano e prolongou a vida útil de ostras cozidas.

3.3.3 Análises físico-químicas

As ostras apresentaram teor de umidade após tratamento térmico de 78,3%, estando de acordo com os valores encontrados por outros pesquisadores. Cruz-Romero; Kerry; Kelly (2008a) em seu estudo com ostras (*Crassostrea gigas*), encontraram teor de umidade de 77,15%. Ostras provenientes também de Florianópolis, apresentaram valores de 80,65% em estudo realizado por Koop et al. (2019). A diferença do teor de umidade reportados na literatura e nos estudos realizados se devem à variabilidade da amostra, local de cultivo, estações do ano (TRAMONTE; PARISENTI; FACCIN, 2005).

Durante o armazenamento ostras não tiveram mudanças significativas ($p > 0,05$) no teor de umidade. O teor médio de umidade durante o armazenamento foi de $76,8 \pm 1,4\%$ para as

amostras SGS, de $78,6 \pm 1,3\%$ para MAP₁ e de $77 \pm 0,3\%$ para MAP₂. A quantidade de água presente num alimento pode indicar a sua estabilidade, quanto ao crescimento microbiano e atividade enzimática. Além disso, manter elevados conteúdos de água é o que ajuda a manter o frescor deste tipo de produto (TEIXEIRA; BEIRÃO, 1999).

A perda de água por exsudação foi observada em todas as amostras durante o armazenamento. Entretanto, as amostras SGS apresentaram menor perda ($6,8 \pm 0,4\%$), do que as amostras envasadas em atmosfera modificada tradicional MAP₁ ($9,9 \pm 0,5\%$) e MAP₂ ($10,7 \pm 0,7$). As ostras possuem elevado conteúdo de água, além de uma estrutura com grande número de poros formando uma espécie de rede capilar, que permite a retenção de água em toda a estrutura (LIMA et al., 2015). Com a ruptura do musculo adutor e desnaturação de proteínas devido ao tratamento térmico, ocorre a liberação de parte desta água, como pode ser visto na Figura 3.7.

Figura 3.7- Perda de água por exsudação durante refrigeração por 30 min de ostras após tratamento térmico e remoção das conchas.

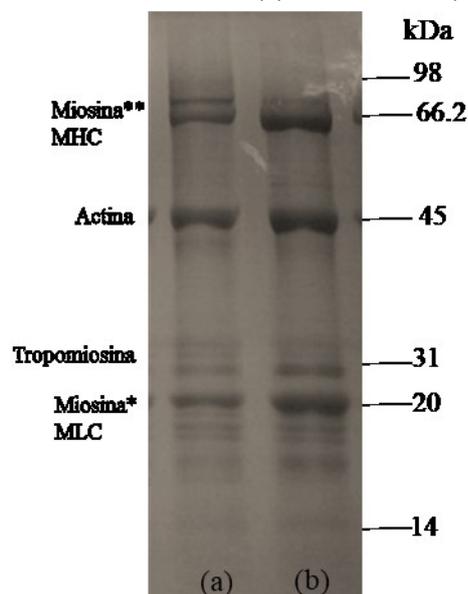


A perda de água em ostras é observada tanto no produto *in natura* e após o processo de cocção, e durante o armazenamento, como pode ser visto na Figura 3.6, apresentada anteriormente. Stormo et al. (2017, 2018) mostraram que após o tratamento térmico ocorre um encolhimento gradual do músculo, aumentando a pressão de vapor, e conseqüentemente a expansão térmica dos fluidos do músculo. Os autores observaram que o filé de bacalhau do atlântico submetido ao tratamento térmico de 90 °C por 18 minutos apresentou maior perda líquida ($20,9 \pm 1,9\%$), do que o grupo controle – sem processamento ($14,8 \pm 3,3\%$).

A Figura 3.8 mostra a imagem do gel de eletroforese das ostras cozidas e *in natura*. Comparando-se as duas colunas, pode-se observar que as amostras exibiram um padrão

complexo de proteínas. O gel mostra bandas na faixa de 20, 30, 45 e 97 kDa, que são relatadas em eletroforese de moluscos (MARTÍNEZ et al., 2017; YADZIR et al., 2015). O tratamento térmico causou alterações, principalmente na região da miosina. O aquecimento pode alterar as proteínas induzindo desnaturação (perda nas interações terciárias e/ou secundárias), formação de novas ligações intramoleculares ou inter-moleculares, agregação e/ou rearranjos das ligações dissulfeto, bem como outras modificações (MONDOULET et al., 2005; YADZIR et al., 2015). As proteínas fragmentadas muitas vezes são menores que o limite de detecção do gel, passando pelos poros do gel de acrilamida e se perder no tampão. Por outro lado, proteínas que tiveram modificações intermolecular (agregação de proteínas) geralmente são grandes demais para migrar através do gel e não são claramente detectáveis por SDS-PAGE, mas podem aparecer acumuladas nas cavidades do gel (MONDOULET et al., 2005; OLIVEIRA; LIMA; BRESSAN, 2013; SHRIVER; YANG, 2011). Isso pode ser observado na Figura 3.8, onde as bandas características de moluscos tiveram modificações.

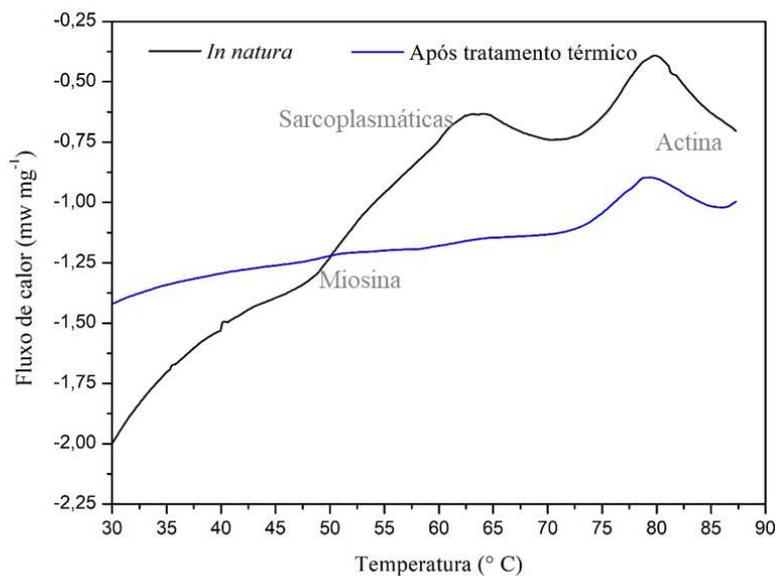
Figura 3.8- Imagem do gel de eletroforese SDS- PAGE para amostras de ostras após tratamento térmico (a) e *in natura* (b).



Esses resultados estão de acordo com as observações realizadas na Figura 3.9. A figura apresenta as alterações causadas pelo tratamento térmico nas amostras de ostras, por análise dos termogramas de calorimetria diferencial de varredura. Na Figura 3.9 podem ser identificadas a presença de 3 picos na amostra crua (*in natura*), o primeiro pico, entre 45 °C e 55 °C, o segundo pico na região de 60 a 70 °C e o terceiro entre 75 e 85 °C. Na amostra após o tratamento térmico

houve mudança, principalmente na região da miosina. De acordo com alguns autores, o primeiro pico (45 °C e 55 °C) representa a desnaturação da miosina, o pico na faixa intermediária entre a miosina e actina (60 e 70 °C), representa a desnaturação de proteína sarcoplasmática ou do estroma (colágeno) e o terceiro pico (75 e 85 °C) corresponde a actina, (PARK; LANIER, 1987, 1989).

Figura 3.9. Termograma de DSC das amostras ostras crua e ostra após tratamento térmico.



Durante o armazenamento a perda de água pode ser vinculada à degradação da estrutura muscular, causada pela combinação das enzimas proteinases endógenas do molusco com a atividade microbiana (LIMA, 2014). Outros autores trazem relações da redução do pH com aumento da exsudação no armazenamento, isso porquê, a redução do pH devido solubilização do CO₂ aproxima as proteínas de seu ponto isoelétrico, quando este for atingido, a água retida no interior do músculo é liberada como exsudado (MCMULLEN; STILES, 1994; SIVERTSVIK, 2007). Masniyom; Benjama; Maneesri (2011), observaram o aumento da exsudação com o aumento do tempo de armazenamento, de mexilhões cozidos armazenados em 100% de CO₂, a mudança do pH dos mexilhões sob atmosfera modificada causou uma desnaturação induzida das proteínas, aumentando a exsudação durante o armazenamento.

As amostras de ostras MAP₂ e SGS, que tiveram a maior concentração de CO₂ dissolvido, apresentaram reduções significativa no pH em relação as amostras após tratamento

térmico. Lima et al. (2015) associaram o aumento da perda de água por exsudação, devido a absorção do CO₂ pelas amostras de mexilhões cozidos, quando armazenados sob atmosfera modificada em relação ao ar. O mesmo foi reportado por Sivertsvik (2007), que avaliou a influência da concentração de CO₂ nas perdas por exsudação em bacalhau armazenado a 0 °C, e observou que conforme aumentava o teor de CO₂ nas embalagens, maior era a perda de exsudado. De acordo com o autor, o aumento na dissolução de CO₂ em concentrações elevadas, pode alterar o pH e capacidade de retenção de água do produto.

Embora diferentes mecanismos possam ser responsáveis por alterações proteicas, parece cabível considerar que desenvolvimento de bactérias (Figura 3.10 e 3.11) tenha contribuído para o aumento da exsudação durante o armazenamento. A degradação da estrutura muscular pode ser causada pela combinação da ação das enzimas endógenas proteínicas com a atividade microbiana (MASNIYOM; BENJAMA; MANEESRI, 2011). O elevado alto teor de glicogênio e os aminoácidos livres nas ostras são favoráveis para o crescimento microbiano (FRANCO; LANDGRAF, 2008), além disso, o carboidrato está basicamente na forma de glicogênio, deste modo, as atividades fermentativas ocorrem como parte da deterioração microbiana (JAY, 2005).

Os valores de pH encontrados para ostras armazenadas em diferentes atmosferas são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Valores de pH de ostras acondicionadas sob atmosfera modificada tradicional e SGS armazenada a 4 °C por 15 dias

Tempo (dias)	pH			
	Controle	SGS	MAP ₁	MAP ₂
0	6,47 ± 0,05 ^{a,A}	6,26 ± 0,05 ^{a,B}	6,47 ± 0,10 ^{a,A}	6,42 ± 0,02 ^{a,A}
5	6,58 ± 0,11 ^a	6,30 ± 0,04 ^{a,b}	6,33 ± 0,23 ^a	5,99 ± 0,13 ^b
10	6,55 ± 0,11 ^a	6,39 ± 0,07 ^b	6,50 ± 0,13 ^a	6,04 ± 0,19 ^b
15	6,68 ± 0,16 ^a	6,33 ± 0,02 ^{a,b}	6,45 ± 0,18 ^a	5,98 ± 0,06 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa na amostra ($p < 0,05$) durante o armazenamento. As letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Legenda MAP₁ (20% CO₂/ 80% N₂), MAP₂ (100% CO₂), SGS (processo de solubilização do CO₂).

O valor de pH médio obtido para as ostras após tratamento térmico foi de 6,47 ± 0,05. O valor está dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 2017) estabelece como limite de pH inferior a 6,85 para carne de moluscos frescos. E, de acordo com os valores observados por outros autores. Cruz-Romero; Kelly; Kerry (2007) encontraram pH de 6,45 para

ostras após tratamento térmico (50 °C 10 min⁻¹). Ramos (2007) encontrou pH médio de 6,1 para ostras provenientes de águas costeiras da Ilha de Santa Catarina.

O processo de solubilização do CO₂ resultou numa redução significativa ($p > 0,05$) no pH das ostras ($6,30 \pm 0,12$), em relação ao pH das ostras após tratamento térmico de $6,47 \pm 0,05$. Durante o armazenamento, as amostras MAP₂ também apresentaram uma redução significativa ($p > 0,05$) nos valores de pH quando comparado o pH inicial. Uma consequência da absorção do CO₂ pelas ostras, pois uma certa quantidade de CO₂ é dissolvida no produto, levando à produção de ácido carbônico e, conseqüentemente redução do pH (SIVERTSVIK; JEKSRUD; ROSNES, 2002). Observações semelhantes foram realizadas para filés de peixe submetido ao processo de solubilização de CO₂, o pH após o processo foi de 5,95, menor que o pH inicial (6,10) (MENDES; GONÇALVES, 2008a). A redução do pH durante o armazenamento foi relatado por Caglak; Cakli; Kilinc (2008), que obtiveram o valor inicial de pH de 6,72 para mexilhões embalados sob atmosfera modificada e, após 12 dias de armazenamento a 2 °C, o valor diminuiu para 5,99. A acidificação do meio devido formação de ácido carbônico advindo dióxido de carbono, é desejável pois tornar o ambiente menos favorável ao crescimento microbológico (ROTABAKK et al., 2008). Quando o CO₂ é absorvido pela fase aquosa do alimento, formando ácido carbônico, que age alterando funções da célula, entre elas a manutenção do pH intracelular (WOLFE, 1980).

Um aumento gradual no pH das amostras controle foi visível a partir do 5º dia de armazenamento refrigerado, e os valores mais altos ($6,68 \pm 0,16$) foram atingidos no período final do armazenamento. O aumento dos valores de pH durante o armazenamento é geralmente uma função da produção de compostos básicos (amônia, trimetilamina, aminas biogênicas) pelas bactérias deterioradoras dos peixes (MASNIYOM; BENJAKUL; VISESSANGUAN, 2002).

3.3.3.2 *Análise microbiológica das ostras no armazenamento*

Os resultados das análises microbiológicas de contagem total de mesófilos e psicotróficos é apresentada na Figura 3.10 e Figura 3.11, respectivamente.

Figura 3.10- Contagem total de mesófilos em ostras cozidas durante o armazenamento refrigerado 4 °C.

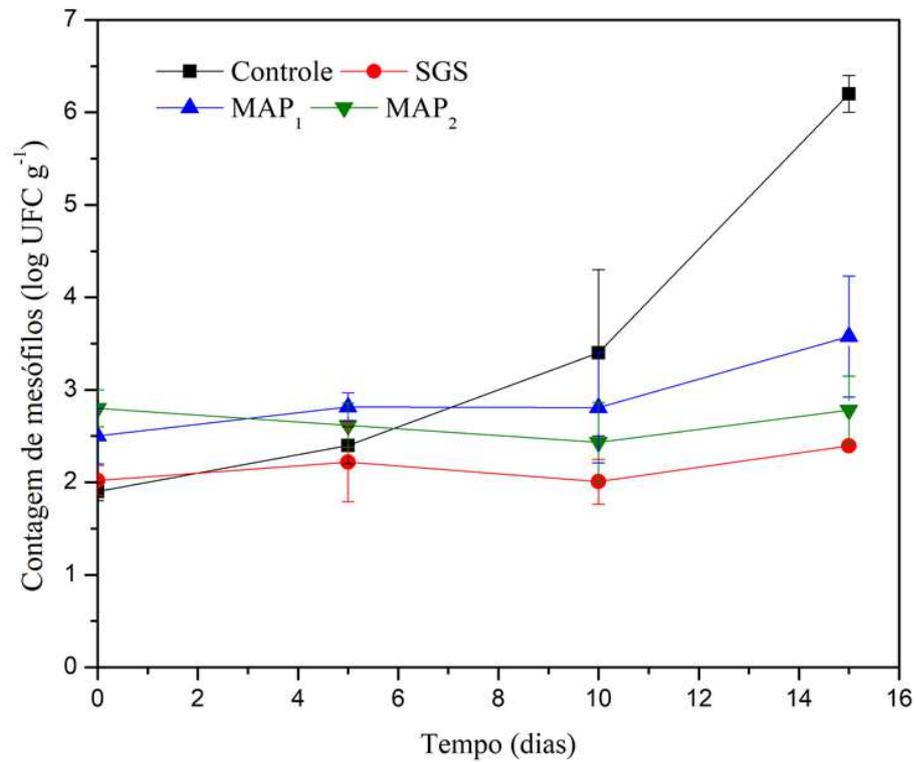
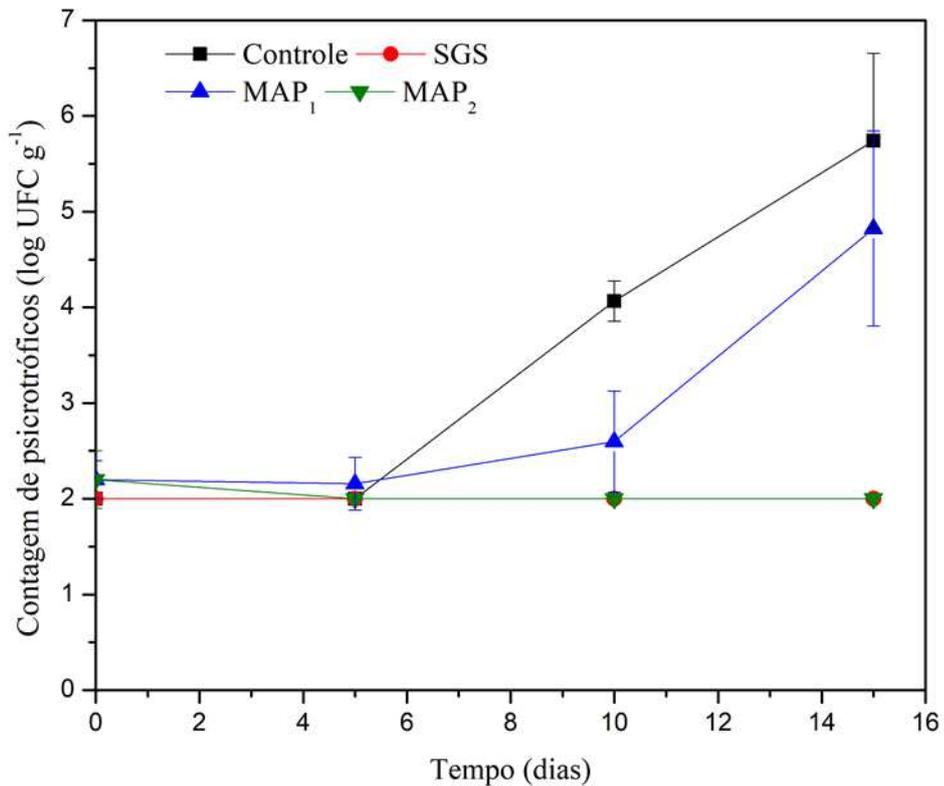


Figura 3.11- Contagem total de psicrotróficos em ostras cozidas durante o armazenamento refrigerado 4 °C



A contagem total de mesófilos inicial das ostras foi em média $2,3 \pm 0,4 \log \text{ UFC g}^{-1}$. E a contagem total de psicotróficos inicial de $2,1 \pm 0,1 \log \text{ UFC g}^{-1}$. Durante o armazenamento, para contagem total de mesófilos (Figura 3.10) foi observado um aumento crescente destes micro-organismos, sendo mais expressivo ao 10º dia de estocagem, e nas amostras controle e MAP₁. Enquanto, a amostra controle atingiu contagens $6,2 \pm 0,2 \log \text{ UFC g}^{-1}$, e MAP₁ de $3,6 \pm 0,7 \log \text{ UFC g}^{-1}$ aos 15 dias de estocagem, as amostras armazenadas em atmosferas MAP₂ e SGS, apresentaram contagens estáveis de 2,4 e 2,8 $\log \text{ UFC g}^{-1}$, respectivamente.

Mas a diferença mais pronunciada, aconteceu para contagem total de psicotróficos (Figura 3.11). Enquanto, MAP₂ e SGS mostraram inibição no crescimento de psicotróficos no decorrer da estocagem, a atmosfera MAP₁ apenas retardou a fase *lag* de crescimento até o 10º dia de estocagem ($2,6 \log \text{ UFC g}^{-1}$) em relação a amostra controle (10 dias: $4,1 \log \text{ UFC g}^{-1}$). Esses resultados ainda corroboram com os apresentados previamente da amostra controle, em relação a redução nos níveis de O₂ de 19,9% para $10,4 \pm 1,7\%$ até o 15º dia de armazenamento, indicando a atividade de bactérias deteriorantes (GRAM; DALGAARD, 2002).

Neste caso, a elevada quantidade de CO₂ dissolvida nas ostras pelo tratamento SGS e em MAP₂ retardou o crescimento microbiano de mesófilos e psicotróficos, comparando com os outros tratamentos, MAP₁ e controle. Ou seja, o efeito bacteriostático do CO₂ é dependente da concentração de CO₂ dissolvido no produto, e está diretamente ligado a composição gasosa escolhida, ou processo de atmosfera. O retardo da fase *lag*, ocorre devido à solubilização do CO₂ na fase aquosa e lipídica presente nas amostras, que tende a criar condições levemente ácidas, e da sua capacidade de penetrar nas bactérias causando alterações no pH intracelular, afetando a atividade enzimática e o transporte de substratos nas células dos micro-organismos (HUSS, 1997b; WOLFE, 1980).

Na literatura são encontrados estudos sobre o uso de atmosfera modificada para frutos mar e peixes, no entanto, os resultados apresentam o efeito da composição gasosa inicial ao qual os produtos são embalados, e não a quantidade de CO₂ dissolvida no produto. Chen et al. (2017) testaram 3 atmosferas modificada, a (50% CO₂/ 50% N₂), b (70% CO₂/ 30% O₂) e c (50% CO₂/ 50% O₂) para ostras (*Crassostrea plicatula*) armazenada a 4 °C por 16 dias, e a atmosfera com maior concentração de CO₂, 70% foi mais adequada na inibição de microrganismos mesófilos. Em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) armazenados a 4 °C por 15 dias, a atmosfera modificada (80% CO₂/ 20% N₂) foi mais eficaz para inibição o crescimento de bactérias gram-negativas aeróbicas, como *Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp., em relação

a atmosferas com menores concentrações de CO₂ (50% CO₂/ 50% N₂ e 40% CO₂/ 30% N₂/ 30% O₂) (GOULAS et al., 2005). Assim, esse estudo traz novas orientação em relação ao efeito bacteriostático do CO₂, e da influência da concentração deste gás dissolvido.

3.4 CONCLUSÃO

As ostras possuem uma elevada carga microbiana natural devido ao seu processo de criação, o uso do tratamento térmico é um dos métodos mais comuns usados para redução desta carga microbiana inicial. A aplicação do tratamento térmico à 100 °C por 15 min, além de facilitar a abertura das conchas das ostras, foi eficiente na redução da microbiota inicial das ostras. Porém, esse processo sozinho não foi capaz de prolongar a vida útil das ostras armazenadas em refrigeração, com aumento na contagem total de mesófilos e psicrotróficos logo após 5 dias de armazenamento.

O uso de embalagens com atmosfera modificada foi uma alternativa de aumentar a vida útil de ostras cozidas, em relação a inibição do desenvolvimento microbiano. Tanto o processo de ingestão da atmosfera diretamente na embalagem, quanto o processo de solubilização de CO₂ antes da embalagem foram eficientes na inibição de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos. Entretanto, a ingestão da atmosfera diretamente na embalagem com baixa concentração de CO₂ (MAP₁), contendo 80% N₂ e 20% de CO₂ de composição gasosa inicial, resultou em uma concentração do gás dissolvido no produto mais baixa (18 mg CO₂. kg de produto⁻¹), em relação as outras atmosferas. E, teve um menor efeito na inibição crescimento de mesófilos e psicrotróficos.

Por outro lado, quando concentrações elevadas de CO₂ (MAP₂) foram adicionadas as embalagens, resultou em uma alta concentração de CO₂ dissolvido no produto (108 mg CO₂. kg de produto⁻¹), que manteve praticamente constante as contagens de mesófilos e psicrotróficos durante o armazenamento. No entanto, quando altas concentrações de CO₂ são usadas em alimentos com elevado teor de umidade, ocorre uma absorção excessiva do CO₂ do *headspace* pelo alimento, e acarreta no encolhimento da embalagem, resultando em uma aparência de embalagem à vácuo, efeito que pode ser evitado pela adição de N₂ no interior da embalagem, por exemplo. Comparando MAP₁ e MAP₂, os resultados mostraram que o efeito bacteriostático do CO₂ foi proporcional a quantidade de CO₂, dissolvida no produto.

Uma outra forma de obter maiores concentrações de CO₂ dissolvida no produto foi pelo processo de solubilização do CO₂ nas ostras antes da embalagem. Além, de ser possível atingir elevada concentração de gás dissolvido (750 mg CO₂. kg de produto⁻¹) em poucos

minutos (15 min), o processo possibilitou o envase sem embalagem sem adição de atmosfera modificada, mas com o efeito bacteriostático mantido.

Os resultados mostraram ainda, que grande parte da exsudação das ostras ocorre devido as alterações causadas pelo tratamento térmico, e ruptura do musculo adutor. Enquanto, durante o armazenamento a exsudação das amostras pode estar relacionada a outros fatores como: degradação muscular, causada pela ação de enzimas proteinases endógenas do molusco com a atividade microbiana, e a redução do pH causada pela absorção do CO₂, por aproximar as proteínas de seu ponto isoelétrico, liberando a água retida no interior do músculo.

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor de moluscos do país, e apresenta grande potencial de desenvolvimento nesta área ainda. Entre eles, o desenvolvimento de novos processos para esses produtos. O acondicionamento das ostras cozidas em atmosfera modificada e armazenamento sob refrigeração mostrou ser uma alternativa para estender a vida útil de ostras, favorecendo a comercialização deste produto.

CAPÍTULO 4 . APLICAÇÃO DO TRATAMENTO DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA PARA INATIVAÇÃO DE *VIBRIOS* SPP EM OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*)

Resumo

O objetivo do estudo foi aplicar a técnica de inativação fotodinâmica para inativação de *Vibrio* spp. em ostras usando micropartículas de curcumina (MC) como fotossensibilizador e luz UV-A. Na primeira etapa do trabalho foi aplicada a técnica de precipitação antissolvente para redução do tamanho das partículas de curcumina, onde foi possível obter partículas de tamanho micro com cerca de 0,4 μm . As micropartículas de curcumina não apresentaram mudanças na estrutura química e na atividade antioxidante em relação a curcumina não tratada. Na segunda etapa, as micropartículas obtidas foram aplicadas em processos de inativação fotodinâmica. A foto exposição combinando a curcumina e as micropartículas com a luz UV-A, foi aplicada para ostras. Foram usadas soluções de micropartículas de curcumina e curcumina não tratada a 10, 20 e 40 μM e diferentes tempos de exposição luz UV-A, para verificar a eficiência as micropartículas no processo de inativação fotodinâmica em alimentos com alto teor de umidade. A irradiância emitidas pelas lâmpadas UV-A foi de 7,71 mW cm^{-2} , e o tempo de 5 minutos de exposição a luz UV-A, resultou em uma dose 2,3 J cm^{-2} . A exposição da solução contendo micropartículas de curcumina (concentração de 40 μM) a luz UV-A por este tempo, proporcionou redução na contagem de *Vibrios* em ostras a níveis não detectáveis. Embora, a curcumina não tratada mostrou efeitos de inativação, estes foram limitados quando aplicado o processo para ostras inteiras e desconchadas. As ostras são consumidas cruas ou levemente cozidas, e o desenvolvimento de tecnologias para este tipo de produto torna-se relevante, principalmente, em regiões onde há excelentes condições geográficas para o cultivo desses organismos.

Palavras-chaves: Curcumina, fotossensibilizador, precipitação antissolvente, foto exposição.

4.1 INTRODUÇÃO

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dien 3,5 diona) é um composto de polifenol, obtido a partir de *Curcuma long* L., uma planta herbácea tuberosa, membro da a família do gengibre e cresce em um clima tropical (KOCAADAM; ŞANLIER,

2017). Embora usado como tempero, é um corante alimentar importante, que lhe confere a cor amarela, e reconhecido como seguro (GRAS) pelo FDA (US FDA, 2013). O Brasil classifica e autoriza o uso da curcumina como corante, com recomendação de limite de Ingestão diária aceitável (IDA) de 0-3 mg/kg de peso corpóreo (BRASIL, 2018). Vários estudos, descrevem esse composto natural como agente anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano capaz de induzir apoptose em vários sistemas celulares, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Trichophyton* tipos de *gipseum* (ADAHOUN et al., 2017; KOCAADAM; ŞANLIER, 2017).

Durante o uso da curcumina como antimicrobiano natural, verificou-se que quando realizado sob uma fonte de luz, poderia causar danos e lesões às células microbianas, e que quando a radiação UV-A e o corante são usados separadamente produzem efeitos limitados (LUKSIENĖ; ZUKAUSKAS, 2009). A interação fotoquímica entre o fotossensibilizador (FS) não tóxico: curcumina e a luz visível em um comprimento de onda apropriado, é conhecida como fotossensibilização. Essa interação na presença de oxigênio gera substâncias citotóxicas, causando danos às células microbianas (AL-ASMARI; MEREDDY; SULTANBAWA, 2018). Surgindo a possibilidade de utilização desta tecnologia para inativar micro-organismos e descontaminar alimentos.

Esta nova abordagem para a inativação de micro-organismos patogênicos, mostrou ser eficaz *in vitro* contra bactérias resistentes, leveduras, vírus e parasitas, como *S. aureus* (JIANG et al., 2014), *Vibrio parahaemolyticus* (WU et al., 2016) , Norovírus (WU et al., 2015), *Salmonella* e *Pseudomonas* (PENHA et al., 2017), *E. coli* (AURUM; NGUYEN, 2019; DE OLIVEIRA; TIKEKAR; NITIN, 2018; TAO et al., 2019), *Aspergillus flavus* (AL-ASMARI; MEREDDY; SULTANBAWA, 2018).

Na inativação fotodinâmica, a luz visível no comprimento de onda apropriado é usada para excitar a molécula de FS para produzir radicais (reação tipo 1) ou gerar oxigênio singlete (reação tipo 2). Ambos podem levar à destruição de células bacterianas, rompendo a parede celular e, conseqüentemente, vazamento de citoplasma, além de danificar proteínas e DNA intracelulares (BINBIN et al., 2016; LIU et al., 2016; WU et al., 2015, 2016). Apesar desses avanços, a aplicação da curcumina é dificultada devido à baixa solubilidade e biodisponibilidade (GLUECK et al., 2017; KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). A atividade antimicrobiana de micropartículas de curcumina foi melhorada em um estudo *in vitro*

contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, em comparação com a curcumina nativa (PANDIT et al., 2015; SILVA et al., 2017).

As ostras ocupam o quarto lugar no *Top Ten list* dos alimentos relacionado a doenças alimentares, publicado pelo FDA, sendo responsáveis por quase 3.409 doenças relatadas (FDA, 2009), devido ao consumo de ostras cruas. O objetivo deste capítulo foi estudar a influência das micropartículas de curcumina produzidas por precipitação antissolvente no tratamento de inativação fotodinâmica para ostras cruas desconchadas, a partir da microbiota natural.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

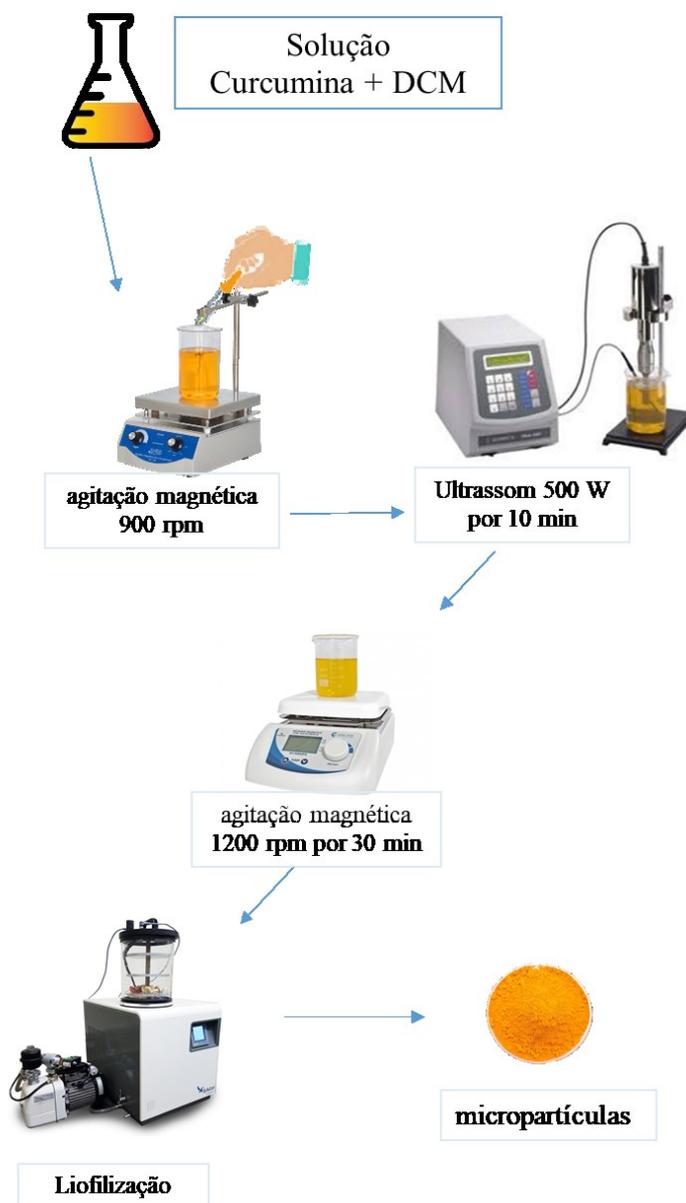
4.2.1 Materiais

Curcumina (96,5%), etanol (99,9%) e metanol (99,9%) foram adquiridos da Neon (Suzano, Brasil). O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o diclorometano (DCM 99,5%) foram adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2.2 Preparação e caracterização das micropartículas de curcumina

As micropartículas de curcumina foram preparadas usando o método de precipitação antissolvente, de acordo com Bhawana et al. (2011) e Silva et al. (2019) com modificações, conforme apresentado na Figura 4.1.

Figura 4.1. Esquema representativo da preparação das micropartículas de curcumina



Inicialmente, foi preparada uma solução com 100 mg de curcumina e 20 ml de DCM. Posteriormente, 1 ml da solução (curcumina + DCM) foi adicionado lentamente em 50 ml de água fervente, sob agitação magnética à 900 rpm. Em seguida, a solução obtida foi homogeneizada com uma sonda de ultrassom (Ultronique, Model QR 500, Eco-Sonics, Brasil), a 500 W por 10 min. Após, a solução permaneceu sob agitação mecânica à 1200 rpm por 30 min, até obter uma solução totalmente homogênea. As micropartículas foram obtidas após liofilização por 48 horas (LIOBRAS, série LIOTOP-L101, Brasil).

4.2.2.1 Caracterização da partícula

O tamanho médio das partículas da curcumina foram determinadas utilizando um analisador Zetasizer Nano – ZS (Malvern Instruments, UK).

Para morfologia das partículas, as microscopias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca JEOL, modelo JSM-6390LV. As amostras foram fixadas em fita de carbono, na superfície de stubs metálicos. Após fixadas as amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro, para posterior visualização. A voltagem de aceleração utilizada foi de 10 kV.

4.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho (FTIR) foi realizada em um espectrômetro (AGILENT TECHNOLOGIES – Cary 600 Series FTIR Spectrometer), e as partículas de curcumina foram caracterizadas no modo de transmissão com o número de onda variando de 4000 a 400 cm^{-1} . A fim de verificar possíveis degradações na amostra após o processo de precipitação antissolvente, comparou-se os espectros da curcumina após processo em relação à curcumina não tratada (padrão).

4.2.2.4 Propriedades térmicas

O ponto de fusão da curcumina foi determinado usando um sistema de calorimetria diferencial de varredura (Jade-DSC, Perkin Elmer, USA) e com auxílio do software Pyris *Data Analysis*. Uma capsula de alumínio vazia foi usada como referência e o mesmo tipo de capsula foi usado como porta amostras no calorímetro. As amostras (5 mg a 10 mg) foram hermeticamente seladas e depois aquecidas a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 30 $^{\circ}\text{C}$ a 300 $^{\circ}\text{C}$, sob uma vazão de nitrogênio de 10 ml min^{-1} .

4.2.2.5 Difração de raio-X (DR-X)

A análise de DR-X foi realizada a fim de caracterizar o composto quanto ao grau de cristalinidade. Os dados de difração de raio X foram obtidos em difratômetro MiniFlex600

DRX (Rigaku, Japão), equipado com uma fonte de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e operando a 30 kV e 10 mA, numa gama de 5 e 50 graus de 2θ e 0,5 s contando o tempo de cada etapa.

4.2.2.6 Solvente Residual

Para garantir que as micropartículas de curcumina fossem de grau alimentar, foi realizada análise para verificação da concentração de solvente residual usando um cromatógrafo a gás, equipado com detector por ionização de chama (FID) (Agilent 7890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA), e acoplado a um detector de espectro de massa (5975C, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB624 (comprimento de 30 m x 0,45 mm I.D. x 2,55 μm de espessura de filme) operando com hélio como gás de arraste à uma taxa de fluxo de 1,0 ml min^{-1} . A temperatura do injetor foi 160 °C e o programa de temperatura era o seguinte: o forno foi inicialmente ajustado em 35 °C (espera 20 min), depois aquecido até 250 °C à 25 °C min^{-1} , seguido de aquecimento até 250 °C por 15 min. O solvente residual foi identificado por espectrometria de massas, usando temperatura da interface a 260 °C, tensão de ionização a 70 eV, faixa de massa de 2-550 m/z e modo de varredura. Para a quantificação do solvente residual foi utilizado o detector FID e o método de calibração externa (ALBERT E. GUDAT; ROGER L. FIROR; UTE BOBER, 2007).

4.2.2.7 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH, proposto por Mensor et al. (2001). O DPPH (0,03 mM em metanol) foi incubado (no escuro) com 2,0 ml da solução de curcumina não tratada e de micropartículas em temperatura ambiente. Após 30 min de incubação, a absorbância foi lida a 518 nm usando um espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japan), e a porcentagem de inibição das amostras foi calculada usando a equação 7:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}} \right\} \quad (7)$$

Metanol (1,0 ml) mais solução de curcumina (2,5 ml) foi usado como um branco. Solução de DPPH (1 ml, 0,3 mM) com adição de metanol (2,5 ml) foi usada como controle negativo.

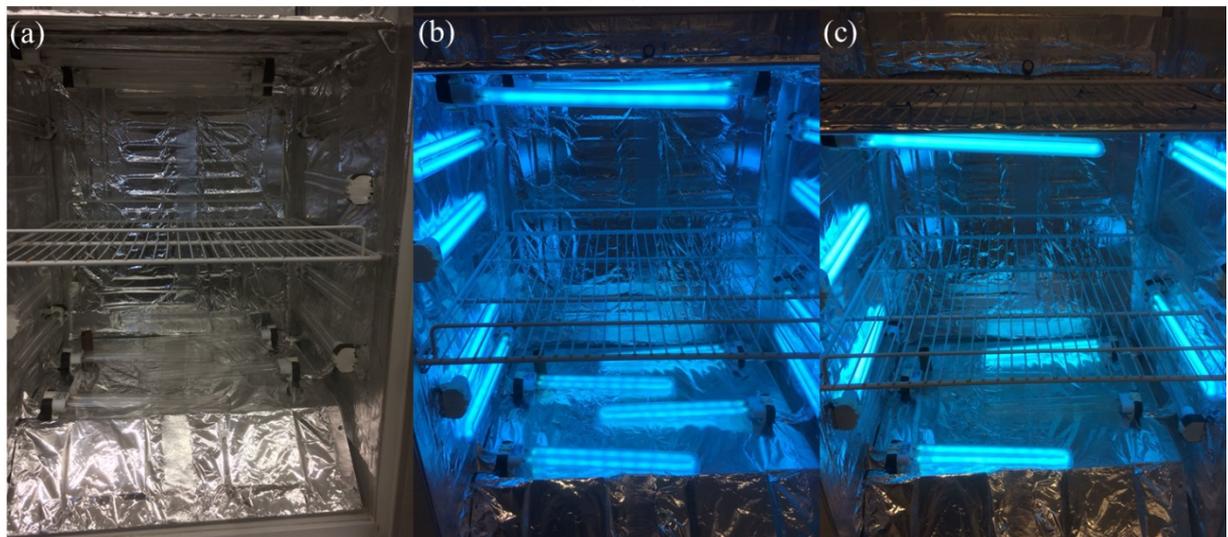
4.2.2.8 Análises dos espectros de absorção da luz visível

Os espectros de absorção das soluções de curcumina (40 μ M) foram avaliados por espectrofotômetro de UV-Vis (UV-1800, Shimadzu, Japan), na faixa de comprimentos de onda de 300-600 nm.

4.2.3 Câmara UV-A

Para os experimentos de inativação fotodinâmica, um aparato experimental foi montado no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (PROFI - UFSC) durante a execução deste trabalho. Em uma estufa incubadora tipo BOD (Dist, Florianópolis, Brasil), com sistema de refrigeração foi delimitado um espaço de 48 cm x 57 cm, e as paredes internas revestidas com folhas de papel alumínio. No espaço interno da câmara foi realizada a instalação de conexões elétricas que permitem a ligação de até 16 lâmpadas de 24 W, simultaneamente, ou um grupo delas, conforme Figura 4.2.

Figura 4.2. Visão geral da câmara de radiação UV. (a) Lâmpada UV desligadas. (b) Todas as lâmpadas ligadas. (c) Um grupo parcial de lâmpadas ligadas.



Para este trabalho, o espaço da câmara foi reduzido, e foram consideradas apenas oito lâmpadas UV-A (320–400 nm; DUL L BL UVA 24 W; Osram), dispostas nas laterais e topo da câmara. Duas lâmpadas em cada uma das laterais e quatro lâmpadas do topo, de acordo com a Figura 4.3.

Figura 4.3. Câmara de radiação UV-A.



A delimitação deste espaço resultou de alguns testes preliminares, a partir da determinação da irradiância e posição da amostra. A irradiância emitida pelas lâmpadas foi determinada em todos os quadrantes da base da câmara, e a várias distâncias da lâmpada.

A irradiância foi medida usando um radiômetro (Solar Light's Model PMA2100), o qual foi posicionado nos diferentes quadrantes do interior da câmara, simulando a posição das amostras. Como o sistema e as lâmpadas utilizadas possuem potência constante, a variação da dose de energia foi realizada pela variação do tempo de exposição das amostras.

Assim, a dose de energia acumulada pelas amostras foi calculada pela equação 8 (MACLEAN et al., 2009):

$$E = P \times t \quad (8)$$

Em que, E é a dose de energia ($J \text{ cm}^{-2}$), P é a irradiância ($W \text{ cm}^{-2}$) e t é o tempo (s).

A distância entre a amostra e as lâmpadas superiores foi determinada após alguns testes de irradiância, onde foi verificado que a distância de 10 cm, possuía um espectro de absorção favorável ao processo em questão.

A irradiância almejada para os experimentos foi baseada em valores de dose de energia encontrados na literatura, aplicados para ostras. Densidade de energia de 3,6 a 5,4 J. cm⁻², emitidas por lâmpadas Blue Led, mostram efeitos com ostras. Wu et al. (2015) testou 3,6 para Norovirus (MNV-1) e Liu et al. (2016) testou 5,4 para contagem total. Além destes estudos, De Oliveira; Tikekar; Nitin (2018) e Tosati et al., (2018) testou lâmpadas UV-A para descontaminação de alimentos com dose de 2,4 J cm⁻².

Para monitorar a temperatura da câmara e da amostra durante o processo de fotoativação, em que as lâmpadas permaneciam ligadas, termopares tipo T (marca IOPE, modelo TX-TF-TF-R-32AWG, Brasil) foram conectados a um sistema de aquisição de dados (34970A; Agilent, Santa Clara, CA, EUA) conectado a um computador via software (BENCHLINK DATA LOGGER 3.0; Agilent), e realizado o registro de temperatura durante todo o período de teste.

O espectro de emissão da lâmpada UV-A foi determinado usando uma fibra tipo P50-2-UV/VIS (Ocean Optics, Dunedin, FL, EUA) com um espectrofotômetro USB 4000.

4.2.4 Ensaios de fotoativação para determinação da concentração de curcumina

Soluções de Curcumina

Soluções estoques de micropartículas de curcumina (MC) e curcumina não tratada (nativa) (C) (20 mM) foram preparadas em etanol (99% v/v), e armazenadas protegidas da luz a -18 °C, até o uso. Antes de cada experimento, as soluções foram preparadas diluindo a solução estoque de curcumina com água estéril até uma concentração final de 40 µM, 20 µM e 10 µM. A concentração de etanol na solução final de curcumina diluída foi <1% (v/v). As concentrações de curcumina utilizadas neste estudo foram baseadas em (REFERENCIA).

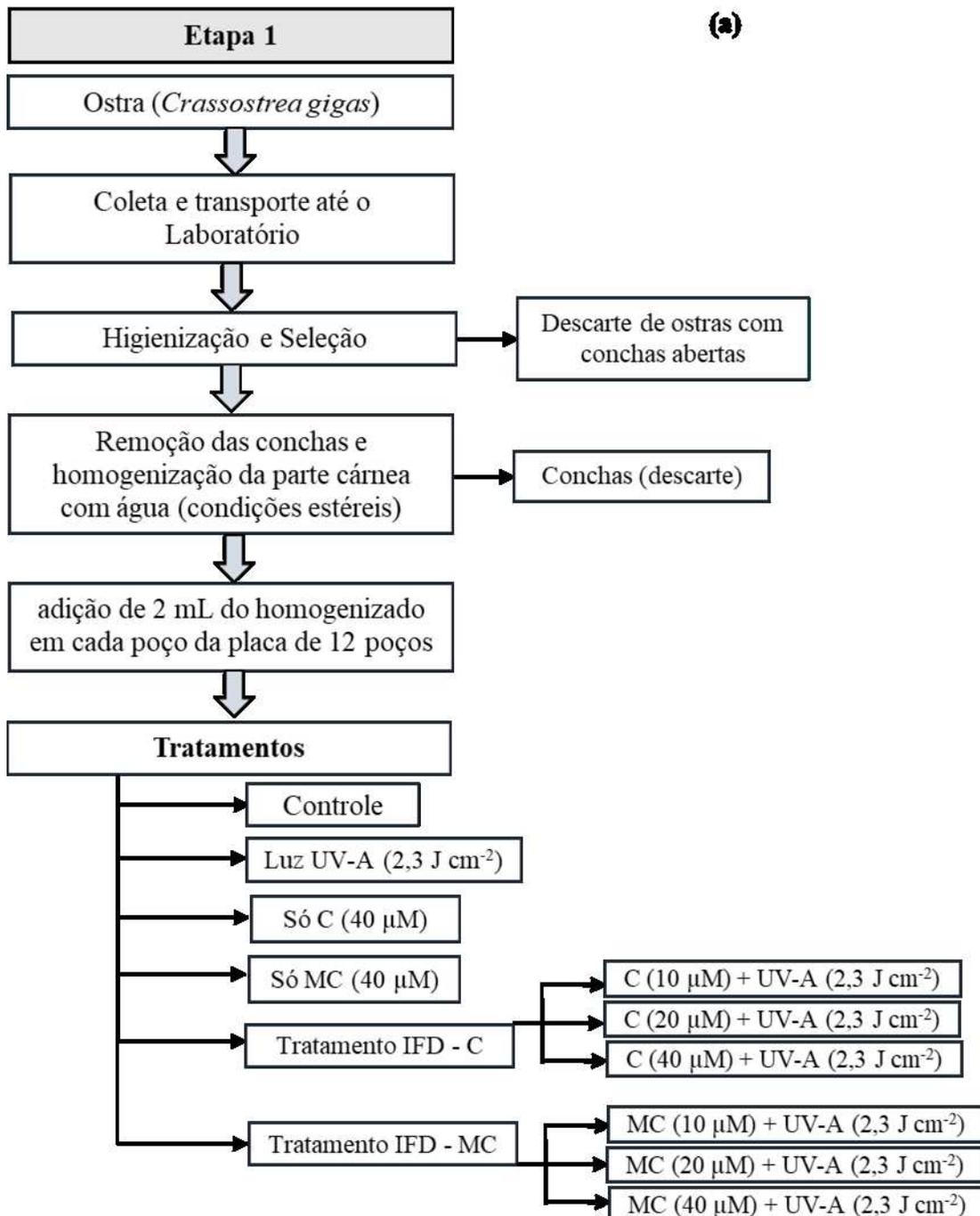
Amostras utilizadas

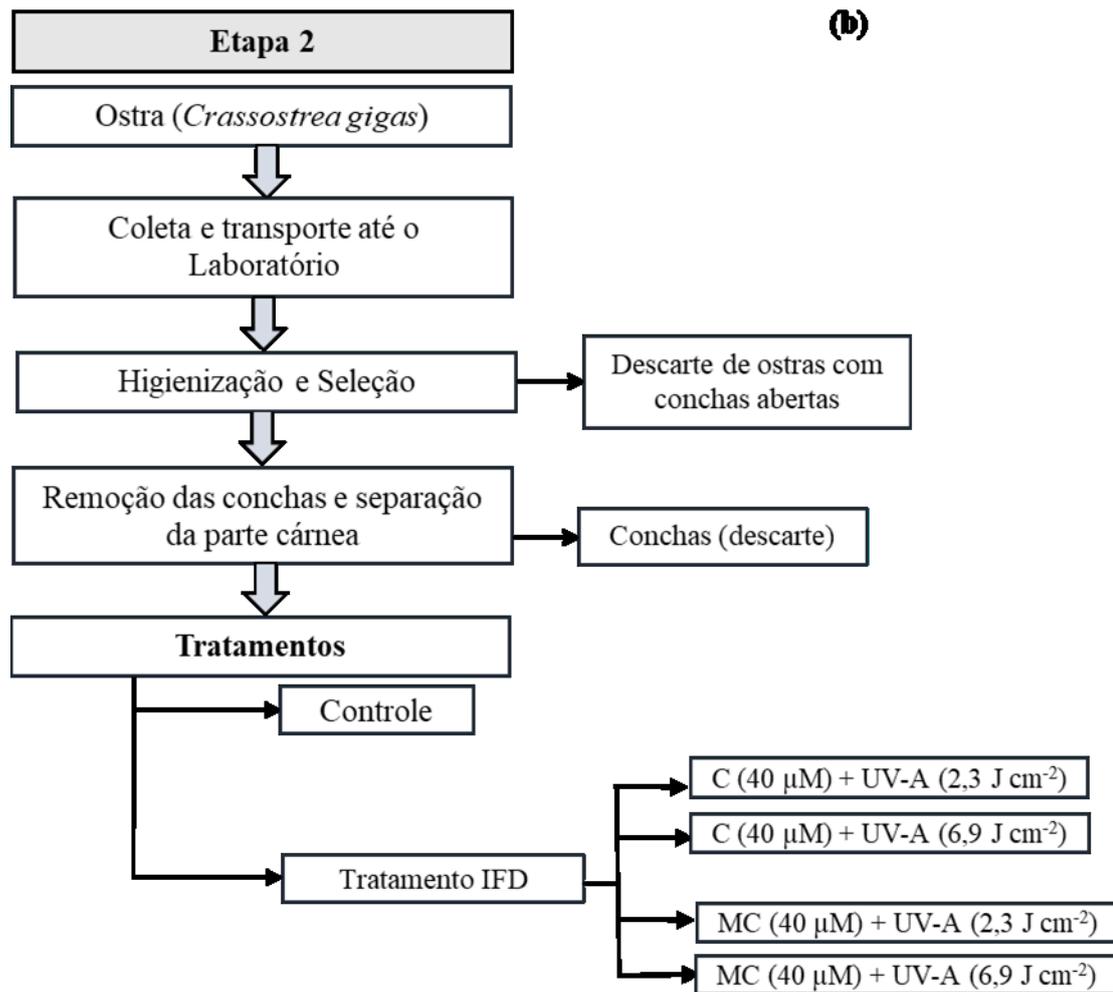
As ostras frescas (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis, foram obtidas em um mercado local, entre os meses de janeiro a agosto de 2019. As amostras foram transportadas até o Laboratório PROFI, em caixas isotérmicas.

Ao chegar no laboratório, as ostras foram lavadas em água corrente para remoção de qualquer sujidade, e realizada a seleção, ostras com a concha aberta eram descartadas. Após a

limpeza e seleção, as ostras foram desconchadas manualmente em condições estéreis, com faca apropriada para abertura de ostras, e a parte cárnea das ostras eram colocadas em béquer, conforme Figura 4.4 (a) Etapa 1 e 4.4 (b) Etapa 2.

Figura 4.4. Fluxograma das principais fases do procedimento experimental adotado.





Legenda: Controle- sem curcumina e sem luz UV-A; IFD- inativação fotodinâmica; MC- Micropartículas de curcumina; C- Curcumina não tratada

Condições experimentais

Primeira Etapa

Para os experimentos iniciais, Figura 4.4 (a), a parte cárnea da ostra era fragmentada e homogeneizada com água, formando uma solução (1:10 p/p) de ostra + água. Desta solução foram adicionados 2 mL em cada poço de uma placa de poços. Para cada condição avaliada, eram considerados 3 poços da placa, constituindo amostras em triplicata. E então, foi transferido a cada poço a solução de curcumina. Anteriormente, foram preparadas soluções de curcumina, a partir da diluição da solução estoque e padronizou-se as concentrações para que o volume adicionado em cada poço fosse igual para qualquer concentração de curcumina a ser testada. Para amostras controle, sem curcumina, era adicionado o mesmo volume, mas de água. Após a adição das soluções a serem testadas, a placa era levada a câmara UV-A.

Inicialmente foram testadas as diferentes concentrações de curcumina, 10, 20 e 40 μM , tanto para curcumina nativa (sem tratamento), quanto para as micropartículas de curcumina obtidos na etapa anterior. Também foram testados controles.

Para as amostras controle foram consideradas as seguintes situações: Controle (sem curcumina, sem luz), só curcumina (solução com curcumina, sem luz), só luz (solução sem curcumina, exposição a luz UV-A). As soluções controle sem curcumina, a solução de curcumina foi substituída por água.

Diferentes controles foram testados afim de verificar a influência de cada um individualmente. O controle só curcumina, com o intuito de avaliar o efeito da curcumina na inativação de micro-organismos. O controle só luz, com o intuito de verificar os possíveis efeitos da luz UV-A na inativação de micro-organismos. O controle, sem luz e sem curcumina, foi utilizado como um controle positivo para verificar o crescimento microbiano, e a confiabilidade do estudo.

Para melhor compreensão, as condições avaliadas no tratamento de inativação fotodinâmica são apresentadas na Tabela 4.1

Tabela 4.1. Condições dos tratamentos de inativação fotodinâmica da primeira etapa.

Tratamento	Micropartículas de Curcumina	Curcumina não tratada	Luz UV-A (dose de energia)
Controle	-	-	-
Luz UV-A	-	-	2,3 J cm^{-2}
MC	40 μM	-	-
C	40 μM	-	-
MC + UV-A	40 μM , 20 μM e 10 μM	-	2,3 J cm^{-2}
C + UV-A	-	40 μM , 20 μM e 10 μM	2,3 J cm^{-2}

Legenda: MC: micropartículas de curcumina; C: curcumina não tratada; MC+ UV-A: inativação fotodinâmica com micropartículas de curcumina; C+ UV-A: inativação fotodinâmica com curcumina não tratada; - não aplicado.

Segunda Etapa

Na segunda etapa, Figura 4.4 (b), a inativação fotodinâmica foi testada para ostras inteiras e desconchada. A parte cárnea da ostra foi adicionada em béquer de 250 mL, que continha a solução a ser testada (curcumina, micropartículas de curcumina). Foram utilizadas 50 gramas de ostras para 100 mL de solução, a proporção de solução e ostra foi determinada

após testes preliminares. O béquer contendo ostra e a solução foi deixado em repouso em ambiente escuro, por 30 minutos, esse tempo foi definido após testes preliminares, que partiram de dados da literatura variando de 5 a 30 minutos de incubação (DE OLIVEIRA et al., 2018; TAO et al., 2019) . Após esse período, o béquer foi levado a câmara de exposição, durante a exposição a luz UV-A, o béquer permaneceu sob agitação magnética.

Este procedimento repetiu-se para as duas partículas de curcumina testadas (curcumina não tratada e micropartículas de curcumina), na concentração definida pela etapa anterior 40 μM , e para amostras controle. E com dois tempos de exposição a luz UV-A, que correspondiam a duas doses de energia diferente, 2,3 e 6,9 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nos controles sem luz UV-A, as amostras permaneciam no escuro sob agitação magnética, pelo mesmo período que as amostras expostas a luz UV-A. A Tabela 4.2 apresentada as condições testadas.

Tabela 4.2. Condições dos tratamentos de inativação fotodinâmica da segunda etapa.

Tratamento Amostras	Micropartículas de Curcumina	Curcumina não tratada	Luz UV-A (dose de energia)
Controle	-	-	-
MC + UV-A	40 μM	-	2,3 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$
MC+ UV-A	40 μM	-	6,9 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$
C	-	40 μM	2,3 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$
C + UV-A	-	40 μM	6,9 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$

Legenda: MC: micropartículas de curcumina; C: curcumina não tratada; MC+ UV-A: inativação fotodinâmica com micropartículas de curcumina; C+ UV-A: inativação fotodinâmica com curcumina não tratada; - não aplicado.

Avaliação da Inativação Fotodinâmica

Após a aplicação do tratamento de inativação fotodinâmica, na primeira etapa, alíquotas de 1 mL de cada poço da placa foram retiradas, e transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada salina (3% NaCl). Para uma análise qualitativa, os efeitos do tratamento na inativação de vibrios, foram avaliados por semeadura em meio seletivo Ágar tiossulfato-citrato-sais de bile sacarose (Ágar TCBS- Acumedia) estéril. As diluições foram realizadas em água peptonada salina até 10^3 , para posterior plaqueamento em meio TCBS. As placas foram incubadas por 18 – 24 horas, à temperatura de $36 \pm 0,5$ °C, e após foi realizada a identificação de colônias características, conforme recomendação do fabricante do meio. Verificou-se as placas quanto a presença de colônias suspeitas de serem de *V.*

parahaemolyticus, como colônias lisas, opacas e com bordas amarelas finas, além disso, algumas colônias podem ser verdes ou incolores no Ágar TCBS devido a fermentação tardia da sacarose por cepas de *V. cholerae* (ACUMEDIA).

Para a segunda etapa, as ostras eram retiradas das soluções e homogêneas em água peptonada salina (3% NaCl), dando origem a primeira diluição da amostra 1:10 (10^{-1}). Após, a análise procedeu como descrito anteriormente, em relação a primeira etapa.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.3.1 Cinética de inativação fotodinâmica de *Vibrio* spp. naturalmente presentes em ostras

Para avaliar a influência da dose de energia no processo de inativação fotodinâmica, as ostras foram processadas de acordo apresentado na Segunda etapa deste estudo.

Para esta etapa dos experimentos, a solução de micropartículas de curcumina de 40 μM foi utilizada, após o período de incubação de 30 min, as amostras foram expostas a radiação UV-A durante diferentes tempos 0, 1, 3, 4, 5, 8 e 10 minutos, que representam as doses de: 0; 0,5; 1,4; 1,8; 2,3; 3,7; 4, 6 J. cm^{-2} . E, imediatamente após o termino, realizou-se a análise microbiológica para *Vibrio* spp, conforme descrito anteriormente no item 4.2.3.

O modelo de Weibull foi ajustado aos dados experimentais de inativação de *Vibrio* spp. como proposto por De Matos et al. (2018) e Mafart et al. (2002):

$$\log \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\alpha} \right)^\beta \quad (9)$$

Onde $N(t)$ e N_0 são o número de sobreviventes após um tempo de processamento (t) e o número inicial de micro-organismos (UFC ml^{-1}), respectivamente. Os parâmetros do modelo α é denominado como o primeiro tempo de redução decimal, isto é, tempo necessário para reduzir a população inicial, N_0 a $N_0/10$; e β é chamado parâmetro de forma. As curvas de sobrevivência foram ajustadas usando o software Matlab R2018a (MathWorks Inc, Natick, EUA) e o coeficiente de correlação estatístico de parâmetros (R^2) e o erro quadrático médio (MSE) foram utilizados para avaliar o ajuste.

$$\text{MSE} = \sum_{i=1}^n \frac{(\text{predito}_i - \text{observado}_i)^2}{n} \quad (10)$$

Onde n é o número de observações, predito_i são os dados preditos e observado_i são os dados observados - quanto menores os valores de MSE, melhor o modelo se ajusta aos dados.

4.2.3.2 Análise Microbiológica

A contagem de micro-organismos aeróbio mesófilos e psicrotróficos foi realizada na condição de tratamento de inativação fotodinâmica, que apresentou os melhores resultados até esta etapa (solução de micropartículas de curcumina a 40 μM , e dose de energia de 2,3 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$), afim de verificar o efeito do tratamento na contagem de bactérias totais de ostras inteiras e desconchadas. Seguindo protocolo descrito no item: 3.2.6, e apresentado sucintamente abaixo.

Após o tratamento, $25,0 \pm 0,5$ g de ostras foram adicionados em 225 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição 1:10 (10^{-1}) para análises de aeróbios mesófilos totais e psicrotróficos totais. Em seguida, foram realizadas as diluições decimais seriadas. A diluição 10^{-2} foi obtida retirando 1 mL da diluição 10^{-1} e transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada. As demais diluições foram realizadas pelo mesmo procedimento. Os tubos de ensaio com cada diluição foram agitados em agitador de tubos tipo Vortex. Após, 100 μL das diferentes diluições foram semeadas em placas contendo meio PCA (Plate Count Agar) para psicrotróficos. Para mesófilos totais o plaqueamento foi por profundidade. As placas foram incubadas invertidas a 36 ± 1 °C por 48 horas para contagem de total de aeróbios mesofilos e a 7 ± 1 °C por 10 dias para contagem total de psicrotróficos.

4.2.3 Análise estatística

Todos os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), utilizando o software *Statistic* versão 10.0 (Statsoft Inc, USA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

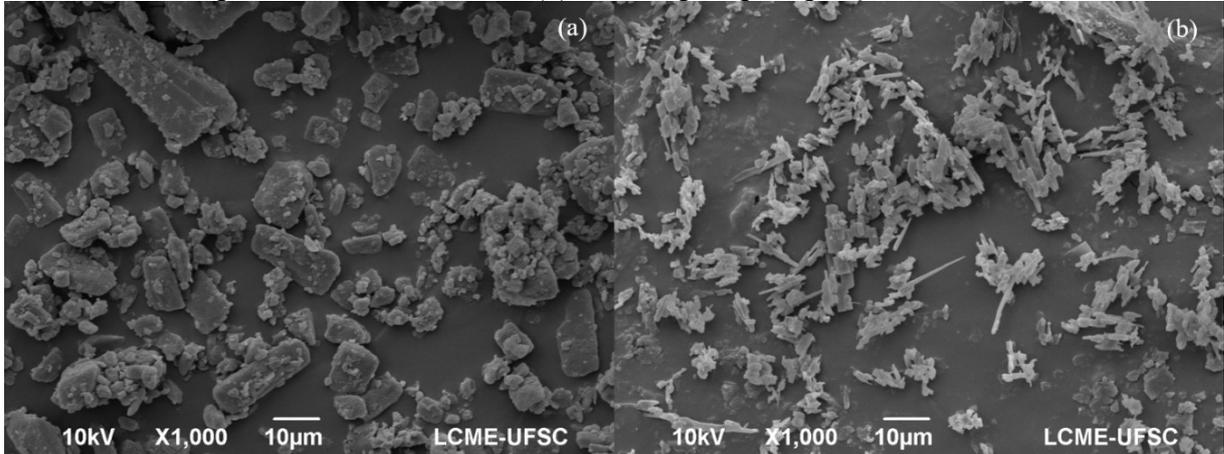
4.3.1 Caracterização das micropartículas de curcumina

A técnica de precipitação antissolvente foi usada para reduzir o tamanho das partículas de curcumina, com o foco de melhorar a solubilidade na fase aquosa e aumentar sua eficiência no processo de inativação fotodinâmica. As partículas obtidas apresentaram tamanho médio de 0,4 μm , 3 vezes menor que o tamanho das partículas sem tratamento 1,3 μm . A técnica mostrou-se favorável do ponto de vista de processo de fabricação, a obtenção das micropartículas de curcumina é simples e ocorre, quando a solução saturada de curcumina é adicionada gota a gota sob agitação constante, formando partículas com redução significativa de tamanho (KARAVAS et al., 2007; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). A obtenção de partículas de curcumina de tamanhos micro e nano pode aumentar a solubilidade aquosa (BHAWANA et al., 2011), e assim poderia facilitar o seu uso em alimentos, com alto teor de água, como as ostras. Outros autores revelam que as partículas de curcumina obtidas após precipitação antissolvente, estavam na faixa de alguns micrômetros (SILVA et al., 2017). Para YEN et al. (2010), os cristais obtidos apresentavam tamanhos de 0,142 μm , a curcumina não tratada 2,4 μm . Desta forma, o processo de precipitação antissolvente, mostrou-se como uma técnica simples e econômica, para obtenção de partículas de tamanho micro e nano.

Após processo de precipitação antissolvente, a solução foi liofilizada para obtenção das micropartículas em pó. E assim, a morfologia do pó obtido foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 4.5 foi apresentada a morfologia das partículas de curcumina não tratada (a) e das micropartículas de curcumina (b).

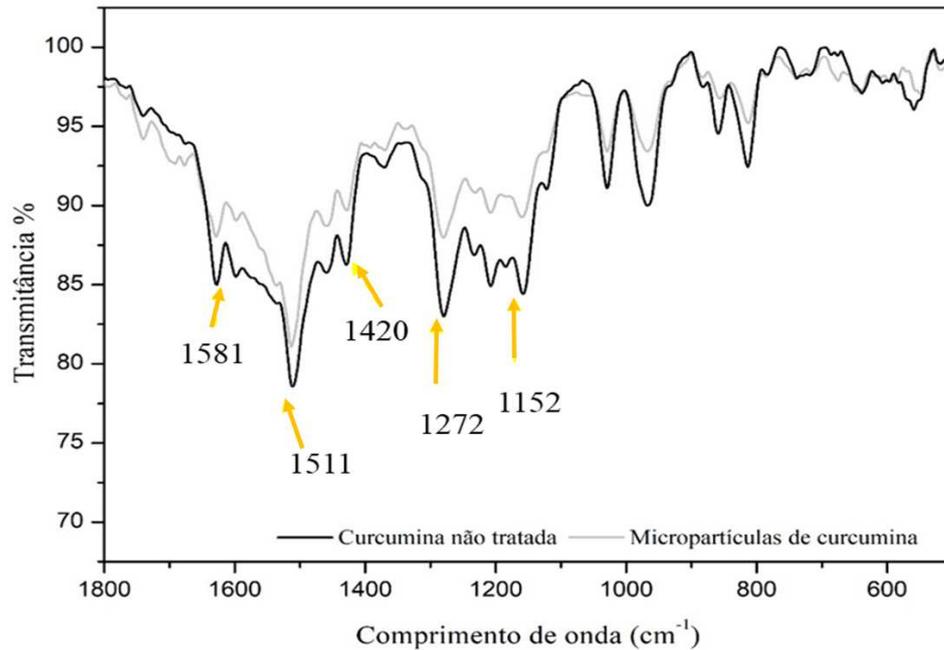
As partículas de curcumina não tratada têm forma irregulares e tamanho não uniforme, enquanto as micropartículas obtidas após processo apresentaram forma de agulhas. A mudança na forma das partículas após o tratamento, pode ser atribuída à agregação unidirecional, devido à supersaturação da solução, nucleação e subsequente crescimento de núcleos, tornando agregação unidirecional (KAKRAN et al., 2012; PARK; JEON; YEO, 2006; SILVA et al., 2017). Silva et al. (2019), utilizaram a técnica de precipitação, usando a água como antissolvente para modificar partículas de curcumina e fizeram observações semelhantes, além da diminuição do tamanho da partícula de curcumina, as partículas apresentaram-se de formas mais homogêneas e dispersas, e em formato de agulhas dendríticas após processo.

Figura 4.5. Microscopia eletrônica de varredura da curcumina não tratada (a) e das micropartículas de curcumina (b) obtidas pela precipitação antissolvente.



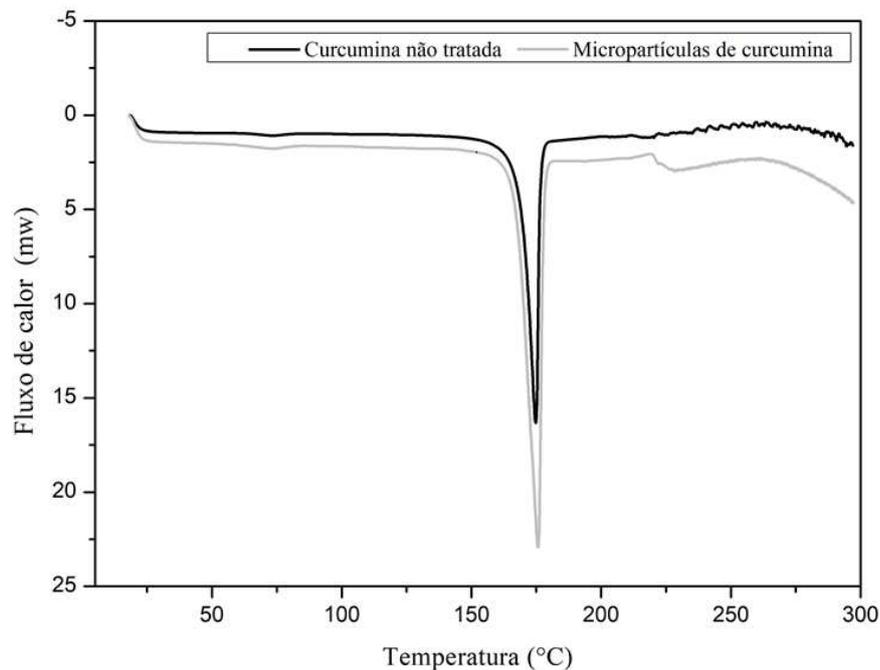
A Figura 4.6 apresenta as características químicas da curcumina não tratada (C) e das micropartículas de curcumina (MC), através dos espectros de infravermelho. De acordo com os espectros, não foram observadas modificações na estrutura química da molécula de curcumina após o tratamento. As bandas características da molécula de curcumina estão presentes na região de 1581 cm^{-1} que representam as vibrações do alongamento do anel de benzeno da curcumina. Na faixa de 1420 cm^{-1} aparece a flexão da vibração do grupo (CH) ligado ao anel benzeno da curcumina. Picos na região de 1271 cm^{-1} alongamento do aromático C-O, na região de 1152 cm^{-1} o modo de vibração de C-O-C. As bandas na região de 1020 a 840 cm^{-1} são referentes ao estiramento do grupo C-O do éter. Esta região foi a que apresentou a mesma intensidade dos picos. O mesmo padrão das bandas para as duas amostras indica que as características químicas da curcumina após processo de precipitação foram mantidas. Pandit et al. (2015) and Zhao et al. (2015) observaram comportamento semelhante, a forma química da curcumina foi preservada após o processo de precipitação antissolvente para redução do tamanho das partículas de curcumina.

Figura 4.6. Espectro FTIR das partículas de curcumina não tratada e das micropartículas de curcumina.



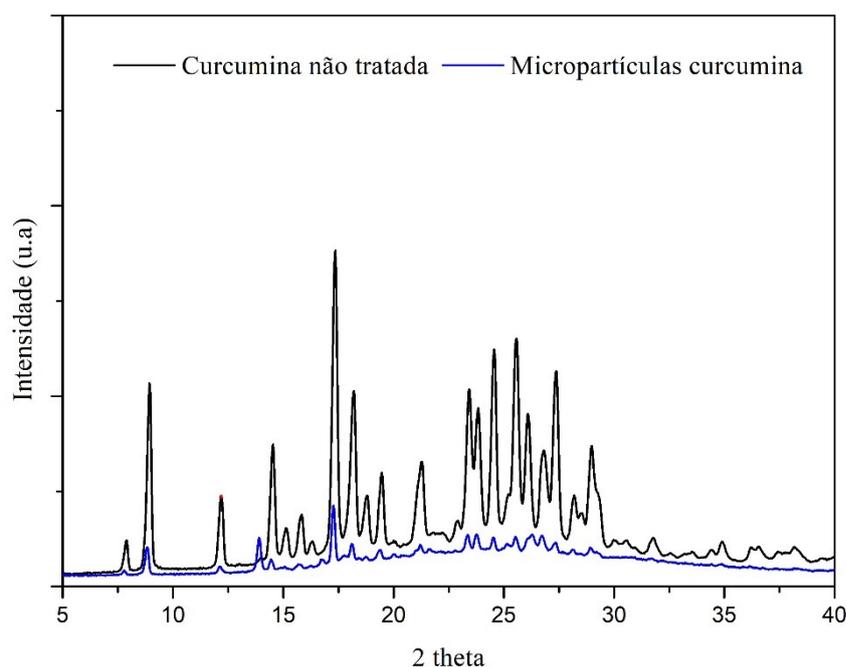
As propriedades térmicas da curcumina são mostradas na Figura 4.7. Os termogramas das amostras de curcumina mostra os picos de fusão da curcumina não tratada e das micropartículas de curcumina, a 175,75 °C e 174,94 °C, respectivamente. No entanto pode ser observado uma redução na área dos picos e consequentemente, redução da entalpia de fusão de 499,03 mJ da curcumina não tratada para 334,98 mJ das micropartículas de curcumina. A redução ocorreu provavelmente às cadeias de moléculas rompidas e à diminuição da extensão da cristalização causada pelo processo de precipitação antissolvente (ZHAO et al., 2015).

Figura 4.7. Termograma das partículas de curcumina não tratada e das micropartículas de curcumina.



Resultados semelhantes foram observados por Kakran et al. (2012), após processo de precipitação antissolvente da curcumina, as partículas tratadas tiveram redução na entalpia de fusão, indicando uma certa perda de cristalinidade de curcumina durante o processo. A entalpia de fusão é proporcional ao grau de cristalinidade nas amostras e, estabilidade das moléculas. Nesse caso, pode-se concluir que o grau de cristalinidade das micropartículas da curcumina foi alterado, tornando-a mais amorfa. Estes resultados são consistentes com a análise de difração de Raio-X (DRX), mostrada pelo difratograma das partículas na Figura 4.8. A curcumina não tratada apresenta picos estreitos e de alta intensidade, que podem indicar uma estrutura altamente cristalina. A diminuição da intensidade desses picos pode indicar uma mudança na estrutura, que pode ser a formação de um novo polimorfo de menor cristalinidade, como pode ser observado no difratograma das micropartículas de curcumina após processo de precipitação. Provavelmente, isso ocorre devido ao impedimento das ligações de hidrogênio entre as moléculas de curcumina, principalmente devido ao uso de ultrassom durante a precipitação de partículas (THORAT; DALVI, 2015). Em geral, esses polimorfos de cristalinidade mais baixa têm uma relação inversa com a solubilidade, ou seja, mais amorfo, maior é a taxa de dissolução da curcumina (GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015; PUDIPEDDI; SERAJUDDIN, 2005). Essas mudanças favorecem o objetivo do presente estudo, quanto a redução do tamanho das partículas de curcumina para aumento da solubilidade, para aplicação em processos de inativação fotodinâmica em alimentos com alto teor de água.

Figura 4.8. Difratoformas das partículas de curcumina.



4.3.1.1 Avaliação do residual de solvente nas micropartículas de curcumina.

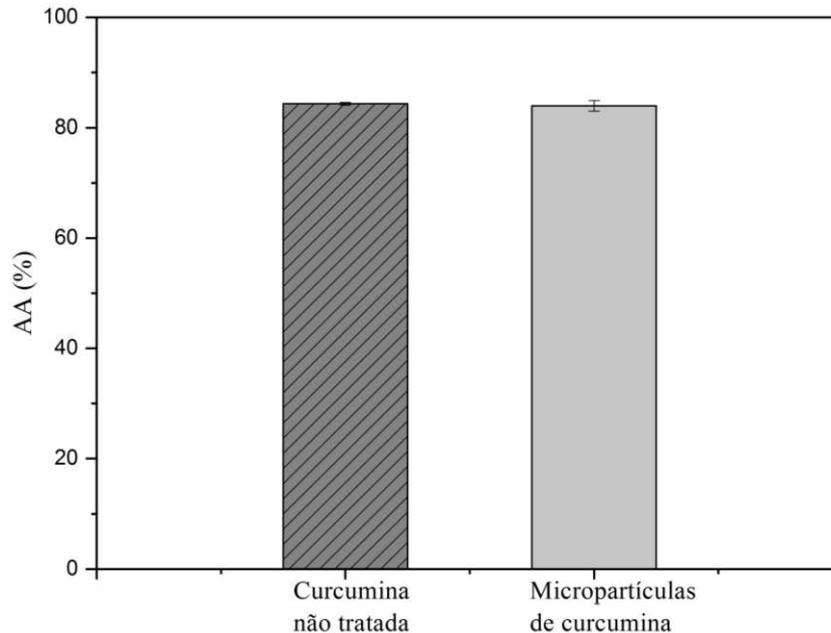
Neste estudo, o diclorometano (DCM) foi utilizado como solvente para modificação da curcumina e a água como antissolvente. Entre os diferentes solventes utilizados para dissolver a curcumina, o DCM foi selecionado devido à alta solubilidade da curcumina neste solvente e sua rápida evaporação a baixas temperaturas. A análise por GC-MS permitiu a verificação da presença de 0,005 ppm de diclorometano residual nas amostras de curcumina após a técnica de precipitação antissolvente. A concentração residual do DCM está dentro dos limites estabelecidos pelo FDA (2019b), no Código de Regulamentos Federais - Título 21, que determina que a concentração máxima desse solvente em aditivos alimentares de 30 ppm. No Brasil, a concentração de resíduos de DCM em extrato natural permitido pela ANVISA (2007) é de 0,1 ppm. Assim, as micropartículas de curcumina obtidas na presente pesquisa após precipitação estão dentro dos padrões estabelecidos pelas agências reguladoras para consumo humano.

4.3.1.2 Atividade antioxidante

Além da atividade antimicrobiana da curcumina, essa substância corante, possui importante atividade antioxidante (CARVALHO et al., 2015). As micropartículas de curcumina foram avaliadas afim de verificar se o processo de precipitação antissolvente modificou negativamente sua atividade antioxidante.

A Figura 4.9, mostra o percentual da atividade antioxidante das amostras de curcumina não tratada e após o processo de modificação, e aponta que não houve modificação da atividade antioxidante da curcumina. O método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é baseado na captura do radical livre DPPH por antioxidantes, e quando solubilizado em metanol gera uma solução violeta e, na presença de antioxidante é reduzido, diminuindo sua cor. Como curcumina é altamente solúvel em metanol, pode justificar o porquê não houve diferenças significativas entre a atividade antioxidante entre as partículas de curcumina.

Figura 4.9. Atividade antioxidante das partículas de curcumina não tratada e após processo de precipitação antissolvente, expressa em percentual da atividade antioxidante (AA %).



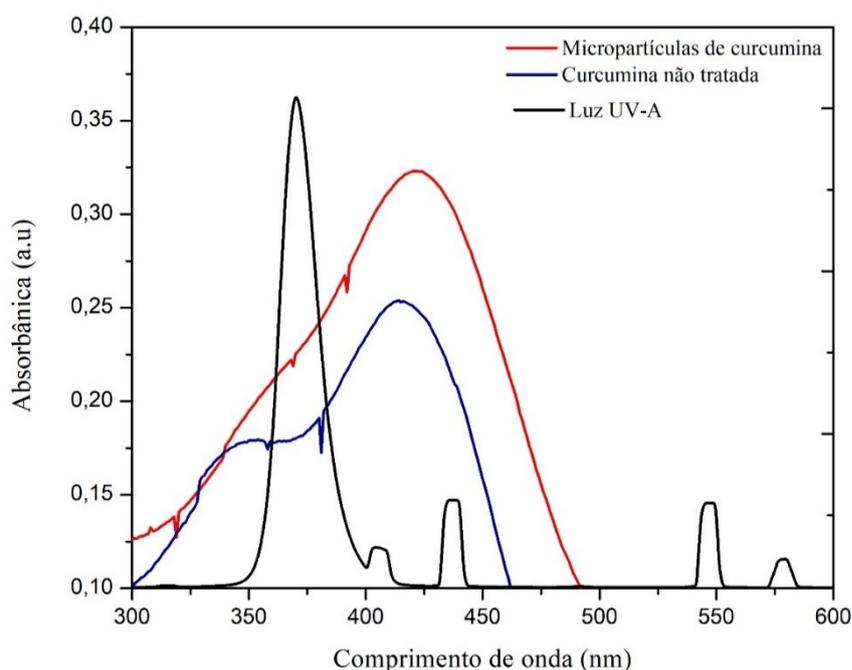
Por outro lado, Kakran et al. (2012) relatam aumento da atividade antioxidante da curcumina após redução do tamanho das partículas, por processo de precipitação antissolvente, e justificaram este aumento devido a solubilidade e taxa de dissolução maiores na água do que a curcumina original, mostrando assim um maior efeito de eliminação de radicais livres.

4.3.2 Inativação fotodinâmica

4.3.2.1 Avaliação do espectro visível da curcumina e da luz UV-A

A Figura 4.10 apresenta a análise do espectro de absorção do fotossensibilizador (curcumina) e da fonte de emissão de luz UV-A.

Figura 4.10. Espectros de absorção da curcumina e da luz UV-A.



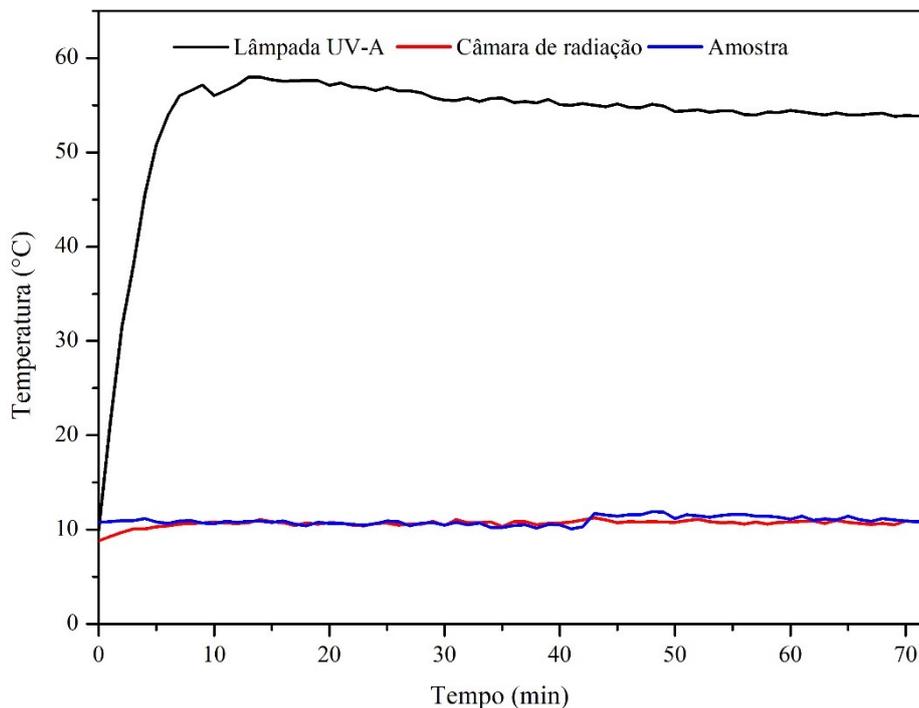
A análise espectrofotométrica em estudos de inativação fotodinâmica é utilizada para caracterizar as regiões de maior absorção e os comprimentos de onda específicos do fotossensibilizador utilizado. Ambas as formas de curcumina (não tratada e micropartículas) apresentaram uma absorção na faixa de 300 a 480 nm (Figura 4.10). Este comprimento de onda coincide com o comprimento de onda da região Ultravioleta, e passa pela região de UV-A (315 nm-400 nm). O espectro de emissão da fonte de luz UV-A (320–400 nm; DUL L BL UVA 24 W; Osram), usada neste estudo, exibiu o comprimento de onda máximo (λ) 370 nm (Figura 4.10), em uma faixa que se sobrepôs ao comprimento de onda da curcumina. Essa faixa de comprimento de onda também é próxima a usada por Cossu et al. (2018) para inativação microbiana de *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria innocua* em espinafres por fotodinâmica usando curcumina como fotossensibilizador. A inativação fotodinâmica necessita de três componentes essenciais para ser efetiva: uma fonte de luz, um agente fotossensibilizador e o

oxigênio (AL-ASMARI; MEREDDY; SULTANBAWA, 2018). Neste estudo, a curcumina foi usada como agente fotossensibilizante, quando exposta ao comprimento de onda que corresponde ao seu espectro de absorção de luz UV-A, em que absorve e transfere energia da fonte de luz para o oxigênio molecular, levando à formação de espécies altamente citotóxicas, o que causa danos às células microbianas.

4.3.2.2 Câmara de luz UV-A para inativação fotodinâmica.

Para avaliar o comportamento da energia emitida pela lâmpada no ambiente durante o processo de inativação, as temperaturas da câmara, da superfície da amostra e da lâmpada foram monitoradas e estão mostradas na Figura 4.11.

Figura 4.11. Perfil de temperatura da amostra, câmara de inativação e lâmpada UV-A durante a irradiação.

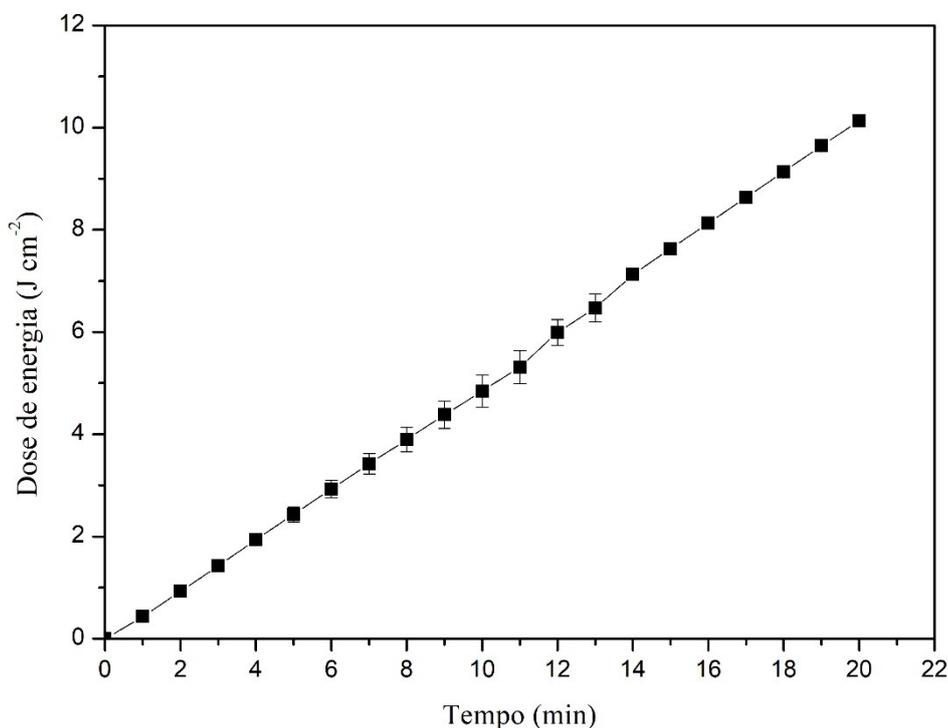


Observa-se que a temperatura na superfície externa da lâmpada atingiu $56,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 4,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) em menos de 10 minutos de irradiação e permaneceu constante após 70 minutos de irradiação. Enquanto isso, a temperatura da amostra, localizada a 10 cm das lâmpadas foi $14,53\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,76\text{ }^{\circ}\text{C}$) e da câmara $11,08\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,58\text{ }^{\circ}\text{C}$), e sem alteração durante e após 70 minutos de

irradiação. Portanto, os efeitos térmicos gerados pela lâmpada podem ser desconsiderados, no processo de inativação fotodinâmica.

A irradiância média medida das lâmpadas UV-A na superfície da amostra foi de $7,71 \text{ mW cm}^{-2}$. A densidade de energia foi calculada em função do tempo de exposição da amostra. Quanto maior o tempo de exposição, maior a dose de energia recebida pela amostra. Neste trabalho foram testados intervalos de tempos e os resultados mostrados na Figura 4.12.

Figura 4.12. Dose de energia nas amostras em relação ao tempo de exposição.



4.3.3 Avaliação da Inativação fotodinâmica

A avaliação da técnica de inativação fotodinâmica utilizando micropartículas de curcumina obtidas pelo processo de precipitação antissolvente, foi realizada a partir dos resultados microbiológicos nas ostras trituradas ou nas ostras inteiras e desconchadas.

4.3.3.1 Efeito de inativação da fotodinâmica em ostras trituradas.

Na Tabela 4-3 são apresentados os resultados da contagem final de *Vibrio* spp. e a redução obtidas pelos tratamentos aplicados em ostras trituradas. Esta etapa inicial do trabalho teve como objetivo testar a câmara construída para a inativação fotodinâmica, assim como as partículas de curcumina produzidas por precipitação antissolvente. A contagem inicial de vibrios foi $4,6 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, observa-se que os tratamentos com uso de curcumina ou luz UV-A sozinhos tiveram um menor efeito na redução (Tabela 4-3). Por outro lado, quando aplicada a técnica de inativação fotodinâmica, os tratamentos com curcumina ou micropartículas de curcumina combinadas com luz UV-A, houve redução de 37,8% a 93,5% na contagem total de *Vibrio* spp.

Tabela 4.3. Efeito dos tratamentos aplicados em ostras trituradas

Tratamento	Luz UV-A (J cm⁻²)	Curcumina (µM)	Contagem final (log UFC ml⁻¹)	Redução (%)
Controle	-	-	$4,6 \pm 0,4$	0
Luz UV-A	2,3	-	$4,2 \pm 0,5$	9,2
C	-	40	$4,3 \pm 0,5$	7,6
	2,3	10	$2,9 \pm 0,2$	37,8
C + UV-A	2,3	20	$2,1 \pm 0,3$	55,1
	2,3	40	$0,4 \pm 0,4$	90,8
MC	-	40	$4,2 \pm 0,4$	11,9
	2,3	10	$2,4 \pm 0,5$	47,6
MC + UV-A	2,3	20	$1,8 \pm 0,4$	61,1
	2,3	40	$0,3 \pm 0,3$	93,5

Legenda: MC: micropartículas de curcumina; C: curcumina não tratada; MC+ UV-A: inativação fotodinâmica com micropartículas de curcumina; C+ UV-A: inativação fotodinâmica com curcumina não tratada; - não aplicado.

Nesta etapa, a dose de energia utilizada foi de $2,3 \text{ J cm}^{-2}$, resultado da exposição por 5 minutos a radiação UV-A, e as concentrações de curcumina variaram entre 10, 20 e 40 µM. Ao analisar o efeito concentração de curcumina no processo de inativação fotodinâmica, percebe-se um efeito positivo, com o aumento da concentração em relação a redução das contagens. As amostras apresentaram uma contagem inicial de *Vibrio* de $4,6 \pm 0,4 \log \text{ UFC. ml}^{-1}$, após o tratamento de inativação fotodinâmica utilizando micropartículas de curcumina (MC+UV-A) na concentração de 40 µM, a contagem total de *Vibrio* reduziu cerca de 4,3 ciclos logarítmicos, seguido da redução de 2,8 ciclos para concentração de 20 µM, e de 2,2 ciclos para concentração de 10 µM (Tabela 4.3). A curcumina não tratada (C) combinada a luz UV-A (C + UV-A),

também apresentou efeito significativo na redução de *Vibrio*, com reduções de 1,7, 2,5 e 4,2 ciclos logarítmicos, para as concentrações de 10, 20 e 40 μM , respectivamente.

No geral, concentrações de curcumina de 20 μM já foram suficientes para reduzir mais de 50% na contagem total de *Vibrio*, desde que fotoativadas pela exposição a UV-A. Ao analisar estatisticamente as reduções obtidas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o tipo de curcumina utilizada no tratamento de inativação fotodinâmica, as duas partículas apresentaram reduções superiores a 90%, quando aplicada a concentração de 40 μM . Wu et al. (2016) investigaram a inativação fotodinâmica em células de *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), combinando as concentrações de 5, 10 e 20 μM de curcumina com luz blue led (3,6 J cm^{-2}) e obtiveram reduções de 6,5 log nas concentrações de 10 e 20 μM . Isto é, nessas condições de processo, curcumina a 20 ou 40 μM , dose de energia UV-A de 2,3 J cm^{-2} , aplicada em solução (ostras trituradas), a técnica apresentou efeito benéfico para aplicação em ostras.

4.3.3.2 Efeito do tratamento de inativação da fotodinâmica em ostras inteiras desconchadas.

A partir dos resultados da primeira etapa, observou-se que a concentração de curcumina de 40 μM combinada a luz UV-A foi capaz de reduzir cerca de 90% das contagens de *Vibrio*, quando aplicado em solução com ostras trituradas. Nesta segunda etapa, testou-se essas condições obtidas nos resultados da primeira etapa para as ostras inteiras e desconchadas.

Na Tabela 4.4 são apresentados os resultados das reduções obtidas para *Vibrio*, nos tratamentos de inativação fotodinâmica, com concentração de curcumina de 40 μM e para duas doses de energia 2,3 e 6,9 J cm^{-2} , resultantes da exposição por 5 e 15 minutos, respectivamente.

Tabela 4.4- Efeito dos tratamentos de inativação fotodinâmica em ostras inteiras e desconchadas.

Tratamento	Luz UV-A (J cm ⁻²)	Curcumina (μM)	Contagem final (log UFC ml ⁻¹)	Redução (%)
Controle Positivo	-	-	4,4 ± 0,2	0
C + UV-A	2,3	40	4,1 ± 0,5	6,9
	6,9	40	3,9 ± 0,1	10,3
MC + UV-A	2,3	40	2,0 ± 0,1	54
	6,9	40	2,0 ± 0,0	54,3

Legenda: MC: micropartículas de curcumina; C: curcumina não tratada; MC+ UV-A: inativação fotodinâmica com micropartículas de curcumina; C+ UV-A: inativação fotodinâmica com curcumina não tratada; - não aplicado.

Nos resultados mostrados na Tabela 4.4, obtidos para os tratamento de inativação fotodinâmica para ostras inteiras e desconchadas, a curcumina não tratada (C + UV-A), mostrou uma baixa redução nas contagens de *Vibrio* naturalmente presente nas ostras. Com uma redução de 0,3 ciclos logarítmicos, para a dose de energia de 2,3 J cm⁻², e de 0,5 ciclos logarítmicos para dose de 6,9 J cm⁻². Por outro lado, o tratamento de inativação fotodinâmica usando micropartículas de curcumina (MC + UV-A) mostrou uma redução significativa (p <0,05) na contagem total de *Vibrio*, com redução de 2,4 ciclos logarítmicos para ambas as doses de energia testadas, 2,3 e 6,9 J cm⁻². As micropartículas de curcumina mostraram uma maior redução na contagem de *Vibrio* em ostras inteiras do que a curcumina não tratada, provavelmente devido à melhor solubilidade das micropartículas e biodisponibilidade, que pode ter facilitado a penetração da curcumina na célula microbiana. De acordo com Bhawana et al. (2011), partículas de curcumina de menor tamanho são responsáveis por uma melhor penetração e absorção celular, além de melhorar seus efeitos biológicos.

Comparando os resultados obtidos nos tratamentos de inativação fotodinâmica, podemos observar uma redução na efetividade do processo, quando avaliamos as reduções logarítmicas obtidas para ostras inteiras e desconchadas (Tabela 4.4), em relação as ostras trituradas (Tabela 4.3). Enquanto, no tratamento com solução, das ostras trituradas, ambas as partículas apresentaram reduções acima de 90% nas contagem total de *Vibrio*. Durante os tratamentos em ostras inteiras e desconchadas, as reduções foram de apenas cerca de 10% para as partículas de curcumina não tratada, e de 54% para as micropartículas de curcumina. Além dos fatores mencionados acima, em relação a solubilidade e biodisponibilidade das partículas

de curcumina, outros fatores podem influenciar um sistema de inativação fotodinâmica. A posição do fotossensibilizador em relação à estrutura alvo é um deles. Como o tempo de vida do oxigênio singlete e seu raio de ação é curto, o fotossensibilizador precisa estar próximo às células alvo, e também a penetração limitada da luz na parede celular (PREIS et al., 2019).

Wu et al. (2015) constataram uma redução na eficiência do processo de inativação fotodinâmica, quando compararam os resultados obtidos para inativação de norovírus murion (MNV-1) *in vitro* e em ostras. No processo *in vitro* os autores obtiveram reduções de 3 ciclos logarítmicos, num processo de inativação fotodinâmica com curcumina a uma concentração de 20 μM , e dose de energia blue led de 3,6 J cm^{-2} , quando o processo foi aplicado em ostras, mostrou uma redução de apenas 1,15 ciclos logarítmicos. Os autores atribuíram esses resultados a dois fatores: a concentração de curcumina nas ostras era menor em relação ao tratamento com tampão (*in vitro*), levando à produção reduzidas de ROS; e a absorvância da luz pelos tecidos ostra pode reduzir a energia total de ativação e, portanto, o nível de ativação fotodinâmica da curcumina.

Aurum; Nguyen (2019) avaliaram o efeito da inativação fotodinâmica na descontaminação de superfícies de alimentos, utilizando dose de energia de 27,2 J cm^{-2} de luz blue led e curcumina a 300 μM para inativação de *E. coli*. O tratamento exibiu efeito bactericida contra *E. coli* na superfície do ágar inativando cerca de 5,7 log UFC cm^{-2} , entretanto, quando o tratamento foi aplicado na superfície de uva a inativação foi de apenas 2,2 log UFC cm^{-2} , menor em comparação com a superfície do ágar. E isso pode ter ocorrido devido a exposição desigual da superfície do fruto à fonte de luz, apenas a metade superior era diretamente iluminada, com uma distribuição de energia luminosa não uniforme.

De um modo geral, as condições ambientais as quais o processo ocorre devem ser consideradas, pois há diferenças nos tratamentos aplicados em cultura pura (meio simples) em relação aos tratamentos aplicados em alimentos (meio complexo) (MATOS et al., 2018). No processo de inativação fotodinâmica, deve-se levar em consideração a disponibilidade do fotossensibilizador, em relação ao micro-organismo, assim como sua localização. O uso da técnica de inativação fotodinâmica é recente em alimentos, e são escassos os estudos que fazem comparações entre os tratamentos, ou aplicações diretamente em alimentos. Mas assim, como ocorre em outros tratamentos com ostras para inativação de *Vibrio*, alguns fatores podem influenciar na eficiência do tratamento. Matos et al. (2018), utilizaram CO_2 supercrítico para inativação de *Vibrio* em ostras e em meio de cultura, e verificaram que embora tenham obtido

compartamento similar durante a inativação, o tempo para atingir duas reduções logarítmicas em ostras foi maior do que no meio de cultura, os autores atribuem o resultado os constituintes do meio que podem interferir no comportamento da inativação, como a gordura, que dificultam a penetração do dióxido de carbono nas células microbianas e, conseqüentemente, retardam a inativação. Outro comportamento observado pelos autores, está relacionado com a diferença nas cepas, a cepa dos micro-organismos presentes na ostra *in natura*, seria diferente da adicionada intencionalmente.

Outra observação quanto a Tabela 4.4, é em relação a dose de energia usada no tratamento. Buscando aumentar a inativação pelo tratamento nas ostras inteiras desconchadas, o tempo de exposição das amostras a luz UV-A foi aumentando de 5 para 15 minutos, o que resultou num aumento da dose de energia de 2,3 para 6,9 J cm⁻², no entanto os tratamentos não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as duas doses de energia, para ambas partículas de curcumina, curcumina não tratada e micropartículas de curcumina.

Dovigo et al. (2011) utilizaram curcumina (200 µM) como fotossensibilizador em tratamento de Terapia Fotodinâmica (TDF) utilizando lâmpadas blue led, para inativação de uma cepa padrão de *Candida albicans*, a investigação microbiológica mostrou que fluências acima de 5,28 J cm⁻² não aumentaram a eficácia da TFD contra *C. albicans*. Os autores relacionaram esses resultados com redução da absorção de luz e fluorescência da curcumina em função do tempo de iluminação, ou seja, o fotocclareamento. Assim, pode-se sugerir que a fotodegradação da curcumina pode ser acompanhada por uma diminuição na produção de ROS, uma vez que menos moléculas de curcumina opticamente ativa no espectro visível estarão presentes na solução.

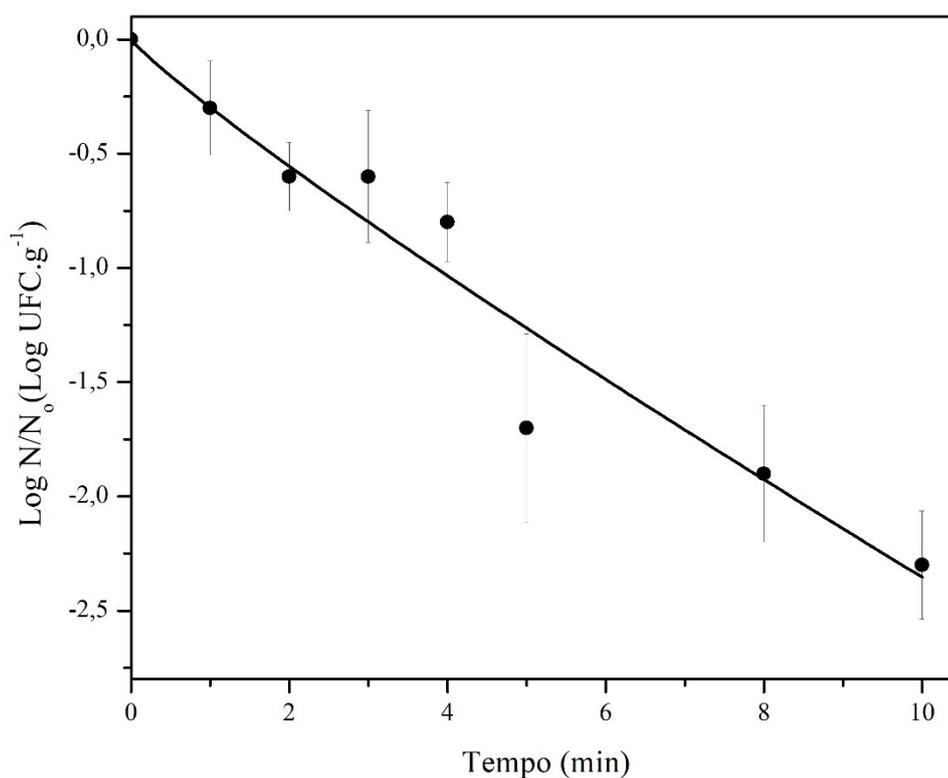
No apêndice A, é apresentada a Figura 7.2, que representa uma ilustração da redução na concentração da solução de curcumina após exposição a luz UV-A. Os resultados mostraram que, após 8 minutos, a luz não teria mais efeito sobre a curcumina, pois a solução de curcumina atinge concentrações <10 µM, e é duvidoso que ocorra a produção de ROS. A absorção de luz e a fluorescência da curcumina diminuíram em função do tempo de iluminação, que pode ter sido causado por fotodegradação, reduzindo efetivamente a produção de ROS, corroborando com as observações feitas sobre a Tabela 4.4, sobre o aumento da dose de energia não ter refletido em aumento na inativação do processo.

Assim, para verificar a influência da dose de energia no tratamento de inativação fotodinâmica, foi realizada uma cinética de inativação fotodinâmica utilizando micropartículas de curcumina (40 μM) em ostras inteiras e desconchadas.

4.3.3.3 Cinética de inativação de *Vibrio* em ostras desconchadas.

O modelo de Weibull foi escolhido para descrever a inativação fotodinâmica de *Vibrio* em ostras desconchadas. A Figura 4.13 corresponde a cinética de inativação de *Vibrio* nas ostras pelo tratamento de inativação fotodinâmica com micropartículas de curcumina (40 μM) combinada com diferentes tempos de exposição à luz UV-A.

Figura 4.13- Cinética de inativação de *Vibri*os em ostras inteira pela inativação fotodinâmica.



Legenda: a linha sólida (—) representa o Modelo de Weibull ajustado aos dados experimentais

Os parâmetros cinéticos do modelo Weibull foram $\alpha = 0,939 \pm 0,159$ e $\beta = 3,939 \pm 1,049$, com R^2 de $0,922 \pm 0,047$ e MSE de $0,250 \pm 0,096$, ajustando-se aos dados experimentais,

e possibilitando o estudo da sobrevivência de *Vibrio* em ostras desconchadas através da variação dos parâmetros ajustados α e β e tempos de irradiação. O modelo mostrou que, após 5 minutos de irradiação, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na redução da contagem de *Vibrio* mesmo com aumento do tempo de exposição da amostra. Corroborando com as observações feitas anteriormente, referente aos resultados apresentados na Tabela 4.4, que o aumento da dose de energia de 2,3 para 6,9 J cm⁻², resultado do aumento do tempo de exposição de 5 para 15 minutos, não resultou em uma maior inativação. O modelo de Weibull têm sido utilizado para descrever curvas de inativação fotodinâmica de micro-organismos, como *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, em uvas e salmão defumado respectivamente em alimentos (AURUM; NGUYEN, 2019; JOSEWIN et al., 2018). Mas ainda não há referências ao modelo sobre a inativação fotodinâmica em ostras desconchadas, destacando a contribuição deste trabalho.

4.3.3.4 Avaliação da redução de *Vibrio* pelo tratamento de inativação em ostras desconchadas durante o armazenamento

Ao analisar os resultados, o processo de inativação fotodinâmica usando solução de micropartículas de curcumina a 40 μ M e dose de energia de 2,3 J. cm⁻² foi capaz de reduzir a contagem total de *Vibrio* em ostras inteiras sem conchas para um nível não detectável (< 2 logs). Em uma avaliação visual das ostras, as amostras mantiveram suas características, sem retenção da cor de curcumina em sua superfície. Como pode ser observado nas Figuras 4.14 e 4.15. A aparência visual é um dos critérios mais importantes usado pelos consumidores para avaliar o produto no momento da compra, ou seja, oferecer um produto de boa aparência, têm grande relevância.

Figura 4.14 – Aparência das ostras em solução de micropartículas de curcumina ($40 \mu\text{M}$) (a) antes da exposição a luz UV-A, (b) após tratamento de inativação fotodinâmica.

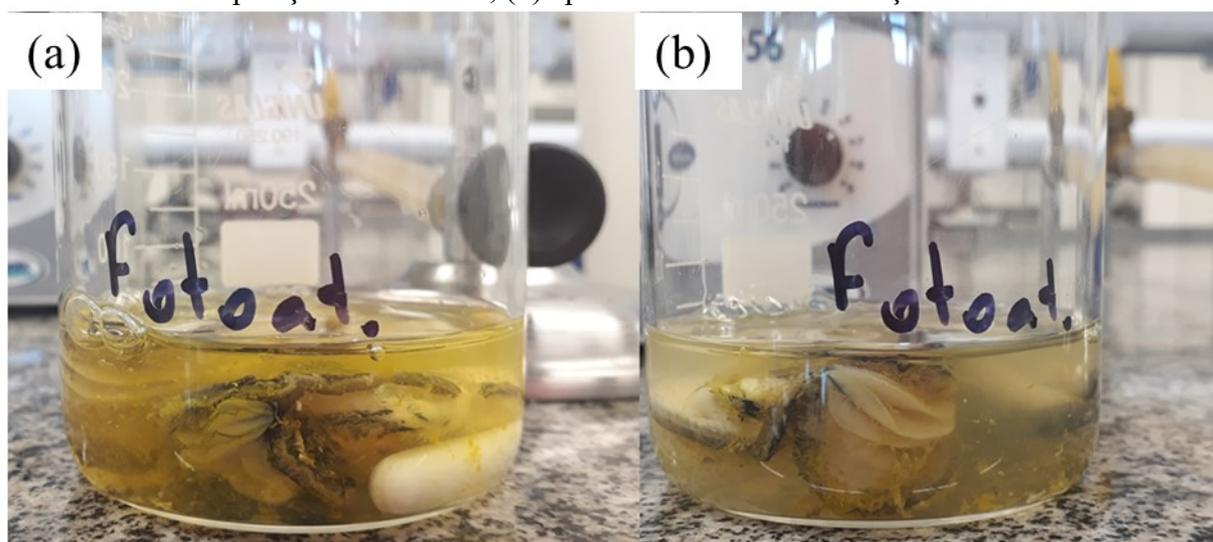


Figura 4.15 – Aparência das ostras após tratamento de inativação fotodinâmica.



As ostras tratadas ($\text{MC } 40 \mu\text{M}$, $2,3 \text{ J cm}^{-2}$) foram armazenadas sob refrigeração a 4°C por 8 dias, para avaliar o efeito da inativação fotodinâmica nas células *Vibrio* durante o armazenamento. A contagem final de *Vibrio* é mostrada na Tabela 4.5, e comparada com ostras tratadas apenas com micropartículas de curcumina ($40 \mu\text{M}$).

Tabela 4.5- Efeito da inativação fotodinâmica (MC 40 μM , 2,3 J cm^{-2}) e somente MC (40 μM) no crescimento de *Vibrio* spp. naturalmente presentes em ostras, armazenadas a 4 °C por 8 dias.

Tempo (dias)	Contagem de <i>Vibrio</i> spp. (log UFC g ⁻¹)	
	MC + luz UV-A	MC
Sem tratamento	4,4± 0,1	4,4± 0,1
0	2,4 ± 0,1	4,4± 0,1
5	1,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1
8	1,4 ± 0,1	2,0 ± 0,9

Legenda: MC: micropartículas de curcumina

Observando os resultados da Tabela 4.5, as amostras apresentaram redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem total de *Vibrio* após o tratamento de inativação fotodinâmica (MC 40 μM , 2,3 J cm^{-2}), e ao final do armazenamento a contagem total de *Vibrio* foi de 1,4 log UFC g⁻¹. Ou seja, a inativação fotodinâmica pode causar danos irreversíveis as células de *Vibrio*. Deng et al. (2016) utilizaram o tratamento de inativação fotodinâmica com azul de metileno para inativação culturas de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, e observaram que após tratamento as células inativadas apresentaram alterações morfológicas, vazamento de citoplasma e degradação de proteínas e DNA. Semelhante as observações feitas por Wu et al. (2016), que observaram após tratamento de inativação fotodinâmica com curcumina dano notável às proteínas da membrana externa bacteriana e materiais genéticos às células de *V. parahaemolyticus*.

Esses resultados também serviram para confirmar as reduções nas contagens obtidas logo após o tratamento, uma vez que foi realizada uma análise subjetiva em relação as contagens totais de *Vibrio*, pela identificação de colônias características em ágar TCBS.

4.3.3.5 Avaliação do tratamento de inativação em ostras desconchadas em relação a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas.

A partir da análise dos resultados obtidos no item 4.3.3.3, as amostras foram tratadas com micropartículas de curcumina 40 μM e dose de energia de 2,3 J cm^{-2} , e avaliadas em relação a contagem de bactérias aeróbias totais mesófilas e psicrotróficas após o tratamento, com os resultados apresentados na Tabela 4.6. Os resultados foram comparados em relação às ostras tratadas apenas com micropartículas de curcumina.

Tabela 4.6- Efeito da inativação fotodinâmica (MC 40 μM , 2,3 J cm^{-2}) e somente MC (40 μM) na inativação de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas presentes em ostras.

	Contagem de bactérias (log UFC g^{-1})	
	Mesófilas	Psicotróficas
Contagem inicial	4,1 \pm 1,9	3,7 \pm 0,4
MC + luz UV-A	3,5 \pm 0,4	2,4 \pm 0,1
MC	3,4 \pm 0,6	3,5 \pm 0,6

Legenda: MC: micropartículas de curcumina; MC + luz UV-A: tratamento de inativação fotodinâmica.

A contagem total de micro-organismos mesófilos foi de 4,1 $\log \pm 1,9 \log$ UFC g^{-1} , e de psicotróficos foi de 3,7 $\log \pm 0,4 \log$ UFC g^{-1} . Após o tratamento de inativação fotodinâmica, a contagem de mesófilos reduziu cerca 0,6 ciclos logarítmicos, e os psicotróficos houve uma redução de 1,3 ciclos logarítmicos. Enquanto, o tratamento apenas em solução com micropartículas de curcumina (40 μM) sem luz UV-A, não apresentou reduções logarítmicas maior que 0,7 e 0,3 ciclos, para mesófilos e psicotróficos, respectivamente. A diferença nas reduções logarítmicas para esses grupos de micro-organismos, provavelmente ocorreu devido à diferenças nas características de cada micro-organismo, que é atribuído a composição e morfologia da membrana, assim como, seu estado de crescimento (JORI, 2006). Além disso, algumas bactérias são consideradas menos resistentes a inativação fotodinâmica do que outras de acordo com Oliveira et al. (2018). Os autores observaram que durante a inativação fotodinâmica com curcumina as bactérias *L. innocua* (gram-positiva) foi mais suscetível, do que *E. coli* O157: H7 (gram-negativa) ao tratamento fotoinativação. Os autores relacionaram esses resultados com a maior permeabilidade da membrana externa da parede celular das bactérias gram-positivas (*L. innocua*).

Como exposto por Cruz-Romero et al. (2008); He et al. (2002); Liu et al. (2016); Ramos et al. (2012); Soares (2015), as ostras alimentam-se de partículas dispersas na água e por isso têm uma flora microbiana variada. Esta flora pode levar à deterioração das ostras e às vezes pode representar uma ameaça para a saúde do consumidor. Desta forma, vários métodos foram e vêm sendo desenvolvidos e utilizados para reduzir ou inativar micro-organismos indesejáveis, visando a qualidade microbiológica e a manutenção das características sensoriais. Embora a técnica de inativação fotodinâmica seja antiga, a aplicação para descontaminação de alimentos é recente e precisa ser investigada para os diferentes grupos de micro-organismos, assim como para as diferentes matrizes alimentares. Este trabalho mostrou que é possível melhorar a

eficiência do tratamento com o uso de micropartículas, que por sua vez, teriam a solubilidade e biodisponibilidade aumentada em relação as partículas de curcumina não tratada.

4.4 CONCLUSÃO

A técnica de precipitação antissolvente é uma técnica simples para redução do tamanho de partículas. As partículas de curcumina obtidas pela técnica apresentaram uma boa redução no tamanho, cerca de 3 vezes menor o tamanho, em relação as partículas de curcumina não tratada. As partículas apresentaram uma boa distribuição de tamanho variando de 0,391 a 0,400 μm , e não foram observadas degradação das partículas após tratamento, pois não foram observadas modificações na estrutura química da molécula de curcumina ou mudança na atividade antioxidante das partículas tratadas.

As micropartículas obtidas após processo apresentaram forma de agulhas, característico do processo utilizado. Além disso, ocorreu redução da entalpia de fusão e a análise de difração de Raio-X mostrou no difratograma uma redução da intensidade dos picos das micropartículas obtidas pelo processo de precipitação, características de que pode ter havido uma mudança na estrutura da curcumina e formação de um novo polimorfo de menor cristalinidade.

As alterações resultantes do processo de precipitação antissolvente contribuíram para aplicação das micropartículas no tratamento de inativação fotodinâmica. Pois, as micropartículas de curcumina apresentaram melhores resultados na inativação pelo tratamento de inativação fotodinâmica em ostras desconchadas, do que as partículas de curcumina não tratada. As partículas de curcumina não tratada apresentaram efeito na inativação fotodinâmica, porém quando esta foi aplicada em solução. Em ostras inteiras desconchadas, a melhor condição de inativação fotodinâmica foi obtida pela solução de micropartículas de curcumina a 40 μM e a dose de energia UV-A de 2,3 J cm^{-2} , sendo que os danos causados nas células possivelmente foram irreversíveis, pois após 8 dias de armazenamento não houve aumento nas contagens em relação as reduções logarítmicas obtidas.

Por meio da variação do tempo de exposição, foi possível constatar que períodos muito longos de exposição não são favoráveis ao processo, pois com a fotodegradação da curcumina ocorre a redução na produção de ROS. E, o modelo de Weibull foi utilizado com sucesso para

descrever o efeito da dose de energia na cinética de inativação de *Vibrio* em ostras por tratamento fotodinâmico.

Além disso, comparando os tratamentos utilizados pode-se observar que há uma redução na eficiência do tratamento, quando aplicado em ostras inteiras desconchadas em relação ao tratamento em solução. É importante destacar que o trabalho apresentou uma nova técnica para descontaminar ostras, e mostrou que o uso de micropartículas de curcumina pode ser uma alternativa ao tratamento de inativação fotodinâmica.

CAPÍTULO 5 . CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho seguiu duas vertentes, que tinham como objetivo o desenvolvimento e a aplicação de técnicas para reduzir a contaminação natural das ostras e aumentar a vida útil deste produto.

Na primeira etapa, o acondicionamento de ostras cozidas em atmosfera modificada e armazenamento sob refrigeração apresentou-se eficaz para o aumento da vida útil, pelo retardamento do crescimento microbiológico. A partir da atmosfera MAP₂ e pelo processo de SGS foi possível atingir elevadas concentrações de CO₂ dissolvido no produto, o que resultou num maior efeito bacteriostático.

Com alta concentração de CO₂ dissolvido nas ostras (SGS 750 mg CO₂ kg de produto⁻¹, e MAP₂ 108 mg CO₂ kg de produto⁻¹) foi possível estender a vida útil de ostras cozidas em até 15 dias, sem influenciar as propriedades físico-químicas das ostras. No tratamento SGS, a concentração de CO₂ dissolvida nas ostras foi maior em relação ao acondicionamento somente em MAP₂ (100% CO₂).

No processo SGS a maior absorção de CO₂ pelo produto foi devido ao aumento da pressão parcial e total do CO₂, em relação a MAP tradicional. Em MAP₂, a absorção do CO₂ pelo produto aconteceu ao longo do armazenamento, como ostras são alimentos com alto teor de umidade, a alta absorção de CO₂ do *headspace* resultou no encolhimento da embalagem, aparência de vácuo. Além disso, o tempo necessário para obter elevadas concentrações de CO₂ durante o SGS (15 min), foi bem menor em relação a atmosfera com ingestão da composição gasosa no interior da embalagem (MAP). O uso do procedimento de SGS em ostras, mostrou vantagens em relação a MAP, como a redução do tamanho da embalagem, com a possibilidade de usar g/p menores e manter o efeito bacteriostático.

Por outro lado, baixa concentração de CO₂ dissolvida nas ostras (18 mg CO₂ kg de produto⁻¹), obtida pelo armazenamento em MAP₁ (20% CO₂), não foi capaz de prolongar a fase *lag* do crescimento de bactérias mesófilas e psicrotróficas em ostras cozidas armazenadas a 4 °C.

A segunda etapa do trabalho, aconteceu em três fases: construção da câmara de radiação UV, produção das micropartículas de curcumina, e a aplicação das micropartículas no tratamento de IFD.

O equipamento utilizado na IFD, mostrado neste trabalho, foi construído e desenvolvido para aplicação de radiação UV para inativação de micro-organismos e

descontaminação de alimentos. Este, pode ser utilizado para estudos em solução e em alimentos, além de, possibilitar a variação da dose de energia pelo tempo de exposição, é possível fazer o controle da irradiância pela variação da quantidade de lâmpadas utilizadas, e distanciamento da amostra a radiação, e também o controle da temperatura durante o tratamento.

A produção de micropartículas teve como objetivo a aplicação da curcumina no tratamento de IFD em ostras desconchadas. O processo de precipitação antissolvente demonstrou ser uma técnica apropriada para preparar micropartículas de curcumina. As partículas de curcumina obtidas atingiram tamanhos homogêneos com cerca de 0,4 μm . Além disso, o processo de redução das partículas não acarretou mudanças químicas na estrutura da curcumina, mas mostrou resultados satisfatórios para alterações em relação a mudanças de cristalinidade, que resultou no aumento da biodisponibilidade e solubilidade das partículas tratadas.

Na aplicação das partículas de curcumina para inativação de contagens totais de *Vibrio*, foi observado que o tratamento de IFD (curcumina + luz UV-A) teve melhores resultados, em relação aos tratamentos com curcumina e luz separados. Nos ensaios realizados com ostras desconchadas, os melhores resultados na IFD foram obtidos com as micropartículas. A curcumina nativa, não apresentou efeitos na IFD de ostras desconchadas, possivelmente devido a sua baixa disponibilidade. Mas, com a combinação da solução de micropartículas de curcumina 40 μM e exposição a luz UV-A (2,3 J cm^{-2}), foi possível obter reduções logarítmicas significativas e reduzir a contaminação de ostras desconchadas.

Para as ostras, como produtos frescos, a aplicação da IFD pode ser uma alternativa aos processos térmicos tradicionalmente utilizados para redução da carga microbiana. Além disso, este trabalho serviu como um guia para aplicações futuras da IFD com curcumina em alimentos com alto teor de umidade.

Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram grande potencial de aplicação, para redução da flora natural e aumento da vida útil de ostras. Podendo contribuir para o desenvolvimento de novos produtos, e facilitar a comercialização de ostras, além de contribuir na agregação de valor do produto local.

CAPÍTULO 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo de inativação fotodinâmica para descontaminação de alimentos, sugere-se:

- Usar outras fontes de luz, com comprimento de onda que o pico de emissão mais próximo ao da curcumina;
- Testar novos fotoativadores, de fontes naturais;
- Usar a inativação fotodinâmica para descontaminação de embalagens;
- Avaliar a inativação fotodinâmica para inativação de outros patógenos naturalmente presentes em ostras de Santa Catarina: *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.;
- Avaliar a vida útil das ostras após inativação fotodinâmica combinada com atmosfera modificada.

CAPÍTULO 7 . REFERÊNCIAS

- ABEL, N.; ROTABAKK, B. T.; LERFALL, J. Effect of heat treatment and packaging technology on the microbial load of lightly processed seafood. **LWT**, v. 101, p. 123–129, 1 mar. 2019.
- ADAHOUN, M. A. et al. Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 98–107, 2017.
- AGGARWAL, B. B. et al. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1529–1542, 1 set. 2013.
- AL-ASMARI, F.; MEREDDY, R.; SULTANBAWA, Y. The effect of photosensitization mediated by curcumin on storage life of fresh date (*Phoenix dactylifera* L.) fruit. **Food Control**, v. 93, p. 305–309, 1 nov. 2018.
- AL-NEHLAWI, A. et al. Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks. **Meat Science**, v. 94, n. 1, p. 1–8, 1 maio 2013.
- ALBERT E. GUDAT; ROGER L. FIROR; UTE BOBER. **Better precision, sensitivity, and higher sample throughput for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/Support/Documents/5989-6023EN.pdf>>.
- ALVES, E. et al. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 22, p. 34–57, 1 mar. 2015.
- ANAND, P. et al. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 14 dez. 2007.
- ANDRADE, G. J. P. O. DE. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Revista eletrônica de extensão**, v. 13, p. 2004–2017, 2016.
- ANDREWS, L. S.; PARK, D. L.; CHEN, Y. P. Low temperature pasteurization to reduce the risk of vibrio infections from raw shell-stock oysters. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 9, p. 787–791, 2000.
- ANVISA. **RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007**.
- ASHIE, I. N. A.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Spoilage and Shelf-Life Extension of Fresh Fish and Shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 1–2, p. 87–121, 29 jan. 1996.
- AURUM, F. S.; NGUYEN, L. T. Efficacy of photoactivated curcumin to decontaminate food surfaces under blue light emitting diode. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 3, p. e12988, 4 maio 2019.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 1, p. 73–77, 22 jan. 2013.
- BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative

- approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 202, 13 mar. 2015.
- BAPTISTA, R. C.; RODRIGUES, H.; SANT'ANA, A. S. Consumption, knowledge, and food safety practices of Brazilian seafood consumers. **Food Research International**, v. 132, p. 109084, 1 jun. 2020.
- BHAVYA, M. L.; HEBBAR, H. U. Sono-photodynamic inactivation of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 57, p. 108–115, 1 out. 2019.
- BHAWANA et al. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. . 9 mar. 2011, p. 2056–2061.
- BINBIN, C. et al. Inactivation Effect of Curcumin-Mediated Photodynamic Non-Thermal Sterilization on Bacteria in Oysters. **FOOD SCIENCE**, v. 37, n. 5, p. 46–49, 2016.
- BONIFÁCIO, D. et al. Photodynamic inactivation of Listeria innocua biofilms with food-grade photosensitizers: a curcumin-rich extract of Curcuma longa vs commercial curcumin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 282–294, 1 jul. 2018.
- BONO, G.; BADALUCCO, C. Combining ozone and modified atmosphere packaging (MAP) to maximize shelf-life and quality of striped red mullet (Mullus surmuletus). **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 500–504, 1 jul. 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Riispoa**, p. 1–108, 2017.
- BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 239, DE 26 DE JULHO DE 2018 - Imprensa Nacional. . 27 jul. 2018, p. 1–90.
- BRASIL. **Resolução nº 331, de 23 de dezembro de 2019** Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil, 2019a.
- BRASIL, M. DA S. **Análise epidemiológica dos surtos de Doenças Transmitidas por alimentos no Brasil**. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.
- BROBERG, C. A.; CALDER, T. J.; ORTH, K. Vibrio parahaemolyticus cell biology and pathogenicity determinants. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 992–1001, 1 nov. 2011.
- CABRAL, G. J. **DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA SOLUBILIDADE E DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO EFETIVO DO CO₂ EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL E SIMULAÇÃO DE EMBALAGEM SOB ATMOSFERA MODIFICADA**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- CABRAL, G. J. et al. Modeling microbial growth in Minas Frescal cheese under modified atmosphere packaging. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. e14024, 20 maio 2019.
- CAGLAK, E.; CAKLI, S.; KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (Mytilus galloprovincialis) stored under modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1293–1299, 1 mar. 2008.
- CAMPBELL-PLATT, G. **Food Science and Technology**. 2. ed. [s.l.: s.n.].
- CARVALHO, D. DE M. et al. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 115–119, 2015.
- CAVALHEIRO, D. et al. Processing of Perna perna mussels using integrated process of

- cooking and vacuum cooling. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 192–201, 1 abr. 2013.
- CHAI, T. et al. Effect of heat processing on quality of pasteurized oysters. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1292–1294, set. 1991.
- CHEN, H. et al. Effects of Ozonated Water Treatment on the Microbial Population, Quality, and Shelf Life of Shucked Oysters (*Crassostrea plicatula*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 23, n. 2, p. 175–185, 4 mar. 2014.
- CHEN, H. et al. Bacterial microbiota profile in gills of modified atmosphere-packaged oysters stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 61, p. 58–65, 1 fev. 2017.
- CIDASC. **Instrução Normativa Interministerial N° 7 de 8 de maio de 2012**, 2012. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/Instrucao-Normativa-Interministerial-n-7-_Institui-o-Progr1.pdf>. Acesso em: 4 out. 2019
- COLE, K. M. et al. Suspension of oysters reduces the populations of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 209–213, 1 set. 2015.
- CORTESI, M. L. et al. Innovations in seafood preservation and storage. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. S1, p. 15–23, 8 set. 2009.
- COSSU, A. et al. Fog, phenolic acids and UV-A light irradiation: A new antimicrobial treatment for decontamination of fresh produce. **Food Microbiology**, v. 76, p. 204–208, 1 dez. 2018.
- COSTA, C.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Effective preservation techniques to prolong the shelf life of ready-to-eat oysters. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 13, p. 2661–2667, 2014.
- COSTA, J. C. C. P. **Efeito do Tratamento termoquímico (Óleo essencial e calor) no crescimento microbiano durante a vida útil de mexilhões (*Perna perna*) processados em embalagens flexíveis**. Florianópolis: [s.n.].
- COSTA SOBRINHO, P. DE S. et al. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 137–140, 2011.
- COTON, M. et al. Biodiversity and dynamics of the bacterial community of packaged king scallop (*Pecten maximus*) meat during cold storage. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 99–107, 1 set. 2013.
- CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Fatty acids, volatile compounds and colour changes in high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 54–61, 1 jan. 2008a.
- CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A. L.; KERRY, J. P. Effects of high-pressure and heat treatments on physical and biochemical characteristics of oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 30–38, 2007.
- CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1139–1147, 1 dez. 2008b.
- DALE, N. National research council nutrient requirements of poultry — ninth revised edition (1994). **Journal of Applied Poultry Research**, v. 3, n. 1, p. 101, 1994.
- DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh

fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 305–317, 1 ago. 1995.

DE LIMA, M.; MELO, M. C. L.; MONTEIRO, A. R. Evaluation of the processing of perna perna mussels: The influence of water quality involved in the cooling operations in the physico-chemical and microbiological characteristics of the product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3322–3329, 1 out. 2013.

DE OLIVEIRA, E. F. et al. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 137, p. 86–94, 1 mar. 2018.

DE OLIVEIRA, E. F.; TIKEKAR, R.; NITIN, N. Combination of aerosolized curcumin and UV-A light for the inactivation of bacteria on fresh produce surfaces. **Food Research International**, v. 114, p. 133–139, 1 dez. 2018.

DENG, X. et al. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by antimicrobial photodynamic technology using methylene blue. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 5, p. 1601–1608, 1 mar. 2016.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 231–238, 16 jun. 1998.

DEWITT, C.; OLIVEIRA, A. Modified Atmosphere Systems and Shelf Life Extension of Fish and Fishery Products. **Foods**, v. 5, n. 3, p. 48, 2016.

DONSÍ, F. et al. Preparation of curcumin sub-micrometer dispersions by high-pressure homogenization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2848–2853, 10 mar. 2010.

DOS SANTOS, R. F. et al. Photodynamic inactivation of: *S. aureus* with a water-soluble curcumin salt and an application to cheese decontamination. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2707–2716, 6 nov. 2019.

DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 13 jul. 2011.

DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

ECFF. RECOMMENDATIONS FOR THE PRODUCTION OF PREPACKAGED CHILLED FOOD. p. 88, 2006.

EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2017-2018**. Disponível em: <<http://webdoc.epagri.sc.gov.br/sintese.pdf>>.

ESTEVES, K. et al. Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 21, p. 7600–9, nov. 2015.

FANG, L. et al. Application of chitosan microparticles for reduction of vibrio species in seawater and live oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 2, p. 640–7, 15 jan. 2015.

FAO. World aquaculture 2010. 2010.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 200, 2016.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. **Meeting the sustainable development goals. Rome**, p. 227, 2018.

FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. v. 4, p. 501, 2019a.

FDA. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21.**

France Naissain & Vendée Naissain - Naissains d'huîtres creuses. Disponível em: <<https://www.francenaissain.com/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 1. ed. [s.l: s.n.].

FROELICH, B. A.; NOBLE, R. T. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7454–9, dez. 2014.

GARCIA-GONZALEZ, L. et al. **High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future** *International Journal of Food Microbiology* Elsevier, , 10 jun. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507001584>>. Acesso em: 20 nov. 2018

GERA, M. et al. Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66680–66698, 12 set. 2017.

GLUECK, M. et al. New horizons in microbiological food safety: Photodynamic Decontamination based on a curcumin derivative. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 16, n. 12, p. 1784–1791, 6 dez. 2017.

GOMES, P. R. et al. Síntese e avaliação da atividade antimalárica de compostos derivados da curcumina. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 492–496, 2014.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302–307, 1 maio 2015.

GONG, C. et al. Preservation of sturgeon using a photodynamic non-thermal disinfection technology mediated by curcumin. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100594, 1 ago. 2020.

GOOCH, J. A. et al. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. **Journal of food protection**, v. 65, n. 6, p. 970–4, jun. 2002.

GORRIS, L. G. M.; PEPPELENBOS, H. W. Modified-atmosphere packaging of produce. In: IMPRENSA CRC (Ed.). . **Handbook of Food Preservation**. Wageningen, The Netherlands: Ney York, Basel, 1999. p. 890.

GOULAS, A. E. et al. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 752–760, 1 mar. 2005.

GRAM, L.; DALGAARD, P. **Fish spoilage bacteria - Problems and solutions** *Current Opinion in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2002.

GREER, A.; NG, V.; FISMAN, D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 178, n. 6, p. 715–22, 11 mar. 2008.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials • Microbial systems biology. v. 33, p. 67–73, out. 2016.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. **Fish health aspects in grouper aquaculture** Elsevier, , 19 out. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611005850>>. Acesso em: 20 nov. 2018

HATTAWAY, M. A. **Sensory quality of Mississippi Gulf oysters (*Crassostrea virginica*) following x-ray and cobalt-60 processing**. [s.l.] Mississippi State University, 2006.

HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, p. 666–673, 2009.

HE, H. et al. Use of High-pressure Processing for Oyster Shucking and Shelf-life Extension. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 640–645, 1 mar. 2002.

HICKS, D. T. Seafood Safety and Quality: The Consumer's Role. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 5, n. 4, 28 out. 2016.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of high pressure homogenization on physicochemical properties of curcumin nanoparticles prepared by antisolvent crystallization using HPMC or PVP. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 185–196, 1 maio 2019.

HSU, K.-C. et al. Effect of different high pressure treatments on shucking, biochemical, physical and sensory characteristics of oysters to elaborate a traditional Taiwanese oyster omelette. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 3, p. n/a-n/a, 1 fev. 2009.

HU, J. et al. The effects of photodynamically activated curcumin on the preservation of low alum treated ready-to-eat jellyfish. **LWT**, v. 115, p. 108443, 1 nov. 2019.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/T1768P/T1768P00.htm#TOC>>. Acesso em: 16 jun. 2019a.

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v. 8, n. 2, p. 91–98, 1 abr. 1997b.

JAKOBSEN, M. BERTELSEN, G. The use of CO₂ in packaging of fresh red meats and its effect on chemical on chemical quality changes in the meat: a review. **Journal of Muscle Foods**, v. 13, n. 2, p. 143–168, 1 jun. 2002.

JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified by semihard cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 3, p. 285–290, 1 jun. 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JEENGER, M. K. et al. Curcumin: A pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 276–282, 1 fev. 2015.

JIA, J. et al. Controlled morphology and size of curcumin using ultrasound in supercritical CO₂ antisolvent. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 27, p. 389–94, 2015.

JIANG, Y. et al. Photodynamic action of LED-activated curcumin against staphylococcus aureus involving intracellular ROS increase and membrane damage. **International Journal of Photoenergy**, v. 2014, p. 9–11, 14 maio 2014.

JONES, J. L. et al. Effects of ambient exposure, refrigeration, and icing on *Vibrio vulnificus*

and *Vibrio parahaemolyticus* abundances in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 253, p. 54–58, 17 jul. 2017.

JORI, G. Photodynamic Therapy of Microbial Infections: State of the Art and Perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1–2, p. 505–520, 2006.

JOSEWIN, S. W. et al. Antibacterial effect of 460 nm light-emitting diode in combination with riboflavin against *Listeria monocytogenes* on smoked salmon. **Food Control**, v. 84, p. 354–361, 1 fev. 2018.

KAKRAN, M. et al. Preparation of nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 3, p. 757, 10 mar. 2012.

KARAVAS, E. et al. Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1–2, p. 76–83, 1 ago. 2007.

KASHEF, N.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. **Nanophotonics**, v. 6, n. 5, p. 853–879, ago. 2017.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. BAM: *Vibrio*. **Bacteriological Analytical Manual**, n. May, p. 1–17, 2004.

KAZEMI, S.; NGADI, M. O.; GARIÉPY, C. Protein Denaturation in Pork Longissimus Muscle of Different Quality Groups. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 102–106, 19 jan. 2011.

KILLEFFER, D. H. Carbon Dioxide Preservation of Meat and Fish. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 140–143, fev. 1930.

KIM, S. R. et al. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and generic *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 52–61, 15 ago. 2007.

KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2 set. 2017.

KOOP, B. L. et al. Vacuum curcumin infusion in cooked oysters (*Crassostrea gigas*) to increase their shelf life. **Journal of Food Process Engineering**, 22 ago. 2019.

LEE, H.; KIM, J. E.; MIN, S. C. Quantitative risk assessments of the effect of an edible defatted soybean meal-based antimicrobial film on the survival of *Salmonella* on ham. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 30–38, 1 ago. 2015.

LEE, W.-H. et al. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 4, p. 338–78, jul. 2013.

LEKJING, S.; KARRILA, S.; SIRIPONGVUTIKORN, S. Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Whole Oysters (*Crassostrea belcheri*) and Pasteurization Effects on Meat Quality. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 9, p. 1107–1120, 21 out. 2017.

- LEKJING, S.; VENKATACHALAM, K. Effects of Modified Atmospheric Packaging Conditions on the Quality Changes of Pasteurized Oyster (*Crassostrea belcheri*) Meat during Chilled Storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 10, p. 1106–1119, 26 nov. 2018.
- LIMA, M. DE. **APLICAÇÃO DO CO₂ PARA AUMENTO DA VIDA ÚTIL DE MEXILHÃO *Perna perna* (L) e *Mytilus edulis*: PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO SOB ATMOSFERA MODIFICADA ATIVA**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- LIMA, M. DE et al. Mussel (*Perna perna*) Processing by an Alternative Method and Packaging Under Modified Atmosphere to Improve Physicochemical and Microbiological Characteristics. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, p. e12923, 1 jun. 2017.
- LIMA, M. et al. Application of CO₂ in *Perna perna* Mussel: Evaluation of Absorption Mechanism During Soluble Gas Stabilization (SGS) Process. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 2, p. 250–257, 27 jun. 2015.
- LIN, Y. et al. Curcumin-Based Photodynamic Sterilization for Preservation of Fresh-Cut Hami Melon. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2374, 27 jun. 2019.
- LINGHAM, T. et al. Effects of High Hydrostatic Pressure on the Physical, Microbial, and Chemical Attributes of Oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food Science**, v. 81, n. 5, p. M1158–M1166, 1 maio 2016.
- LIU, F. et al. The effect of a novel photodynamic activation method mediated by curcumin on oyster shelf life and quality. **Food Research International**, v. 87, p. 204–210, 2016.
- LIU, Z.; YANG, L. Antisolvent precipitation for the preparation of high polymeric procyanidin nanoparticles under ultrasonication and evaluation of their antioxidant activity in vitro. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 43, p. 208–218, 1 maio 2018.
- LUKSIENE, Z.; BROVKO, L. Antibacterial Photosensitization-Based Treatment for Food Safety. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 4, p. 185–199, 17 dez. 2013.
- LUKSIENĖ, Z.; ZUKAUSKAS, A. Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1415–1424, 1 nov. 2009.
- MACLEAN, M. et al. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1932–7, 1 abr. 2009.
- MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1–2, p. 107–113, 30 jan. 2002.
- MAHMOOD, K. et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877–890, 1 nov. 2015.
- MAÑAS, P.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1387–1399, 2005.
- MANTILLA, S. P. S. et al. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 437–448, 2010.
- MARTÍNEZ, M. A. et al. Effects of high pressure processing on protein fractions of blue crab

- (*Callinectes sapidus*) meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 323–329, 1 jun. 2017.
- MASNIYOM, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 8, p. 873–880, 1 jun. 2002.
- MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Extending the shelf-life of refrigerated green mussel (*Perna viridis*) under modified atmosphere packaging. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 171–179, 2011.
- MATOS, K. H. O. DE et al. Effect of supercritical carbon dioxide processing on *Vibrio parahaemolyticus* in nutrient broth and in oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 10, p. 4090–4098, 11 out. 2018.
- MCMULLEN, L. M.; STILES, M. E. Quality of fresh retail pork cuts stored in modified atmosphere under temperature conditions simulating export to distant markets. **Meat Science**, v. 38, n. 2, p. 163–177, 1 jan. 1994.
- MEISEL, P.; KOCHER, T. **Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art** **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** Elsevier, , 13 maio 2005.
- MENDES, R. et al. Effect of CO₂ dissolution on the shelf life of ready-to-eat Octopus vulgaris. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 551–561, 2011.
- MENDES, R.; GONÇALVES, A. Effect of soluble CO₂ stabilisation and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1678–1687, 2008a.
- MENDES, R.; GONÇALVES, A. Effect of soluble CO₂ stabilization on the quality of fillets from farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n. 4, p. 342–366, 2008b.
- MENDES, R.; PESTANA, C.; GONÇALVES, A. The effects of soluble gas stabilisation on the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 11, p. 2000–2009, 1 nov. 2008.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 1 mar. 2001.
- MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- MONDOULET, L. et al. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4547–4553, 1 jun. 2005.
- MUKHOPADHYAY, A. et al. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents and actions**, v. 12, n. 4, p. 508–15, out. 1982.
- NASCIMENTO DA SILVA, M. et al. Physical and morphological properties of hydroxypropyl methylcellulose films with curcumin polymorphs. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105217, 1 dez. 2019.
- ODEYEMI, O. A. et al. Spoilage microbial community profiling by 16S rRNA amplicon sequencing of modified atmosphere packaged live mussels stored at 4°C. **Food Research**

International, v. 121, p. 568–576, 1 jul. 2019.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 805–816, 1 jun. 2011.

OLIVEIRA, T. C.; LIMA, S. L.; BRESSAN, J. Influences of different thermal processings in milk, bovine meat and frog protein structure. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, p. 896–902, 2013.

PANDEY, K.; CHATTE, A.; DALVI, S. Continuous production of aqueous suspensions of ultra-fine particles of curcumin using ultrasonically driven mixing device. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 6, p. 608–619, 3 jul. 2018.

PANDIT, R. S. et al. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 991–997, 7 dez. 2015.

PARDÍO-SEDAS, V. Influence of Ozone Depuration on the Physical Properties of Fresh American oysters (*Crassostrea virginica*). **Processing and Impact on Active Components in Food**, p. 455–461, 1 jan. 2015.

PAREJO, C. B. **MOLUSCOS TECNOLOGIA DE CULTIVO**. Madri: [s.n.].

PARK, J. W.; LANIER, T. C. Combined Effects of Phosphates and Sugar or Polyol on Protein Stabilization of Fish Myofibrils. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1509–1513, nov. 1987.

PARK, J. W.; LANIER, T. C. Scanning Calorimetric Behavior of Tilapia Myosin and Actin due to Processing of Muscle and Protein Purification. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 49–51, jan. 1989.

PARK, S. J.; JEON, S. Y.; YEO, S. DO. Recrystallization of a pharmaceutical compound using liquid and supercritical antisolvents. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 7, p. 2287–2293, 2006.

PARK, S. Y.; CHUNG, M.-S.; HA, S.-D. Combined effect of sodium hypochlorite and gamma-irradiation for the control of *Vibrio vulnificus* in fresh oyster and clam. **LWT**, v. 91, p. 568–572, 1 maio 2018.

PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against streptococcus mutans in a planktonic culture. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 313–319, 1 set. 2013.

PENHA, C. B. et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 198–202, 1 mar. 2017.

PERNI, S. et al. **Nanoparticles: Their potential use in antibacterial photodynamic therapy** *Photochemical and Photobiological Sciences* Royal Society of Chemistry, , 1 maio 2011.

PRASAD, R.; PATSARIYA, R.; DALVI, S. V. Precipitation of curcumin by pressure reduction of CO₂-expanded acetone. **Powder Technology**, v. 310, p. 143–153, 2017.

PREIS, E. et al. Spray dried curcumin loaded nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 531–539, 1 set. 2019.

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 1 jun. 2009.

- PUDIPEDDI, M.; SERAJUDDIN, A. T. M. **Trends in solubility of polymorphs** *Journal of Pharmaceutical Sciences* John Wiley and Sons Inc., , 2005.
- RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na baía sul.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- RAMOS, R. J. et al. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 29–37, 2010.
- RAMOS, R. J. et al. Occurrence of *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 3, p. 478–484, 2012.
- RAMOS, R. J. et al. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 327–333, 2014.
- RANDAZZO, W.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Curcumin-Mediated Photodynamic Inactivation of Norovirus Surrogates. **Food and Environmental Virology**, v. 8, n. 4, p. 244–250, 1 dez. 2016.
- RASZL, S. M. et al. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1201–1222, 1 nov. 2016.
- REZUSTA, A. et al. In Vitro Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 613–619, maio 2012.
- RIBEIRO, A. P. D. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 391–398, fev. 2013.
- RIOS, E. **Seashells Of Brazil.** [s.l: s.n.].
- RISTORI, C. A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 17, n. 4, p. 259–269, ago. 2007.
- ROBLERO-BARTOLÓN, G. V.; RAMÓN-GALLEGOS, E. Use of nanoparticles (NP) in photodynamic therapy (PDT) against cancer. **Gaceta medica de Mexico**, v. 151, n. 1, p. 85–98, 2015.
- RONG, C. et al. Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). v. 11, n. 1, p. 108–112, 1 jan. 2010.
- RONHOLM, J.; LAU, F.; BANERJEE, S. K. **Emerging seafood preservation techniques to extend freshness and minimize *Vibrio* contamination** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media SA, , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047466>>. Acesso em: 20 nov. 2018
- ROTABAKK, B. T. et al. Effect of Modified Atmosphere Packaging and Soluble Gas Stabilization on the Shelf Life of Skinless Chicken Breast Fillets. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. S124–S131, 31 maio 2006.
- ROTABAKK, B. T. et al. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science**

and Technology International, v. 14, n. 2, p. 179–186, 2008.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 43–50, 1 set. 2007.

ROTABAKK, B. T.; SIVERTSVIK, M. **Solubility of carbon dioxide in muscle foods and its use to extend the shelf life of packaged products**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2012.

SANTOS, A. A. DOS; MARCHIORI, N. DA C.; GIUSTINA, E. G. DELLA. Sintese informativa da maricultura 2016. **Sintese informativa da maricultura 2016**, p. 3, 2016.

SHRIVER, S. K.; YANG, W. W. **Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen Control** **Food Engineering Reviews** Springer, , 29 mar. 2011.

SILVA, A. C. DA et al. Production and characterization of curcumin microcrystals and evaluation of the antimicrobial and sensory aspects in minimally processed carrots. **Food & Function**, v. 8, n. 5, p. 1851–1858, 24 maio 2017.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO₂ in MAP systems: Advances for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 2, p. 233–239, 1 maio 2009.

SIVERTSVIK, M. et al. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 3, p. 449–458, 1 fev. 2003.

SIVERTSVIK, M. et al. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods: Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 3, p. 449–458, 1 fev. 2004.

SIVERTSVIK, M. The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and 37 ml/100 ml carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 430–438, 1 abr. 2007.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilisation, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). 2006.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; ROSNES, J. T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 107–127, 1 fev. 2002.

SIVERTSVIK, M.; JENSEN, J. S. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 3: Cooked meat products. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 499–505, 2005.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 4, p. 451–458, 2004.

SKIPNES, D. et al. Heat transfer in vacuum packed mussels (*Mytilus edulis*) during thermal processing. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 11, n. 3–4, p. 5–19, 2002.

SOARES, F. Crescimento e Qualidade microbiológica das ostras produzidas em cultivos multitróficos versus monocultivos. p. 101, 2015.

SOARES, L. S. et al. Evaluation of CO₂ absorption and desorption rate in oysters (*Cassostrea gigas*) using the soluble gas stabilisation method. **International Journal of Food Science &**

Technology, v. 50, n. 5, p. 1089–1094, 1 maio 2015.

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Science**, v. 52, n. 2, p. 157–164, 1 jun. 1999.

SOUZA, R. V. et al. Moluscos bivalves Medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia. **Epagri documentos**, p. 1–48, abr. 2014.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 108–20, ago. 2013.

STORMO, S. K. et al. Modeling-assisted minimal heat processing of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 6, p. e12555, 1 dez. 2017.

STORMO, S. K. et al. In-Pack Surface Pasteurization of Capture-Based, Pre-Rigor Filleted Atlantic Cod (*Gadus morhua*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 7, p. 783–794, 9 ago. 2018.

TACK, D. M. et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016-2019. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 17, p. 509–514, 1 maio 2020.

TAO, R. et al. Effects of curcumin-based photodynamic treatment on the storage quality of fresh-cut apples. **Food Chemistry**, v. 274, p. 415–421, 15 fev. 2019.

TEIXEIRA, Â. M.; BEIRÃO, L. H. Efeitos de agentes crioprotetores na capacidade de retenção de água em pasta de pescado utilizando-se a técnica de análise de superfície de resposta. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 1, 1999.

TEMBA, B. A. et al. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. **Food Control**, v. 59, p. 708–713, 1 jan. 2016.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Solid-state phase transformations and storage stability of curcumin polymorphs. **Crystal Growth and Design**, v. 15, n. 4, p. 1757–1770, 1 abr. 2015.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Particle formation pathways and polymorphism of curcumin induced by ultrasound and additives during liquid antisolvent precipitation. **CrystEngComm**, v. 16, n. 48, p. 11102–11114, 28 dez. 2014.

THUPILA, N.; RATANA-ARPORN, P.; WILAI PUN, P. Radiation resistances and decontamination of common pathogenic bacteria contaminated in white scar oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 828–832, 1 jul. 2011.

TORTIK, N.; SPAETH, A.; PLAETZER, K. Photodynamic decontamination of foodstuff from *Staphylococcus aureus* based on novel formulations of curcumin. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 13, n. 10, p. 1402–9, out. 2014.

TOSATI, J. V. et al. Light-activated antimicrobial activity of turmeric residue edible coatings against cross-contamination of *Listeria innocua* on sausages. **Food Control**, v. 84, p. 177–185, 1 fev. 2018.

- TRABAL FERNÁNDEZ, N. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis* , *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 1, p. 69–83, 1 abr. 2014.
- TRAMONTE, V. L. C. G.; PARISENTI, J.; FACCIN, G. Composicao nutricional de ostras, in natura e cozidas, coletadas em diferentes estacoes do ano, na cidade de Florianopolis, SC. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 31–34, 2005.
- TSIRONI, T. N.; TAOUKIS, P. S. Modeling microbial spoilage and quality of gilthead seabream fillets: Combined effect of osmotic pretreatment, modified atmosphere packaging, and nisin on shelf life. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. M243–M251, 24 mar. 2010.
- US FDA. **Generally recognized as safe (GRAS) status of curcumin: GRN number 460.**
- VALEH-E-SHEYDA, P. et al. An insight on reducing the particle size of poorly-water soluble curcumin via LASP in microchannels. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 91, p. 78–88, 1 maio 2015.
- WANG, L. et al. Effects of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on Microbial Flora and Shelf-life of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during Controlled Freezing-point Storage at -0.8°C . **Food Science and Technology Research**, v. 20, n. 6, p. 1141–1152, 2014.
- WOLFE, S. K. Use of CO and CO₂ enriched atmosphere for meats, fish, and produce. **Food Technol**, v. 34, p. 55–58, 1980.
- WU, J. et al. Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 385–392, 1 set. 2015.
- WU, J. et al. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 34–39, 2016.
- XI, D.; LIU, C.; SU, Y.-C. Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 368–373, 1 maio 2012.
- XIE, M. BIN et al. Solubility enhancement of curcumin via supercritical CO₂ based silk fibroin carrier. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 1–9, 2015a.
- XIE, M. et al. Nano-curcumin prepared via supercritical: Improved anti-bacterial, anti-oxidant and anti-cancer efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 732–740, 2015b.
- YADAV, D.; KUMAR, N. Nanonization of curcumin by antisolvent precipitation: Process development, characterization, freeze drying and stability performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 564–577, 30 dez. 2014.
- YADZIR, Z. H. M. et al. Tropomyosin, the major tropical oyster *Crassostrea belcheri* allergen and effect of cooking on its allergenicity. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 11, n. 1, p. 30, 2015.
- YAO, C. et al. Relationship between membrane damage, leakage of intracellular compounds, and inactivation of *Escherichia coli* treated by pressurized CO₂. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 858–865, 1 ago. 2014.
- YE, M. et al. Effects of High-Hydrostatic Pressure on Inactivation of Human Norovirus and Physical and Sensory Characteristics of Oysters. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p.

M1330–M1335, 1 jun. 2015.

YEN, F.-L. L. et al. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7376–7382, 23 jun. 2010.

YU, T.; CHEN, Y. Effects of elevated carbon dioxide on environmental microbes and its mechanisms: A review. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 865–879, 2019.

ZHANG, J. et al. Effect of cooking temperatures on protein hydrolysates and sensory quality in crucian carp (*Carassius auratus*) soup. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 542–548, 27 jun. 2013.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. **Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future** *Advanced Drug Delivery Reviews* Elsevier, , 1 jan. 2013.

ZHAO, F. et al. New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 induced by high-pressure CO₂. **mBio**, v. 7, n. 4, 1 jul. 2016.

ZHAO, Y.; WELLS, J. H.; MCMILLIN, K. Dynamic Changes of Headspace Gases in CO₂ and N₂ Packaged Fresh Beef. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 571–575, 1 maio 1995.

ZHAO, Z. et al. Formation of curcumin nanoparticles via solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3171–3181, 2015.

ABEL, N.; ROTABAKK, B. T.; LERFALL, J. Effect of heat treatment and packaging technology on the microbial load of lightly processed seafood. **LWT**, v. 101, p. 123–129, 1 mar. 2019.

ADAHOUN, M. A. et al. Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 98–107, 2017.

AGGARWAL, B. B. et al. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 9, p. 1529–1542, 1 set. 2013.

AL-ASMARI, F.; MEREDDY, R.; SULTANBAWA, Y. The effect of photosensitization mediated by curcumin on storage life of fresh date (*Phoenix dactylifera* L.) fruit. **Food Control**, v. 93, p. 305–309, 1 nov. 2018.

AL-NEHLAWI, A. et al. Effect of high carbon dioxide atmosphere packaging and soluble gas stabilization pre-treatment on the shelf-life and quality of chicken drumsticks. **Meat Science**, v. 94, n. 1, p. 1–8, 1 maio 2013.

ALBERT E. GUDAT; ROGER L. FIROR; UTE BOBER. **Better precision, sensitivity, and higher sample throughput for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/Support/Documents/5989-6023EN.pdf>>.

ALVES, E. et al. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 22, p. 34–57, 1 mar. 2015.

ANAND, P. et al. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 14 dez. 2007.

ANDRADE, G. J. P. O. DE. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Resvista eletrônica de extensão**, v. 13, p. 2004–2017, 2016.

ANDREWS, L. S.; PARK, D. L.; CHEN, Y. P. Low temperature pasteurization to reduce the risk of vibrio infections from raw shell-stock oysters. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 9, p. 787–791, 2000.

ANVISA. **RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007**.

ASHIE, I. N. A.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Spoilage and Shelf-Life Extension of Fresh Fish and Shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 1–2, p. 87–121, 29 jan. 1996.

AURUM, F. S.; NGUYEN, L. T. Efficacy of photoactivated curcumin to decontaminate food surfaces under blue light emitting diode. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 3, p. e12988, 4 maio 2019.

BAKER-AUSTIN, C. et al. Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 1, p. 73–77, 22 jan. 2013.

BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 202, 13 mar. 2015.

BAPTISTA, R. C.; RODRIGUES, H.; SANT’ANA, A. S. Consumption, knowledge, and food safety practices of Brazilian seafood consumers. **Food Research International**, v. 132, p. 109084, 1 jun. 2020.

BHAVYA, M. L.; HEBBAR, H. U. Sono-photodynamic inactivation of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 57, p. 108–115, 1 out. 2019.

BHAWANA et al. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. . 9 mar. 2011, p. 2056–2061.

BINBIN, C. et al. Inactivation Effect of Curcumin-Mediated Photodynamic Non-Thermal Sterilization on Bacteria in Oysters. **FOOD SCIENCE**, v. 37, n. 5, p. 46–49, 2016.

BONIFÁCIO, D. et al. Photodynamic inactivation of Listeria innocua biofilms with food-grade photosensitizers: a curcumin-rich extract of Curcuma longa vs commercial curcumin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 282–294, 1 jul. 2018.

BONO, G.; BADALUCCO, C. Combining ozone and modified atmosphere packaging (MAP) to maximize shelf-life and quality of striped red mullet (*Mullus surmuletus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 500–504, 1 jul. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Riispoa**, p. 1–108, 2017.

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 239, DE 26 DE JULHO DE 2018 - Imprensa Nacional. . 27 jul. 2018, p. 1–90.

BRASIL. **Resolução nº 331, de 23 de dezembro de 2019** Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil, 2019a.

BRASIL, M. DA S. **Análise epidemiológica dos surtos de Doenças Transmitidas por alimentos no Brasil**. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

BROBERG, C. A.; CALDER, T. J.; ORTH, K. Vibrio parahaemolyticus cell biology and

pathogenicity determinants. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 992–1001, 1 nov. 2011.

CABRAL, G. J. **DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA SOLUBILIDADE E DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO EFETIVO DO CO₂ EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL E SIMULAÇÃO DE EMBALAGEM SOB ATMOSFERA MODIFICADA**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

CABRAL, G. J. et al. Modeling microbial growth in Minas Frescal cheese under modified atmosphere packaging. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. e14024, 20 maio 2019.

CAGLAK, E.; CAKLI, S.; KILINC, B. Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1293–1299, 1 mar. 2008.

CAMPBELL-PLATT, G. **Food Science and Technology**. 2. ed. [s.l.: s.n.].

CARVALHO, D. DE M. et al. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 115–119, 2015.

CAVALHEIRO, D. et al. Processing of *Perna perna* mussels using integrated process of cooking and vacuum cooling. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 192–201, 1 abr. 2013.

CHAI, T. et al. Effect of heat processing on quality of pasteurized oysters. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1292–1294, set. 1991.

CHEN, H. et al. Effects of Ozonated Water Treatment on the Microbial Population, Quality, and Shelf Life of Shucked Oysters (*Crassostrea plicatula*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 23, n. 2, p. 175–185, 4 mar. 2014.

CHEN, H. et al. Bacterial microbiota profile in gills of modified atmosphere-packaged oysters stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 61, p. 58–65, 1 fev. 2017.

CIDASC. **Instrução Normativa Interministerial N° 7 de 8 de maio de 2012**, 2012. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/Instrução-Normativa-Interministerial-n-7-_Institui-o-Progr1.pdf>. Acesso em: 4 out. 2019

COLE, K. M. et al. Suspension of oysters reduces the populations of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 209–213, 1 set. 2015.

CORTESI, M. L. et al. Innovations in seafood preservation and storage. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. S1, p. 15–23, 8 set. 2009.

COSSU, A. et al. Fog, phenolic acids and UV-A light irradiation: A new antimicrobial treatment for decontamination of fresh produce. **Food Microbiology**, v. 76, p. 204–208, 1 dez. 2018.

COSTA, C.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Effective preservation techniques to prolong the shelf life of ready-to-eat oysters. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 13, p. 2661–2667, 2014.

COSTA, J. C. C. P. **Efeito do Tratamento termoquímico (Óleo essencial e calor) no crescimento microbiano durante a vida útil de mexilhões (*Perna perna*) processados em embalagens flexíveis**. Florianópolis: [s.n.].

COSTA SOBRINHO, P. DE S. et al. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus*

- in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 137–140, 2011.
- COTON, M. et al. Biodiversity and dynamics of the bacterial community of packaged king scallop (*Pecten maximus*) meat during cold storage. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 99–107, 1 set. 2013.
- CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Fatty acids, volatile compounds and colour changes in high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 54–61, 1 jan. 2008a.
- CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A. L.; KERRY, J. P. Effects of high-pressure and heat treatments on physical and biochemical characteristics of oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 30–38, 2007.
- CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1139–1147, 1 dez. 2008b.
- DALE, N. National research council nutrient requirements of poultry — ninth revised edition (1994). **Journal of Applied Poultry Research**, v. 3, n. 1, p. 101, 1994.
- DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 305–317, 1 ago. 1995.
- DE LIMA, M.; MELO, M. C. L.; MONTEIRO, A. R. Evaluation of the processing of perna perna mussels: The influence of water quality involved in the cooling operations in the physicochemical and microbiological characteristics of the product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3322–3329, 1 out. 2013.
- DE OLIVEIRA, E. F. et al. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 137, p. 86–94, 1 mar. 2018.
- DE OLIVEIRA, E. F.; TIKEKAR, R.; NITIN, N. Combination of aerosolized curcumin and UV-A light for the inactivation of bacteria on fresh produce surfaces. **Food Research International**, v. 114, p. 133–139, 1 dez. 2018.
- DENG, X. et al. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by antimicrobial photodynamic technology using methylene blue. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 5, p. 1601–1608, 1 mar. 2016.
- DEVLEIGHIERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 231–238, 16 jun. 1998.
- DEWITT, C.; OLIVEIRA, A. Modified Atmosphere Systems and Shelf Life Extension of Fish and Fishery Products. **Foods**, v. 5, n. 3, p. 48, 2016.
- DONSÍ, F. et al. Preparation of curcumin sub-micrometer dispersions by high-pressure homogenization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2848–2853, 10 mar. 2010.
- DOS SANTOS, R. F. et al. Photodynamic inactivation of: *S. aureus* with a water-soluble curcumin salt and an application to cheese decontamination. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2707–2716, 6 nov. 2019.
- DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 13 jul. 2011.

- DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.
- ECFF. RECOMMENDATIONS FOR THE PRODUCTION OF PREPACKAGED CHILLED FOOD. p. 88, 2006.
- EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2017-2018**. Disponível em: <<http://webdoc.epagri.sc.gov.br/sintese.pdf>>.
- ESTEVES, K. et al. Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 21, p. 7600–9, nov. 2015.
- FANG, L. et al. Application of chitosan microparticles for reduction of vibrio species in seawater and live oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 2, p. 640–7, 15 jan. 2015.
- FAO. World aquaculture 2010. 2010.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 200, 2016.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. **Meeting the sustainable development goals. Rome**, p. 227, 2018.
- FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. v. 4, p. 501, 2019a.
- FDA. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**.
- France Naissain & Vendée Naissain - Naissains d’huîtres creuses. Disponível em: <<https://www.francenaissain.com/>>. Acesso em: 28 out. 2019.
- FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 1. ed. [s.l.: s.n.].
- FROELICH, B. A.; NOBLE, R. T. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7454–9, dez. 2014.
- GARCIA-GONZALEZ, L. et al. **High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future** *International Journal of Food Microbiology* Elsevier, , 10 jun. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507001584>>. Acesso em: 20 nov. 2018
- GERA, M. et al. Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66680–66698, 12 set. 2017.
- GLUECK, M. et al. New horizons in microbiological food safety: Photodynamic Decontamination based on a curcumin derivative. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 16, n. 12, p. 1784–1791, 6 dez. 2017.
- GOMES, P. R. et al. Síntese e avaliação da atividade antimalárica de compostos derivados da curcumina. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 492–496, 2014.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302–307, 1 maio 2015.

- GONG, C. et al. Preservation of sturgeon using a photodynamic non-thermal disinfection technology mediated by curcumin. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100594, 1 ago. 2020.
- GOOCH, J. A. et al. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. **Journal of food protection**, v. 65, n. 6, p. 970–4, jun. 2002.
- GORRIS, L. G. M.; PEPPELENBOS, H. W. Modified-atmosphere packaging of produce. In: IMPRENSA CRC (Ed.). . **Handbook of Food Preservation**. Wageningen, The Netherlands: Ney York, Basel, 1999. p. 890.
- GOULAS, A. E. et al. Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 752–760, 1 mar. 2005.
- GRAM, L.; DALGAARD, P. **Fish spoilage bacteria - Problems and solutions** **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2002.
- GREER, A.; NG, V.; FISMAN, D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 178, n. 6, p. 715–22, 11 mar. 2008.
- HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials • Microbial systems biology. v. 33, p. 67–73, out. 2016.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. **Fish health aspects in grouper aquaculture** **Aquaculture** Elsevier, , 19 out. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611005850>>. Acesso em: 20 nov. 2018
- HATTAWAY, M. A. **Sensory quality of Mississippi Gulf oysters (*Crassostrea virginica*) following x-ray and cobalt-60 processing**. [s.l.] Mississippi State University, 2006.
- HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, p. 666–673, 2009.
- HE, H. et al. Use of High-pressure Processing for Oyster Shucking and Shelf-life Extension. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 640–645, 1 mar. 2002.
- HICKS, D. T. Seafood Safety and Quality: The Consumer's Role. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 5, n. 4, 28 out. 2016.
- HOMAYOUNI, A. et al. Effect of high pressure homogenization on physicochemical properties of curcumin nanoparticles prepared by antisolvent crystallization using HPMC or PVP. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 185–196, 1 maio 2019.
- HSU, K.-C. et al. Effect of different high pressure treatments on shucking, biochemical, physical and sensory characteristics of oysters to elaborate a traditional Taiwanese oyster omelette. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 3, p. n/a-n/a, 1 fev. 2009.
- HU, J. et al. The effects of photodynamically activated curcumin on the preservation of low alum treated ready-to-eat jellyfish. **LWT**, v. 115, p. 108443, 1 nov. 2019.
- HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/T1768P/T1768P00.htm#TOC>>. Acesso em: 16 jun. 2019a.
- HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v. 8, n. 2, p. 91–98, 1 abr. 1997b.

- JAKOBSEN, M. BERTELSEN, G. The use of CO₂ in packaging of fresh red meats and its effect on chemical on chemical quality changes in the meat: a review. **Journal of Muscle Foods**, v. 13, n. 2, p. 143–168, 1 jun. 2002.
- JAKOBSEN, M.; RISBO, J. Carbon dioxide equilibrium between product and gas phase of modified atmosphere packaging systems: Exemplified by semihard cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 3, p. 285–290, 1 jun. 2009.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JEENGER, M. K. et al. Curcumin: A pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 276–282, 1 fev. 2015.
- JIA, J. et al. Controlled morphology and size of curcumin using ultrasound in supercritical CO₂ antisolvent. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 27, p. 389–94, 2015.
- JIANG, Y. et al. Photodynamic action of LED-activated curcumin against staphylococcus aureus involving intracellular ROS increase and membrane damage. **International Journal of Photoenergy**, v. 2014, p. 9–11, 14 maio 2014.
- JONES, J. L. et al. Effects of ambient exposure, refrigeration, and icing on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* abundances in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 253, p. 54–58, 17 jul. 2017.
- JORI, G. Photodynamic Therapy of Microbial Infections: State of the Art and Perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1–2, p. 505–520, 2006.
- JOSEWIN, S. W. et al. Antibacterial effect of 460 nm light-emitting diode in combination with riboflavin against *Listeria monocytogenes* on smoked salmon. **Food Control**, v. 84, p. 354–361, 1 fev. 2018.
- KAKRAN, M. et al. Preparation of nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 3, p. 757, 10 mar. 2012.
- KARAVAS, E. et al. Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1–2, p. 76–83, 1 ago. 2007.
- KASHEF, N.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. **Nanophotonics**, v. 6, n. 5, p. 853–879, ago. 2017.
- KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. BAM: *Vibrio*. **Bacteriological Analytical Manual**, n. May, p. 1–17, 2004.
- KAZEMI, S.; NGADI, M. O.; GARIÉPY, C. Protein Denaturation in Pork Longissimus Muscle of Different Quality Groups. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 102–106, 19 jan. 2011.
- KILLEFFER, D. H. Carbon Dioxide Preservation of Meat and Fish. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 140–143, fev. 1930.
- KIM, S. R. et al. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and generic *Escherichia coli* by supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 118, n. 1, p. 52–61, 15 ago. 2007.

KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2 set. 2017.

KOOP, B. L. et al. Vacuum curcumin infusion in cooked oysters (*Crassostrea gigas*) to increase their shelf life. **Journal of Food Process Engineering**, 22 ago. 2019.

LEE, H.; KIM, J. E.; MIN, S. C. Quantitative risk assessments of the effect of an edible defatted soybean meal-based antimicrobial film on the survival of *Salmonella* on ham. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 30–38, 1 ago. 2015.

LEE, W.-H. et al. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 4, p. 338–78, jul. 2013.

LEKJING, S.; KARRILA, S.; SIRIPONGVUTIKORN, S. Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Whole Oysters (*Crassostrea belcheri*) and Pasteurization Effects on Meat Quality. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 9, p. 1107–1120, 21 out. 2017.

LEKJING, S.; VENKATACHALAM, K. Effects of Modified Atmospheric Packaging Conditions on the Quality Changes of Pasteurized Oyster (*Crassostrea belcheri*) Meat during Chilled Storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 10, p. 1106–1119, 26 nov. 2018.

LIMA, M. DE. **APLICAÇÃO DO CO₂ PARA AUMENTO DA VIDA ÚTIL DE MEXILHÃO *Perna perna* (L) e *Mytillus edulis*: PROCESSO DE PRÉ-SOLUBILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO SOB ATMOSFERA MODIFICADA ATIVA**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

LIMA, M. DE et al. Mussel (*Perna perna*) Processing by an Alternative Method and Packaging Under Modified Atmosphere to Improve Physicochemical and Microbiological Characteristics. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, p. e12923, 1 jun. 2017.

LIMA, M. et al. Application of CO₂ in *Perna perna* Mussel: Evaluation of Absorption Mechanism During Soluble Gas Stabilization (SGS) Process. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 2, p. 250–257, 27 jun. 2015.

LIN, Y. et al. Curcumin-Based Photodynamic Sterilization for Preservation of Fresh-Cut Hami Melon. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2374, 27 jun. 2019.

LINGHAM, T. et al. Effects of High Hydrostatic Pressure on the Physical, Microbial, and Chemical Attributes of Oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food Science**, v. 81, n. 5, p. M1158–M1166, 1 maio 2016.

LIU, F. et al. The effect of a novel photodynamic activation method mediated by curcumin on oyster shelf life and quality. **Food Research International**, v. 87, p. 204–210, 2016.

LIU, Z.; YANG, L. Antisolvent precipitation for the preparation of high polymeric procyanidin nanoparticles under ultrasonication and evaluation of their antioxidant activity in vitro. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 43, p. 208–218, 1 maio 2018.

LUKSIENE, Z.; BROVKO, L. Antibacterial Photosensitization-Based Treatment for Food Safety. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 4, p. 185–199, 17 dez. 2013.

LUKSIENĖ, Z.; ZUKAUSKAS, A. Prospects of photosensitization in control of pathogenic

- and harmful micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1415–1424, 1 nov. 2009.
- MACLEAN, M. et al. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1932–7, 1 abr. 2009.
- MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1–2, p. 107–113, 30 jan. 2002.
- MAHMOOD, K. et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877–890, 1 nov. 2015.
- MAÑAS, P.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1387–1399, 2005.
- MANTILLA, S. P. S. et al. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 437–448, 2010.
- MARTÍNEZ, M. A. et al. Effects of high pressure processing on protein fractions of blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 323–329, 1 jun. 2017.
- MASNIYOM, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 8, p. 873–880, 1 jun. 2002.
- MASNIYOM, P.; BENJAMA, O.; MANEESRI, J. Extending the shelf-life of refrigerated green mussel (*Perna viridis*) under modified atmosphere packaging. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 171–179, 2011.
- MATOS, K. H. O. DE et al. Effect of supercritical carbon dioxide processing on *Vibrio parahaemolyticus* in nutrient broth and in oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 10, p. 4090–4098, 11 out. 2018.
- MCMULLEN, L. M.; STILES, M. E. Quality of fresh retail pork cuts stored in modified atmosphere under temperature conditions simulating export to distant markets. **Meat Science**, v. 38, n. 2, p. 163–177, 1 jan. 1994.
- MEISEL, P.; KOCHER, T. **Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Elsevier, , 13 maio 2005.
- MENDES, R. et al. Effect of CO₂ dissolution on the shelf life of ready-to-eat *Octopus vulgaris*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 551–561, 2011.
- MENDES, R.; GONÇALVES, A. Effect of soluble CO₂ stabilisation and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1678–1687, 2008a.
- MENDES, R.; GONÇALVES, A. Effect of soluble CO₂ stabilization on the quality of fillets from farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n. 4, p. 342–366, 2008b.
- MENDES, R.; PESTANA, C.; GONÇALVES, A. The effects of soluble gas stabilisation on

the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 11, p. 2000–2009, 1 nov. 2008.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 1 mar. 2001.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

MONDOULET, L. et al. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4547–4553, 1 jun. 2005.

MUKHOPADHYAY, A. et al. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents and actions**, v. 12, n. 4, p. 508–15, out. 1982.

NASCIMENTO DA SILVA, M. et al. Physical and morphological properties of hydroxypropyl methylcellulose films with curcumin polymorphs. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105217, 1 dez. 2019.

ODEYEMI, O. A. et al. Spoilage microbial community profiling by 16S rRNA amplicon sequencing of modified atmosphere packaged live mussels stored at 4°C. **Food Research International**, v. 121, p. 568–576, 1 jul. 2019.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 805–816, 1 jun. 2011.

OLIVEIRA, T. C.; LIMA, S. L.; BRESSAN, J. Influences of different thermal processings in milk, bovine meat and frog protein structure. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, p. 896–902, 2013.

PANDEY, K.; CHATTE, A.; DALVI, S. Continuous production of aqueous suspensions of ultra-fine particles of curcumin using ultrasonically driven mixing device. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 6, p. 608–619, 3 jul. 2018.

PANDIT, R. S. et al. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 991–997, 7 dez. 2015.

PARDÍO-SEDAS, V. Influence of Ozone Depuration on the Physical Properties of Fresh American oysters (*Crassostrea virginica*). **Processing and Impact on Active Components in Food**, p. 455–461, 1 jan. 2015.

PAREJO, C. B. **MOLUSCOS TECNOLOGIA DE CULTIVO**. Madri: [s.n.].

PARK, J. W.; LANIER, T. C. Combined Effects of Phosphates and Sugar or Polyol on Protein Stabilization of Fish Myofibrils. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1509–1513, nov. 1987.

PARK, J. W.; LANIER, T. C. Scanning Calorimetric Behavior of Tilapia Myosin and Actin due to Processing of Muscle and Protein Purification. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 49–51, jan. 1989.

PARK, S. J.; JEON, S. Y.; YEO, S. DO. Recrystallization of a pharmaceutical compound using liquid and supercritical antisolvents. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 7, p. 2287–2293, 2006.

PARK, S. Y.; CHUNG, M.-S.; HA, S.-D. Combined effect of sodium hypochlorite and gamma-irradiation for the control of *Vibrio vulnificus* in fresh oyster and clam. **LWT**, v. 91, p. 568–572, 1 maio 2018.

- PASCHOAL, M. A. et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against streptococcus mutans in a planktonic culture. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 313–319, 1 set. 2013.
- PENHA, C. B. et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 198–202, 1 mar. 2017.
- PERNI, S. et al. **Nanoparticles: Their potential use in antibacterial photodynamic therapy** *Photochemical and Photobiological Sciences* Royal Society of Chemistry, , 1 maio 2011.
- PRASAD, R.; PATSARIYA, R.; DALVI, S. V. Precipitation of curcumin by pressure reduction of CO₂-expanded acetone. **Powder Technology**, v. 310, p. 143–153, 2017.
- PREIS, E. et al. Spray dried curcumin loaded nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 531–539, 1 set. 2019.
- PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 1 jun. 2009.
- PUDIPEDDI, M.; SERAJUDDIN, A. T. M. **Trends in solubility of polymorphs** *Journal of Pharmaceutical Sciences* John Wiley and Sons Inc., , 2005.
- RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (Crassostrea gigas) em áreas de cultivo na baía sul**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- RAMOS, R. J. et al. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 29–37, 2010.
- RAMOS, R. J. et al. Occurrence of *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 3, p. 478–484, 2012.
- RAMOS, R. J. et al. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 327–333, 2014.
- RANDAZZO, W.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Curcumin-Mediated Photodynamic Inactivation of Norovirus Surrogates. **Food and Environmental Virology**, v. 8, n. 4, p. 244–250, 1 dez. 2016.
- RASZL, S. M. et al. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1201–1222, 1 nov. 2016.
- REZUSTA, A. et al. In Vitro Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on Candida Species. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 613–619, maio 2012.
- RIBEIRO, A. P. D. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 391–398, fev. 2013.
- RIOS, E. **Seashells Of Brazil**. [s.l.: s.n.].
- RISTORI, C. A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and

estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 17, n. 4, p. 259–269, ago. 2007.

ROBLERO-BARTOLÓN, G. V.; RAMÓN-GALLEGOS, E. Use of nanoparticles (NP) in photodynamic therapy (PDT) against cancer. **Gaceta medica de Mexico**, v. 151, n. 1, p. 85–98, 2015.

RONG, C. et al. Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). v. 11, n. 1, p. 108–112, 1 jan. 2010.

RONHOLM, J.; LAU, F.; BANERJEE, S. K. **Emerging seafood preservation techniques to extend freshness and minimize Vibrio contamination** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media SA, , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047466>>. Acesso em: 20 nov. 2018

ROTABAKK, B. T. et al. Effect of Modified Atmosphere Packaging and Soluble Gas Stabilization on the Shelf Life of Skinless Chicken Breast Fillets. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. S124–S131, 31 maio 2006.

ROTABAKK, B. T. et al. Enhancement of modified atmosphere packaged farmed atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) fillet quality by soluble gas stabilization. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 2, p. 179–186, 2008.

ROTABAKK, B. T.; LEKANG, O. I.; SIVERTSVIK, M. Volumetric method to determine carbon dioxide solubility and absorption rate in foods packaged in flexible or semi rigid package. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 43–50, 1 set. 2007.

ROTABAKK, B. T.; SIVERTSVIK, M. **Solubility of carbon dioxide in muscle foods and its use to extend the shelf life of packaged products**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2012.

SANTOS, A. A. DOS; MARCHIORI, N. DA C.; GIUSTINA, E. G. DELLA. Síntese informativa da maricultura 2016. **Síntese informativa da maricultura 2016**, p. 3, 2016.

SHRIVER, S. K.; YANG, W. W. **Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen Control** *Food Engineering Reviews* Springer, , 29 mar. 2011.

SILVA, A. C. DA et al. Production and characterization of curcumin microcrystals and evaluation of the antimicrobial and sensory aspects in minimally processed carrots. **Food & Function**, v. 8, n. 5, p. 1851–1858, 24 maio 2017.

SIMPSON, R.; ACEVEDO, C.; ALMONACID, S. Mass transfer of CO₂ in MAP systems: Advances for non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 2, p. 233–239, 1 maio 2009.

SIVERTSVIK, M. et al. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 3, p. 449–458, 1 fev. 2003.

SIVERTSVIK, M. et al. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods: Part 1: Development and validation of experimental apparatus using a manometric method. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 3, p. 449–458, 1 fev. 2004.

SIVERTSVIK, M. The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and 37 ml/100 ml carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 430–438, 1 abr. 2007.

SIVERTSVIK, M.; BIRKELAND, S. Effects of Soluble Gas Stabilisation, Modified Atmosphere, Gas to Product Volume Ratio and Storage on the Microbiological and Sensory Characteristics of Ready-to-Eat Shrimp (*Pandalus borealis*). 2006.

- SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; ROSNES, J. T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 107–127, 1 fev. 2002.
- SIVERTSVIK, M.; JENSEN, J. S. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 3: Cooked meat products. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 499–505, 2005.
- SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; JEKSRUD, W. K. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 4, p. 451–458, 2004.
- SKIPNES, D. et al. Heat transfer in vacuum packed mussels (*Mytilus edulis*) during thermal processing. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 11, n. 3–4, p. 5–19, 2002.
- SOARES, F. Crescimento e Qualidade microbiológica das ostras produzidas em cultivos multitróficos versus monocultivos. p. 101, 2015.
- SOARES, L. S. et al. Evaluation of CO₂ absorption and desorption rate in oysters (*Cassostrea gigas*) using the soluble gas stabilisation method. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 5, p. 1089–1094, 1 maio 2015.
- SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Science**, v. 52, n. 2, p. 157–164, 1 jun. 1999.
- SOUZA, R. V. et al. Moluscos bivalves Medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia. **Epagri documentos**, p. 1–48, abr. 2014.
- SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 108–20, ago. 2013.
- STORMO, S. K. et al. Modeling-assisted minimal heat processing of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 6, p. e12555, 1 dez. 2017.
- STORMO, S. K. et al. In-Pack Surface Pasteurization of Capture-Based, Pre-Rigor Filleted Atlantic Cod (*Gadus morhua*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 7, p. 783–794, 9 ago. 2018.
- TACK, D. M. et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016-2019. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 17, p. 509–514, 1 maio 2020.
- TAO, R. et al. Effects of curcumin-based photodynamic treatment on the storage quality of fresh-cut apples. **Food Chemistry**, v. 274, p. 415–421, 15 fev. 2019.
- TEIXEIRA, Â. M.; BEIRÃO, L. H. Efeitos de agentes crioprotetores na capacidade de retenção de água em pasta de pescado utilizando-se a técnica de análise de superfície de resposta. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 1, 1999.
- TEMBA, B. A. et al. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. **Food Control**, v. 59, p. 708–713, 1 jan. 2016.
- THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Solid-state phase transformations and storage stability of

- curcumin polymorphs. **Crystal Growth and Design**, v. 15, n. 4, p. 1757–1770, 1 abr. 2015.
- THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Particle formation pathways and polymorphism of curcumin induced by ultrasound and additives during liquid antisolvent precipitation. **CrystEngComm**, v. 16, n. 48, p. 11102–11114, 28 dez. 2014.
- THUPILA, N.; RATANA-ARPORN, P.; WILAI PUN, P. Radiation resistances and decontamination of common pathogenic bacteria contaminated in white scar oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 828–832, 1 jul. 2011.
- TORTIK, N.; SPAETH, A.; PLAETZER, K. Photodynamic decontamination of foodstuff from *Staphylococcus aureus* based on novel formulations of curcumin. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 13, n. 10, p. 1402–9, out. 2014.
- TOSATI, J. V. et al. Light-activated antimicrobial activity of turmeric residue edible coatings against cross-contamination of *Listeria innocua* on sausages. **Food Control**, v. 84, p. 177–185, 1 fev. 2018.
- TRABAL FERNÁNDEZ, N. et al. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 1, p. 69–83, 1 abr. 2014.
- TRAMONTE, V. L. C. G.; PARISENTI, J.; FACCIN, G. Composicao nutricional de ostras, in natura e cozidas, coletadas em diferentes estacoes do ano, na cidade de Florianopolis, SC. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 31–34, 2005.
- TSIRONI, T. N.; TAOUKIS, P. S. Modeling microbial spoilage and quality of gilthead seabream fillets: Combined effect of osmotic pretreatment, modified atmosphere packaging, and nisin on shelf life. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. M243–M251, 24 mar. 2010.
- US FDA. **Generally recognized as safe (GRAS) status of curcumin: GRN number 460.**
- VALEH-E-SHEYDA, P. et al. An insight on reducing the particle size of poorly-water soluble curcumin via LASP in microchannels. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 91, p. 78–88, 1 maio 2015.
- WANG, L. et al. Effects of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on Microbial Flora and Shelf-life of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during Controlled Freezing-point Storage at -0.8°C . **Food Science and Technology Research**, v. 20, n. 6, p. 1141–1152, 2014.
- WOLFE, S. K. Use of CO and CO₂ enriched atmosphere for meats, fish, and produce. **Food Technol**, v. 34, p. 55–58, 1980.
- WU, J. et al. Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 385–392, 1 set. 2015.
- WU, J. et al. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 34–39, 2016.
- XI, D.; LIU, C.; SU, Y.-C. Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 368–373, 1 maio 2012.
- XIE, M. BIN et al. Solubility enhancement of curcumin via supercritical CO₂ based silk fibroin

carrier. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 1–9, 2015a.

XIE, M. et al. Nano-curcumin prepared via supercritical: Improved anti-bacterial, anti-oxidant and anti-cancer efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 732–740, 2015b.

YADAV, D.; KUMAR, N. Nanonization of curcumin by antisolvent precipitation: Process development, characterization, freeze drying and stability performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 564–577, 30 dez. 2014.

YADZIR, Z. H. M. et al. Tropomyosin, the major tropical oyster *Crassostrea belcheri* allergen and effect of cooking on its allergenicity. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 11, n. 1, p. 30, 2015.

YAO, C. et al. Relationship between membrane damage, leakage of intracellular compounds, and inactivation of *Escherichia coli* treated by pressurized CO₂. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 858–865, 1 ago. 2014.

YE, M. et al. Effects of High-Hydrostatic Pressure on Inactivation of Human Norovirus and Physical and Sensory Characteristics of Oysters. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. M1330–M1335, 1 jun. 2015.

YEN, F.-L. L. et al. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7376–7382, 23 jun. 2010.

YU, T.; CHEN, Y. Effects of elevated carbon dioxide on environmental microbes and its mechanisms: A review. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 865–879, 2019.

ZHANG, J. et al. Effect of cooking temperatures on protein hydrolysates and sensory quality in crucian carp (*Carassius auratus*) soup. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 542–548, 27 jun. 2013.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. **Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future** *Advanced Drug Delivery Reviews* Elsevier, , 1 jan. 2013.

ZHAO, F. et al. New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 induced by high-pressure CO₂. **mBio**, v. 7, n. 4, 1 jul. 2016.

ZHAO, Y.; WELLS, J. H.; MCMILLIN, K. Dynamic Changes of Headspace Gases in CO₂ and N₂ Packaged Fresh Beef. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 571–575, 1 maio 1995.

ZHAO, Z. et al. Formation of curcumin nanoparticles via solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3171–3181, 2015.

APÊNDICE A – Curva de calibração do diclorometano

Figura 7.1- Curva de calibração para determinação da concentração de diclorometano (DCM).

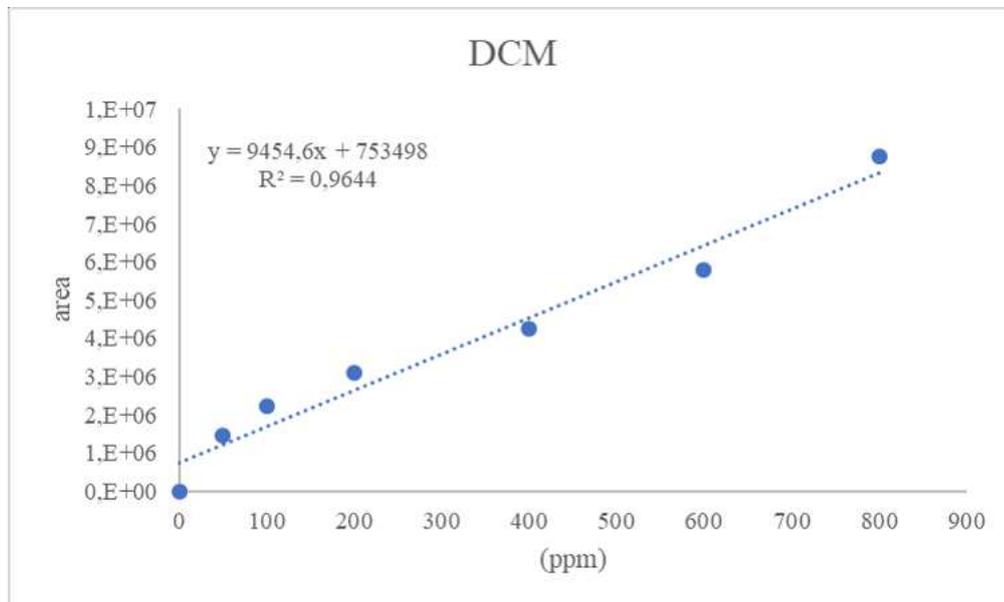


Figura 7.2 – Curva de degradação da curcumina em solução exposta a luz UV-A

