

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

EFEITO SINERGÍSTICO DOS GASES BROMETO  
DE METILA E ÓXIDO DE ETILENO NA ESTE  
RILIZAÇÃO DE PIMENTA PRETA EM GRÃO

Olavo Rusig  
Engenheiro Tecnólogo de Alimentos

Orientador  
Prof. Dr. Fumio Yokoya

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Univer  
sidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre  
hologia de Alimentos.

**R896e**

**00828/BC**

-1974-

O autor

dedica este trabalho a  
seus pais, espôsa e  
filha.

## ÍNDICE

	página
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	42
6. CONCLUSÕES.....	47
7. BIBLIOGRAFIA.....	48
AGRADECIMENTOS	

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito sinérgico na esterilização de pimenta do reino (Piper nigrum) preta, utilizando-se os gases óxido de etileno e brometo de metila. Foram feitos vários tratamentos na pimenta em função das seguintes variáveis: umidade relativa, temperatura de esterilização, concentração dos gases e tempo de exposição aos gases. Antes dos tratamentos, as amostras foram condicionadas aproximadamente 17 horas em dessecadores, mantidos à umidades relativas de 30, 50 e 70 %. Para cada esterilização, efetuaram-se contagens microbiológicas total e de termofílicos a 32 e 55 °C respectivamente, para os gases misturados e separados. O tempo de esterilização foi de 4, 8 e 17 horas.

Os resultados mostraram que o tratamento com óxido de etileno na concentração de 360 mg/l não é suficiente para destruir as bactérias da pimenta preta. O tratamento com 2.540 mg/l de brometo de metila foi eficiente na esterilização. A eficiência desses agentes cresceu com o aumento da umidade relativa e da temperatura.

A proporção dos gases misturados mais eficiente na esterilização foi 1 de óxido de etileno para 10 de brometo de metila, sendo o tratamento mais interessante sob o ponto de vista prático o que constou de 58 mg/l de óxido de etileno, misturado com 540 mg/l de brometo de metila, por 17 horas de exposição.

## SUMMARY

The purpose of the present work was to study the synergistic effect of gaseous ethylene oxide and methyl bromide on the sterilization of black pepper (Piper nigrum). Various treatments of the pepper were carried out employing following variables: relative humidity, sterilization temperature, concentration of gases and exposure time to gases. Before the treatments, the samples were conditioned for approximately 17 hours in desiccators maintained at relative humidities of 30, 50 and 70 %. For each sterilization microbiological total counts and thermophilic bacteria counts at 32 and 55 °C respectively were carried out, employing individual gases and their mixtures. Sterilization times were 4, 8 and 17 hours.

The results showed that the treatment with ethylene oxide at a concentration of 360 mg/l was not efficient in destroying the bacteria of black pepper. The treatment with 2.540 mg/l of methyl bromide was efficient in the sterilization. The efficiency of these agents improved with the increase of the relative humidity and temperature.

The most efficient proportion of the mixed gases for sterilization was 1 part of ethylene oxide to 10 parts of methyl bromide, the most interesting treatment from the practical point of view being that with a mixture containing 58 mg/l of ethylene oxide and 540 mg/l of methyl bromide with 17 hours of exposure.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse na esterilização de condimentos está diretamente relacionado às indústrias de processamento de carne, pois é grande o seu consumo como matéria prima na elaboração de produtos alimentícios desse genero. A quantidade de condimentos no produto final geralmente é pequena, mas devido à grande quantidade de microrganismos existentes, podem ocasionar a deterioração do alimento.

Embora, em geral, os produtos de carne sejam pasteurizados ao redor de 70 °C e sejam usados aditivos como nitrito e nitrato de sódio que de certa forma possuem propriedades bactericidas, ainda assim normalmente são bons substratos para o desenvolvimento de microrganismos.

Usando-se processos tradicionais de esterilização como a aplicação de calor, nota-se que grande parte de óleos essenciais existentes em condimentos é eliminada. Este fenômeno torna os condimentos inadequados para serem utilizados em produtos de carne. Entretanto, a esterilização por gases, como óxido de etileno e brometo de metila, evita o fenômeno citado acima, pois se da a temperaturas consideradas baixas, no máximo de 60 °C. Algumas indústrias de processamento de carne vêm tentando utilizar óleos essenciais extraídos de condimentos, mas sem bons resultados. Isso se deve principalmente ao alto preço dos óleos essenciais, ao aparecimento de características organoleticas indesejáveis no produto final e à necessidade de alguns condimentos

em certos produtos serem usados sob a forma de grãos.

O uso de óxido de etileno na esterilização de condimentos teve grande impulso, após os estudos de Griffith e Hall em 1938. Desde então se intensificaram as pesquisas sobre o assunto, visando a obtenção dos melhores métodos para essa esterilização. As pesquisas sobre o uso de brometo de metila como bactericida em alimentos são escassas, existindo, entretanto, muitos trabalhos sobre sua aplicação na fumigação de cereais.

Não existem dados sobre a eficiência da concentração dos gases em mistura e sobre o poder sinérgico dos mesmos, quando utilizados para esterilização de alimentos, aspectos esses que constituem o objetivo da presente pesquisa.

Procurou-se aliados a outros fatores, variar as concentrações de óxido de etileno e brometo de metila, analisando-se o efeito sinérgico sobre a esterilização de alimentos.

O óxido de etileno tem alto efeito tóxico sobre as bactérias, pequeno sobre insetos, pouca penetrabilidade nos materiais que são esterilizados e é altamente solúvel em água deixando porem, resíduos. O brometo de metila, ao contrário, tem grande penetrabilidade nos materiais que são esterilizados; é pouco solúvel em água e exerce alto efeito tóxico sobre insetos. Assim, além de utilizar temperaturas baixas, o uso desses gases pode eliminar os insetos e as bactérias existentes de uma só vez nos alimentos, não necessitando de fumigação antes da esterilização.

O óxido de etileno, além de tóxico, é explosivo e sofre combustão em concentração acima de 12 % no ar atmosférico;

o brometo de metila, não sofre combustão, mas é altamente tóxico. Devido a isso o trabalho por segurança foi feito usando-se 10 % de óxido de etileno com 90 % de gás carbonico que é usado para evitar combustão do óxido de etileno e 98 % de brometo de metila com 2 % de cloropicrina que é usado como indicador da presença do brometo de metila no ar.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. População Microbiana de Condimentos

JAMES (1938) determinou que ampla variedade de microrganismos é encontrada em condimentos: bactérias saprófitas, fungos, leveduras, bactérias termofílicas etc. YESAIR e WILLIAMS (1941) constataram em 7 amostras de pimenta preta, contagem variando de 1.200.000 a 16.300.000 bactérias por grama de amostra. Determinaram também, que as contagens de fungos, bactérias, ácido-tolerantes e mesofílicas aeróbicas eram altas e que de esporos termofílicos aeróbicos era baixa. Anaeróbios putrefativos não foram encontrados em nenhuma das 116 amostras de condimentos examinadas.

HALL (1938) determinou que no caso particular de salsicha produzida com condimentos esterilizados, o tempo de preservação era pelo menos o dobro daquele da salsicha produzida com condimentos não esterilizados. PAPPAS e HALL (1952) fizeram experimentos com linguiça, usando condimentos esterilizados e não esterilizados. As linguiças foram colocadas em refrigeradores à temperatura de 5 e -7 °C por 31 dias. As preparadas com condimento não tratado com óxido de etileno tornaram-se rançosas depois de dez dias de armazenamento e as preparadas com condimentos tratados continuaram em boas condições, sem qualquer rancidez por 28 dias, quando ocorreu o início de rancidez. A tabela 1 mostra a relação de microrganismos existentes nos condimentos usados para o experimento de Pappas e Hall.

Tabela 1: Condimentos usados e concentrações de microrganismos.

Condimentos	Contagem total (micr./gr.)	
	sem tratamento	com tratamento
Gengibre	920.000	6.000
Pimenta preta	4.200.000	18.000
Sage	11.000	500
Pimenta vermelha	3.800.000	22.000
Mistura de condimentos	125.000	500

## 2. Uso de Óxido de Etileno e Brometo de Metila

PERKINS (1969) cita que o óxido de etileno foi descoberto e descrito em 1859 por Wurtz e que o valor deste gás como fumigante e pesticida foi reconhecido em 1.900, tendo em 1.929 Schrader e Bossert determinado que o mesmo tinha poder bactericida. FRIEDEL e colaboradores (1956) determinaram o efeito esporicida do óxido de etileno em Bacilos e Clostrídios pelo método A.O.A.C., concluindo que com 18 horas de exposição ao gás todos os microrganismos estavam mortos.

As primeiras patentes sobre o uso do óxido de etileno como esterilizante, apareceram nos Estados Unidos através de Griffith e Hall em 1938. Essas patentes demonstraram com sucesso o uso do óxido de etileno na esterilização dos seguintes alimentos: cacau, frutas secas, castanhas e condimentos (MICRO BIOTROL CO.)

BLACKE E STUMBO (1970) determinaram a resistência de alguns microrganismos quando tratados com 700 mg/l de óxido de etileno a temperatura de 30 °C e umidade relativa de 33 %. O valor D foi

determinado para caracterizar a resistência dos microrganismos e o valor z foi determinado especificamente para esporos de Bacillus coagulans, tratados a temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, obtendo valores diferentes para esporos suspensos em discos de papel e em discos de vidro.

O valor z dos esporos de Bacillus coagulans suspensos em discos de vidro e de papel foram 83,3 °F e 94,2 °F, respectivamente. Os valores de D são mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de D para esporos de Bacillus coagulans tratados com óxido de etileno.

Temperatura °C	Valor D (min.)	
	esporos suspensos em discos de papel	esporos suspensos em discos de vidro
30	10,40	13,50
40	7,00	9,02
50	3,53	4,05
60	3,07	3,33

O valor de D a 30 °C do Leuconostoc mesenteroides suspensos em discos de vidro e de papel foram 3,45 e 1,69 minutos, respectivamente. O valor D a 30 °C do Lactobacillus brevis suspensos em discos de vidro e papel foram 2,32 e 5,88 minutos respectivamente.

SAVAGE e STUMBO (1971) determinaram a resistência do Clostridium botulinum tipo 62 A, quando tratados com 700 mg/l de óxido de etileno à temperatura de 40 °C e 47 % de umidade relativa. Concluíram que com o tratamento o valor D variou apenas de 11,0 minutos a 11 minutos e 30 segundos para 4 gerações de mi -

crorganismos quando tratados nas condições citadas.

MICHAEL e STUMBO (1970) determinaram a eficiência de esterilização de Salmonella senftenberg e Escherichia coli liofilizadas e tratadas com 700 mg/l de óxido de etileno a temperatura de 40 °C e umidade relativa variando de 11 a 73 % e tempo de exposição de 0 a 6 minutos. Concluíram que a Salmonella senftenberg era duas vezes mais resistente quando misturada em ovo desidratado do que quando no estado puro. Concluíram também que a morte das duas bactérias seguia reação de primeira ordem.

LIU e colaboradores (1968) estudaram o efeito do óxido de etileno sobre Bacillus subtilis, usando concentração de 700 mg/l, umidade relativa de 33 % e temperatura variando de 40 a 80 °C. Determinaram que o valor D era 15 minutos para 40 °C e 0,7 minutos para 80 °C. Concluíram portanto que, para obter redução da população microbiana de 10 D seriam necessários 150 minutos a 40 °C, e 7 minutos a 80 °C. Extrapolando esses valores para 100 °C, o valor 10D seria de 92 segundos e a 110 °C de 42 segundos. O valor z obtido foi de 53 °F.

RAUSCHER e KAEMMERER (1957) estudaram o efeito do óxido de etileno sobre vários microrganismos usando período de exposição de 6 horas, temperatura de 25 °C e concentração variando de 150 a 1.250 gramas por metro cúbico.

Pela tabela 3 vê-se a diferença de resistência dos microrganismos em relação a concentração do gás.

Tabela 3: Efeito da concentração de óxido de etileno sobre os microrganismos

Microrganismo	Concentração (g/m <sup>3</sup> )						
	150	250	350	500	750	1000	1250
<u>Bacterium coli</u>	x	x	x	o	o	o	o
<u>Streptococcus sp</u>	x	x	x	o	o	o	o
<u>Staphylococcus var</u>	x	x	x	x	x	o	o
<u>Clostridium var</u>	x	x	o	o	o	o	o
<u>Bacillus anthracoides</u>	x	x	x	x	o	o	o
<u>Flavobacterium sp</u>	x	o	o	o	o	o	o
<u>Oidium lactis</u>	x	x	o	o	o	o	o
<u>Penicillium glaucus</u>	x	o	o	o	o	o	o
<u>Aspergillus niger</u>	x	o	o	o	o	o	o
<u>Mucor mucedo</u>	x	x	o	o	o	o	o

Significado dos sinais:

x cresceu

o esteril

Na tabela 4 vê-se o efeito da temperatura para os mesmos microrganismos esterilizados, com concentração de 500 gramas por metro cúbico e exposição de 6 horas.

Tabela 4: Efeito da temperatura sobre os microrganismos durante à esterilização.

Microrganismo	Temperatura °C				
	14	18	20	25	30
<u>Bacterium coli</u>	x	x	o	o	o
<u>Staphylococcus var</u>	x	x	x	x	x
<u>Streptococcus sp</u>	x	o	o	o	o
<u>Clostridium var</u>	x	x	o	o	o
<u>Bacillus anthracoides</u>	x	x	x	x	x
<u>Flavobacterium sp</u>	x	o	o	o	o
<u>Thidium lactis</u>	o	o	o	-	-
<u>Penicillium glaucus</u>	o	o	o	o	-
<u>Aspergillus niger</u>	o	o	o	-	-
<u>Mucor mucedo</u>	o	o	o	-	-

Significado dos sinais:

- x        cresceu
- o        esteril
- não testado

Na tabela 5 é mostrado o efeito do período de exposição sobre alguns microrganismos usados na experiência.

Tabela 5: Efeito do período de exposição durante a esterilização.

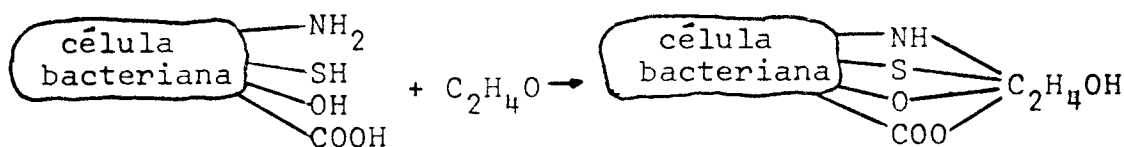
Microrganismo	Período de exposição (horas)						
	2	4	5	6	7	10	14
<u>Bacterium coli</u>	x	o	o	o	o	o	o
<u>Staphylococcus var</u>	x	x	x	x	x	x	x
<u>Bacillus anthracoides</u>	x	x	x	x	x	x	x
<u>Streptococcus sp</u>	x	x	o	o	o	o	o
<u>Clostridium var</u>	o	o	o	o	o	o	o
<u>Flavobacterium sp</u>	o	o	o	o	o	o	o

MONRO citado por MACLACHLAN e colaboradores (1953) mostrou que o brometo de metila é um eficiente fumigante para o controle de alguns insetos em cereais.

MORENO (1971) estudou alguns métodos para a desinfecção das pimentas do reino branca e preta. Em seu estudo fez contagens de aeróbios, mesófilos, coliformes, enterococos termófilos, esporulados e fungos após o tratamento da pimenta. Usou tratamento biológico com o emprego de aureomicina e cloranfenicol, tratamento químico com cloro e formaldeído e tratamento físico com irradiação gama. A radiação gama mostrou-se mais eficiente para a pimenta do reino seguida imediatamente por formaldeído, aureomicina, cloranfenicol e cloro.

### 3. Mecanismos de Ação de Óxido de Etileno e Brometo de Metila

O óxido de etileno reage com muitos compostos orgânicos e inorgânicos. HUGO (1971) cita que FRAENKEL e CONRAT determinaram que o óxido de etileno em solução aquosa reage com radicais carboxila, fenila, sulfidrila e grupos amínicos primários. Quando um microrganismo é tratado com óxido de etileno, algumas reações podem ocorrer na célula, mas as responsáveis pela sua morte não são ainda definitivamente conhecidas. PHILLIPS, segundo HUGO, ainda, propôs uma teoria pela qual esse gás inativa microrganismos através de reações de alquilação dos radicais já citados. O óxido de etileno substituiria átomos de hidrogênio desses radicais pelo radical hidroxí etil, bloqueando alguns grupos reativos essenciais às reações metabólicas como mostra o esquema abaixo:



PHILLIPS ainda afirmou em seu trabalho que agentes alquilantes diferem de outras classes de desinfetantes por serem mais reativos contra esporos.

A literatura sobre o mecanismo pelo qual o brometo de metila mata o microrganismo é escassa.

KOLB e SCHNEIDER citados por HUGO (1971) consideraram três possíveis mecanismos: a) que a própria molécula de haleto de alquila atuaria como agente esterilizante, b) hidrólise de bro



meto de metila poderia ocorrer dentro da célula, formando ácido bromídrico e metanol que atuariam como agentes tóxicos c) formação de outros agentes como formaldeído ou íons de haleto dentro da célula, matando-a.

#### 4. Fatores que Influem na Esterilização

##### a. Misturas de Gases

Na literatura é sugerido, que o óxido de etileno seja usado em mistura com gases inertes tais como gás carbonico ou hidrocarbonetos fluorados. HAENNI e colaboradores (1959) estudaram a inflamabilidade do óxido de etileno com compostos halogenados como diluentes, chegando à conclusão que, com misturas de até 12 % em peso de óxido de etileno em diclorodifluorometano não há problemas de combustão ou explosão, qualquer que seja a proporção de ar misturado com esses gases.

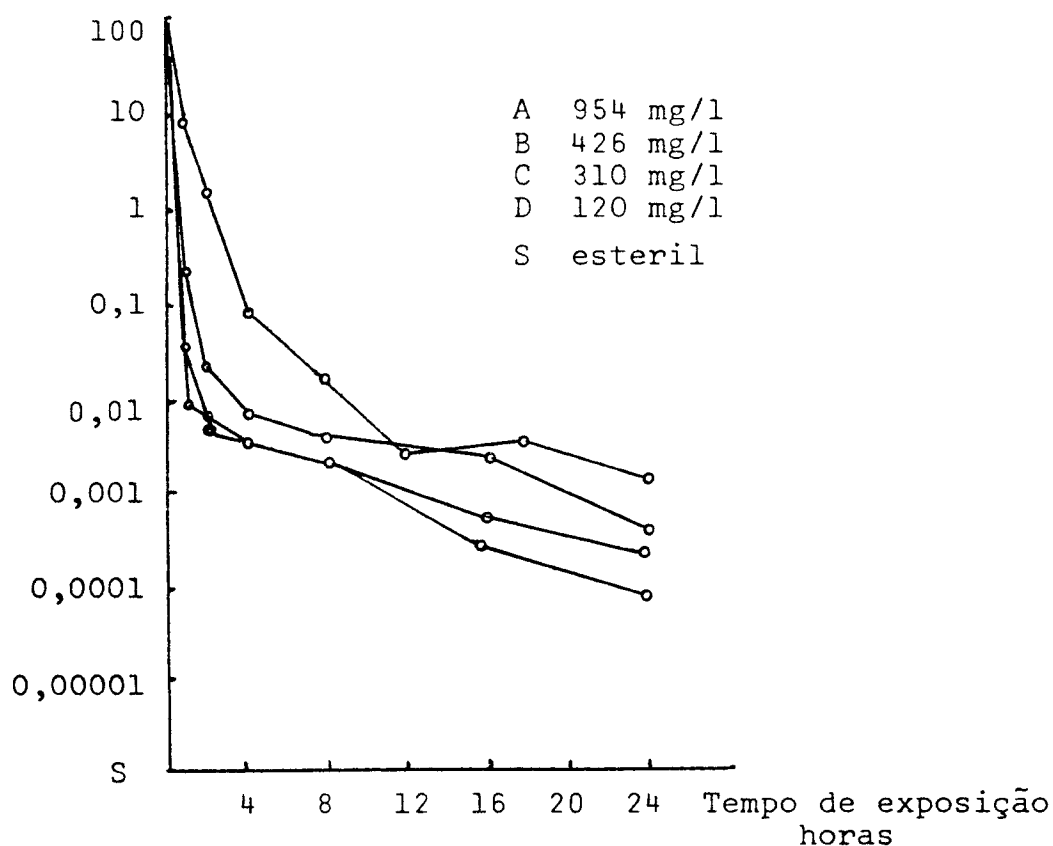
RICHARDSON e MONRO (1962) usaram mistura com 5 % de óxido de etileno e 10 % de brometo de metila para tratar sacos de juta contaminados com bactéria da podridão da batata ("potato ring rot"). O tratamento de 18 horas com esta mistura foi suficiente porém o tratamento por 42 horas com os gases separados nas concentrações de 6 % de óxido de etileno e 10 % de brometo de metila não houve esterilização, o que mostra o efeito sinérgico da mistura desses gases.

HUGO (1971) cita que PORTNER e colaboradores não encontraram ação sinérgica dos gases em seu estudo, mas determinaram que a mistura dos mesmos aumentava a velocidade de penetração em alguns plásticos.

### b. Concentração dos Gases

Para aplicações práticas, concentração de 450 mg/l de óxido de etileno é recomendado como o mínimo para esterilização dentro de tempo razoável. GILBERT e colaboradores (1964) estudaram o efeito da concentração de óxido de etileno sobre esporos de Bacillus subtilis previamente secos em umidade relativa de menos de 1% e pré-condicionados a 33 % de umidade relativa. A concentração usada de 120 a 954 mg/l, mostrou-se insuficiente para superar a resistência dos esporos devido a secagem previa excessiva. Pode-se ver na figura 1 que, nas condições do experimento, o aumento do tempo não melhoram a eficiência da esterilização.

Figura 1: Bacillus subtilis exposto ao óxido de etileno à 33 % de umidade relativa. (esporos previamente secos a menos de 1% de umidade relativa).



HUGO (1971) cita que KOLB e SCHNEIDER demonstraram que exposição de 18 horas à temperatura ambiente, na concentração de 3.400 a 3.900 mg/l de brometo de metila era necessária para desinfetar materiais contaminados com esporos de Bacillus anthracis.

MONRO (1962) cita os limites de fumigação usada para ampla variedade de alimentos que em geral varia de 10 a 40 mg/l para brometo de metila e óxido de etileno.

### c. Influência da Temperatura

A temperatura tem influência marcante sobre a eficiência da esterilização com óxido de etileno e brometo de metila e está relacionada com o tempo e a capacidade de penetração do gás no alimento. PERKINS (1969) cita que PHILLIPS demonstrou que a atividade do óxido de etileno aumenta aproximadamente 2,75 vezes para cada 10 °C entre 5 e 37 °C e que esse coeficiente é constante para outras temperaturas e concentrações de gás.

ERNST e SHULL (1962) estudaram o efeito de temperatura e concentração do óxido de etileno sobre esporos de Bacillus subtilis variedade niger quando desidratados ao ar, e chegaram à conclusão que o quociente de temperatura é 1,8 para a concentração de gás de 440 e 880 mg/l em temperaturas de 40,6 e 33,4 °C, respectivamente. Abaixo dessas temperaturas o valor Q<sub>10</sub> foi respectivamente 3,2 e 2,3 para as concentrações acima.

Em esterilização rotineira com óxido de etileno é usada a temperatura de 49 a 60 °C, PERKINS (1969).

#### d. Influência da Umidade na Esterilização

O mecanismo pelo qual a água atua com o óxido de etileno para a esterilização não é claramente entendido. HUGO (1971) cita que KAYE e PHILLIPS sugeriram que a superfície da célula bacteriana controla a penetração do gás, e isso só é possível se a superfície celular estiver úmida, para que o óxido de etileno possa ser absorvido e transportado para o interior. Outra teoria sugerida por Kaye e Phillips é que a umidade poderia ser necessária para a ionização dos grupos sulfídrica, amino, carboxila e hidroxila na célula, com a consequente reação de alquilação.

PERKINS (1969) cita que KAYE demonstrou ser o nível de 20 a 40 % de umidade relativa necessário para esterilizar esporos, sendo a velocidade 10 vezes mais rápida a 28 % do que a 97 %. PERKINS E LLOYD, segundo PERKINS (1969) concluíram que o nível ótimo de umidade, depende em grande parte da natureza do material e da porosidade superficial. Determinaram que um material altamente poroso podia ser esterilizado com umidade relativa baixa, mas para superfícies sólidas, era necessário umidade de 50 % ou mais.

ERNST e SHULL (1962) demonstraram que a pré-humidificação de câmaras de esterilização contendo material antes da introdução de óxido de etileno era menos efetiva do que a introdução simultânea de vapor de água e óxido de etileno para a esterilização.

### e. Influência do Tempo de Esterilização

GILBERT e colaboradores (1964) demonstraram que a secagem excessiva da célula bacteriana resulta em reação não uniforme com o óxido de etileno. Usando 33 % de umidade relativa com concentração de 120 mg/l a 25 °C, foram necessarias 8 horas para a esterilização de esporos de Bacillus subtilis var. niger (B.Globigii). O tempo necessário é uma função também, da umidade relativa como se pode ver pelas figuras 2 e 3. Os microrganismos desidratados, abaixo de 33 % de umidade relativa, tornam-se mais resistentes não sendo destruídos mesmo com longo tempo de exposição ao gás. O mesmo ocorreu com umidade relativa acima de 33 %.

Figura 2: Bacillus subtilis exposto ao Óxido de etileno à umidade relativa acima de 33 %.

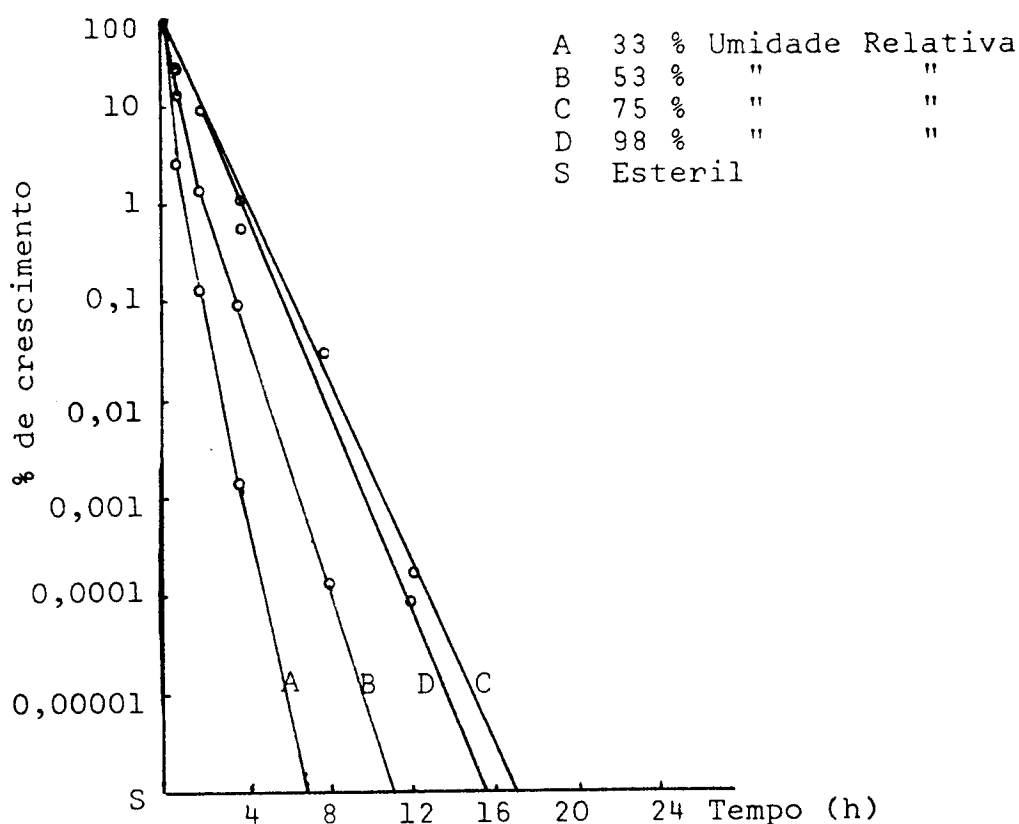
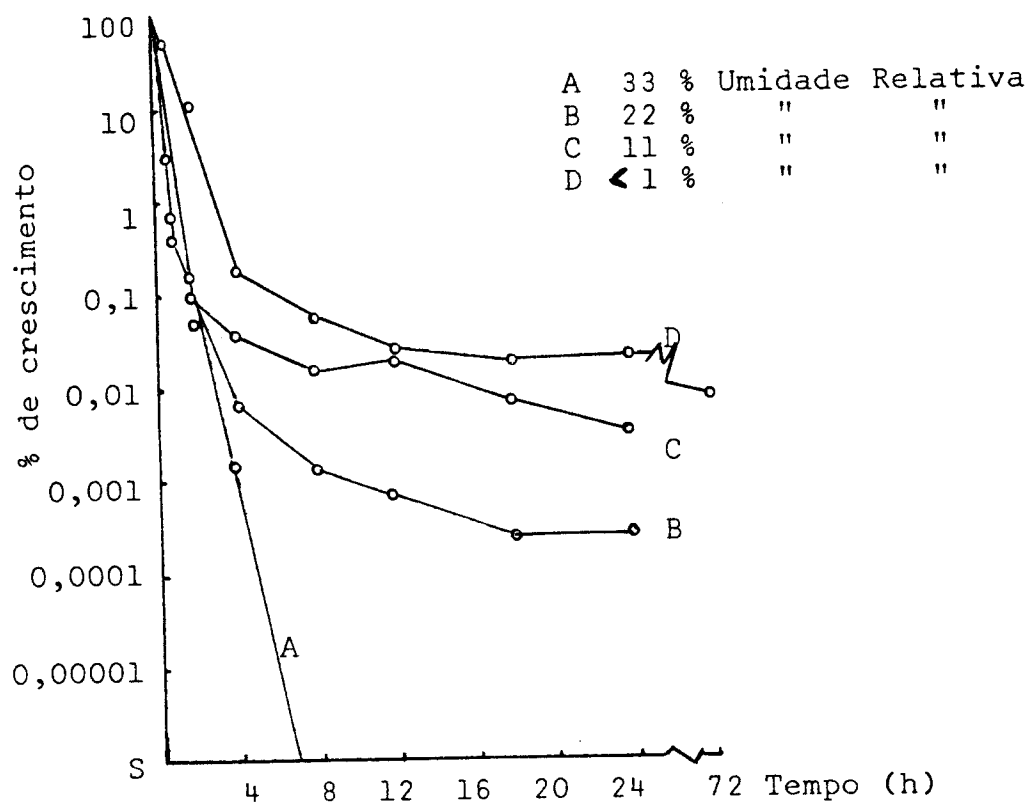


Figura 3: Bacillus subtilis exposto ao óxido de etileno à umidade relativa abaixo de 33 %.



## 5. Resíduo dos Gases

### a. Óxido de Etileno e Seus Derivados

Um inconveniente sério da esterilização com óxido de etileno e brometo de metila é o tempo necessário para a dissipação do resíduo do gás absorvido nos alimentos. A eliminação do resíduo é uma função do vácuo e da temperatura. Baseado em literatura e experiência pessoal de diversos pesquisadores foi estabelecido que aeração por 24 horas a temperatura ambiente é satisfatória geralmente, PERKINS (1969). O resíduo desse gás é considerado aditivo pelo U.S. Department of Health, Education

and Welfare - Food and Drug Administration (1969), sendo o seu uso permitido por esse Departamento quer puro quer em mistura com gás carbonico ou diclorodifluorometano.

O limite residual máximo do gás em alimentos é de 50 ppm após a esterilização. Os produtos tratados com o gás não devem conter cloretos, devido à possível formação de etileno cloridrina, que não é eliminada rapidamente por aeração, e é tóxica.

Na Inglaterra foi sugerido pelo The British Industrial Association o limite de 300 ppm de etileno cloridrina para condimentos, W.H.O. (1972).

SAIR (1972) patenteou um processo de esterilização de condimentos que não formava grande quantidade de etileno glicol e etileno cloridrina. O processo consiste em tratar o condimento com pequena quantidade de óxido de etileno e a seguir com óxido de propileno. Apesar do gás óxido de propileno formar resíduo de propileno glicol e propileno cloridrina, não consiste problema pois estes são menos tóxicos que os resíduos formados pelo óxido de etileno. O uso de óxido de etileno e óxido de propileno é permitido nos Estados Unidos pelo Food and Drug Administration para esterilizar pimenta negra inteira, mas não moída.

Na tabela 6 é dado o resíduo de etileno cloridrina dos tratamentos feitos por Sair, no qual pode-se verificar a grande diferença de resíduo em condimentos inteiros e moídos, quando submetidos à tratamento de  $0,75 \text{ oz/ft}^3$  de óxido de etileno por 4 horas.

Tabela 6: Resíduos de etileno cloridrina

Condimento	Concentração de etileno cloridrina ppm	
	inteiro	moído
Noz moscada	70	196
Oregano	450	1.000
Pimenta vermelha	950	1.800
Pimenta do reino preta	532	1.480

SCUDAMORE e HEUSER (1971) estudaram o resíduo de óxido de etileno, etileno cloridrina e etileno bromidrina em farinha e outros alimentos. Usaram concentração de 800 mg/l durante 6 horas para esterilização e de 21 mg/l por 24 horas para fumigação. As análises de resíduos foram feitas depois de 1 hora e de 365 dias em alimentos armazenados, embalados ou não. Observaram que quando a quantidade de óxido de etileno absorvido é grande pode-se formar resíduo de etileno cloridrina e etileno bromidrina durante a estocagem até que o pH do alimento se eleve a um nível que iniba a reação. Esse valor estabelecido por Wesley e outros é de pH 8,5 mas, nos experimentos feitos por Scudamore e Heuser o pH não aumentou até esse nível.

A velocidade de difusão do resíduo após a esterilização e a fumigação é maior em produtos livremente aerados do que embalados.

Os autores também estudaram o resíduo de etileno glicol, que é muito mais difícil de ser eliminado, mas muito menos tóxico. A seguir é dada da tabela 7 relacionando os resíduos com os tratamentos.



Tabela 7: Resíduo em ppm de Óxido de Etileno (O.E.), Etileno Cloridrino (E.C.) e Etileno Bromidrino (E.B.)

Alimento	Umidade %	CxT	Armazenagem	Resíduo	lh	24h	72h	7 dias
Farinha	10	200	Embalada	O.E.	155	33	n/d	-
				E.C.	55	60	-	75
Farinha	10	5.000	Embalada	O.E.	13.200	5.800	1.340	720
				E.C.	640	1.110	1.270	1.310
Farinha *	15	5.000	Embalada	O.E.	2.600	1.600	720	240
				E.C.	405	615	770	795
Uva passa	17	5.000	Embalada	E.B.	300	335	330	275
				O.E.	3.700	1.160	209	8,7
Coco seco	2,5	4.700	Embalada	E.C.	125	295	360	375
				O.E.	7.000	2.710	470	32
				O.E.	3.600	n/d		
			Embalada	E.C.	900	1.090	870	880
			N.Embalada	E.C.	620	n/d		

OBS: Temperatura dos tratamentos 25 °C

CxT Produto da concentração de gás e tempo de tratamento, sendo que para fumigação foi usado 2l mg/l de gás e para esterilização 800 mg/l.

n/d Não detectado

As amostras eram embaladas em vidros com tampa ou mantidas em bandejas

\* Amostra tratada com brometo de metila antes do tratamento com óxido de etileno

b. Brometo de Metila e Seus Derivados

É estabelecido pelo U.S. Department of Health, Education and Welfare - Food and Drug Administration (1966) que é permitido o resíduo de 400 ppm de brometo inorgânico, como aditivo, resultante da fumigação de ovo desidratado e condimentos. LAUG (1941) estudou algumas condições de fumigação para verificar a quantidade de resíduo que poder-se-ia formar. A concentração de gás usada foi de 6,9 e 0,767 % por 24 horas de exposição. Os resíduos foram determinados imediatamente após o tratamento e depois de 1, 24 e 48 horas e notou que o resíduo volátil era eliminado rapidamente da mostra e que o resíduo não volátil permanecia relativamente constante, aumentando em alguns casos.

A tabela 8 mostra a relação da eliminação dos resíduos com o tempo.

Tabela 8: Concentração em ppm de brometo em alimentos depois de 24 e 48 horas, quando tratados com 6,9 % de brometo de metila.

Alimento	Microgramas de brometo por grama depois de			
	24 horas		48 horas	
	volátil	não volátil	volátil	não volátil
Grão de trigo	34	111	19	139
Grão de trigo moído	71	340	75	313
Farinha branqueada	3,4	408	1,6	411
Germe de trigo	5,5	264	1,5	309
Farinha de milho	55	716	71	718
Leite em pó desnatado	1,2	60	traços	...
Queijo italiano ralado	0	4.090	...	...
Queijo americano ralado	3,3	...	1,8	3.472
Amendôa inteira	9,0	17	20	146
Amendôa moída	110	372	31	381

Nozes	59	2.825	13	2.740
Damasco	11	70	6,0	68
Passas	8,0	10	8,0	16
Repolho fresco cortado	2,3	68	Traços	64

ROEHM e colaboradores (1941) fizeram estudos de resíduos em cereal tratado com brometo de metila, usando concentração de 2 Lb/1.000 ft<sup>3</sup>, temperatura de 27 °C e 24 horas de exposição.

Na tabela 9 estão os resultados dos resíduos após 168 horas de aeração.

Tabela 9: Resíduos na farinha de trigo integral após fumigação

Horas de aeração	B r o m e t o		
	Total %	Inorgânico %	Orgânico %
0,5	0,0299	0,0178	0,0121
4	0,0244	0,0183	0,0061
24	0,0213	0,0197	0,0016
48	0,0210	0,0199	0,0011
96	0,0202	0,0196	0,0006
168	0,0199	0,0197	0,0002
controle não fumigado	0,0003	0,0004	0,0002

Esses pesquisadores estudaram também o resíduo em função da umidade relativa e concluíram que, com tratamento a 30 % de umidade relativa, o brometo de metila absorvido é liberado facilmente do alimento, mas quando o tratamento é feito a 70 % de umidade relativa o gás é hidrolisado e permanece na maior parte como resíduo de brometo inorgânico.

A Manufacturing Chemists Association (1968) cita o limite máximo permitido de 20 ppm de brometo de metila no ar, durante 8

horas de trabalho por dia, e que concentração de 100 ppm por 7 horas pode produzir envenenamento.

Para o Óxido de etileno cita o limite máximo de 50 ppm para 8 horas de trabalho. (1.971)

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Materiais

##### a. Amostra Utilizada

O condimento usado foi pimenta do reino preta em grão que é o fruto da Piper nigrum colhido antes da maturação e dessecado. Esse condimento foi escolhido para o trabalho por ser em geral dos mais altamente contaminados. A amostra foi obtida na Frigo - brás S.A. (São Paulo).

##### b. Meios de Cultura

Os meios de cultura usados foram Glicose-Triptona-Agar e Glicose-Triptona-Extrato-de-Levedura-Agar, preparados com os ingredientes obtidos da Difco Laboratories Inc., USA.

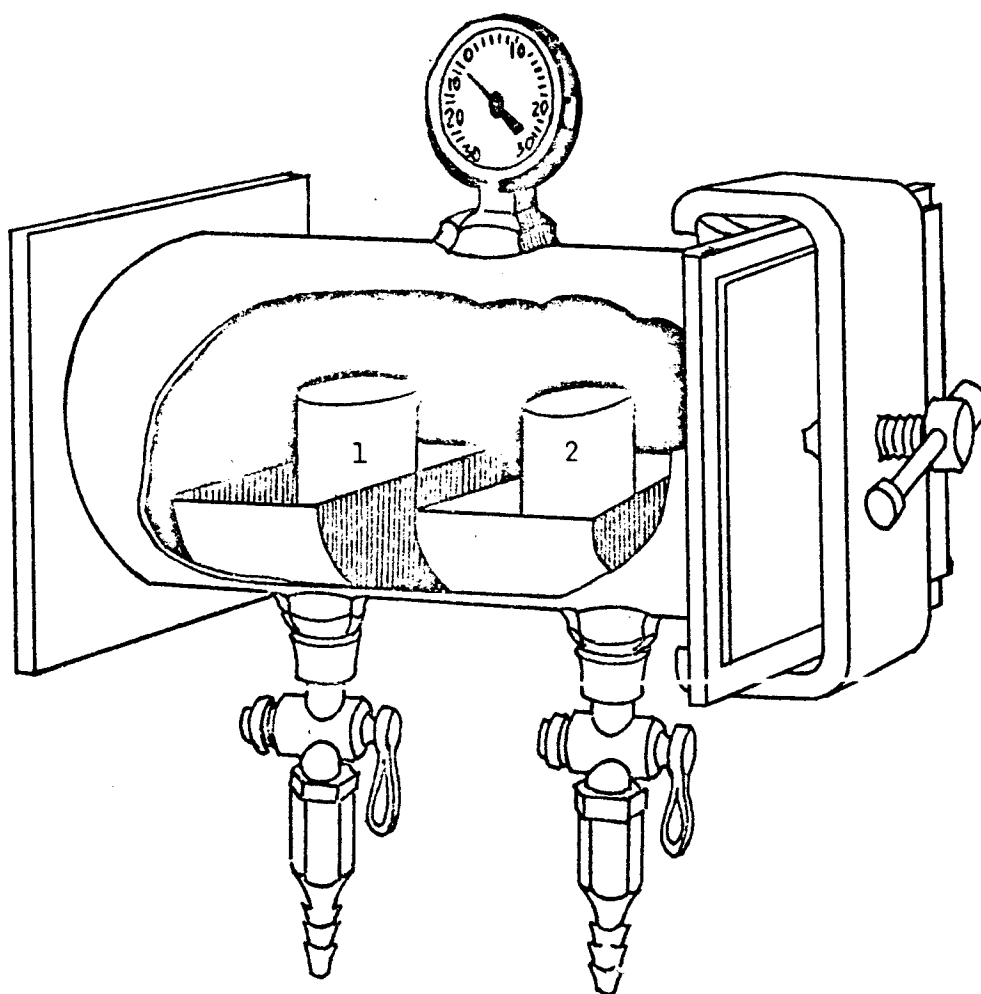
##### c. Equipamentos

- (1) Contador de colônias, Erma
- (2) Incubador - Fanem - modelo 095/1
- (3) Autoclave - Lufenco - modelo Steril Matic
- (4) Bomba a vácuo - Millipore Inc.
- (5) Balanças Metler P-1200 e H-35
- (6) Agitador Rotatório - New Brunswick - modelo V
- (7) Liquidificador "Waring Blendor" com copo de aço inoxidável
- (8) Câmara de esterilização

Para trabalhar com pequenas quantidades de amostra e de gás foi construída uma câmara de aço de 1,2 litros nas Oficinas da Unicamp.

Nessa câmara foi instalado um vacuo-manômetro de 30 in. a 30 lb/in<sup>2</sup> para o contrôle da concentração de gás. A reposição de ar por gases esterilizantes era feita por meio de dois registros instalados na câmara (figura 4).

Figura 4: Câmara de esterilização



- OBS: 1 Copo com solução de ácido sulfúrico para contrôle da Umidade Relativa.  
2 Copo com amostra de pimenta a ser esterilizada.

d. Material de uso comum em laboratórios

Pipetas, provetas, dessecadores, placas de Petri, etc.

e. Gases Usados

O óxido de etileno usado, conhecido comercialmente por Carbetil foi adquirido da "Oxigenio do Brasil S.A." e consiste de uma mistura de 10 % de óxido de etileno e 90 % de gás carbonico. O brometo de metila usado, foi o conhecido comercialmente por "Formicida Blenco", adquirido da "The Dow Chemical Co." consistindo de mistura de 98 % de brometo de metila e 2 % de cloropicri na.

3.2 Métodos

a. Preparo da Amostra

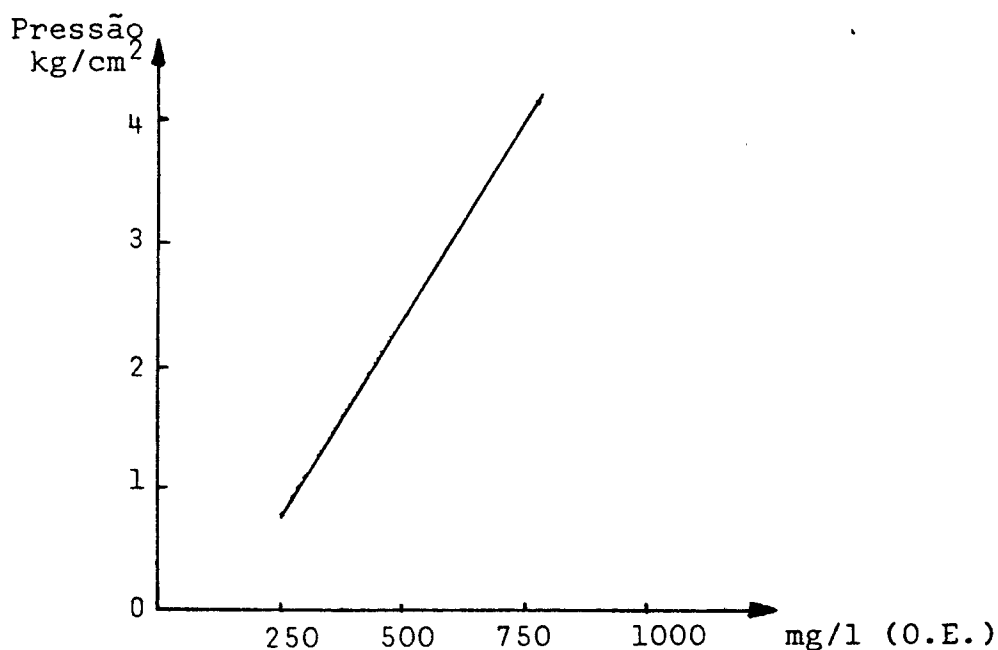
Foi determinada a umidade inicial da amostra pelo método A.O.A.C. (1965). Em seguida foram pesadas amostras de aproximadamente 5 gramas, sendo depois estas colocadas em dessecadores com umidade relativa de 30, 50 e 70 %, para determinar absorção ou dessorção da pimenta. Diariamente era verificada a variação de pêso. Para contrôle da umidade relativa dos dessecadores e da câmara no momento da esterilização, foi usada solução de ácido sulfúrico de acôrdo com WILSON (1921) cuja pressão de vapor foi regulada para que se mantivesse a umidade relativa em valores pré-estabelecidos. As amostras foram pré-condicionadas colocando-se as mesmas nos dessecadores a 30, 50 e 70 % de umidade relativa por cerca de 17 horas antes da esterilização, tempo necessário para que a umidade da pimenta entre em equilibrio com a umidade da atmosfera do dessecador.

### b. Ciclo de Esterilização

O ciclo consistiu em se fazer vácuo até o valôr desejado para o contrôle da concentração de gás e para que ocorresse a difusão do mesmo no alimento. Em seguida, o gás era injetado na câmara até se obter uma pressão que era variável com a concentração desejada de gás. O cálculo da concentração de óxido de etileno foi feito usando se a lei de estado dos gases ideais, MOORE (1968), mas podem ser usados os pêsos específicos e as tabelas fornecidas pela "L'Air Liquide e Union Carbide Co.", como pode ser visto pelas figuras 5 e 6. A concentração de brometo de metila foi calculada pelo pêso específico e controlada pelo vácuo feito na câmara de esterilização.

Para os testes, foram feitos tratamentos da pimenta com óxido de etileno e brometo de metila, separadamente ou em mistura. O tempo de tratamento variou de 4 a 17 horas.

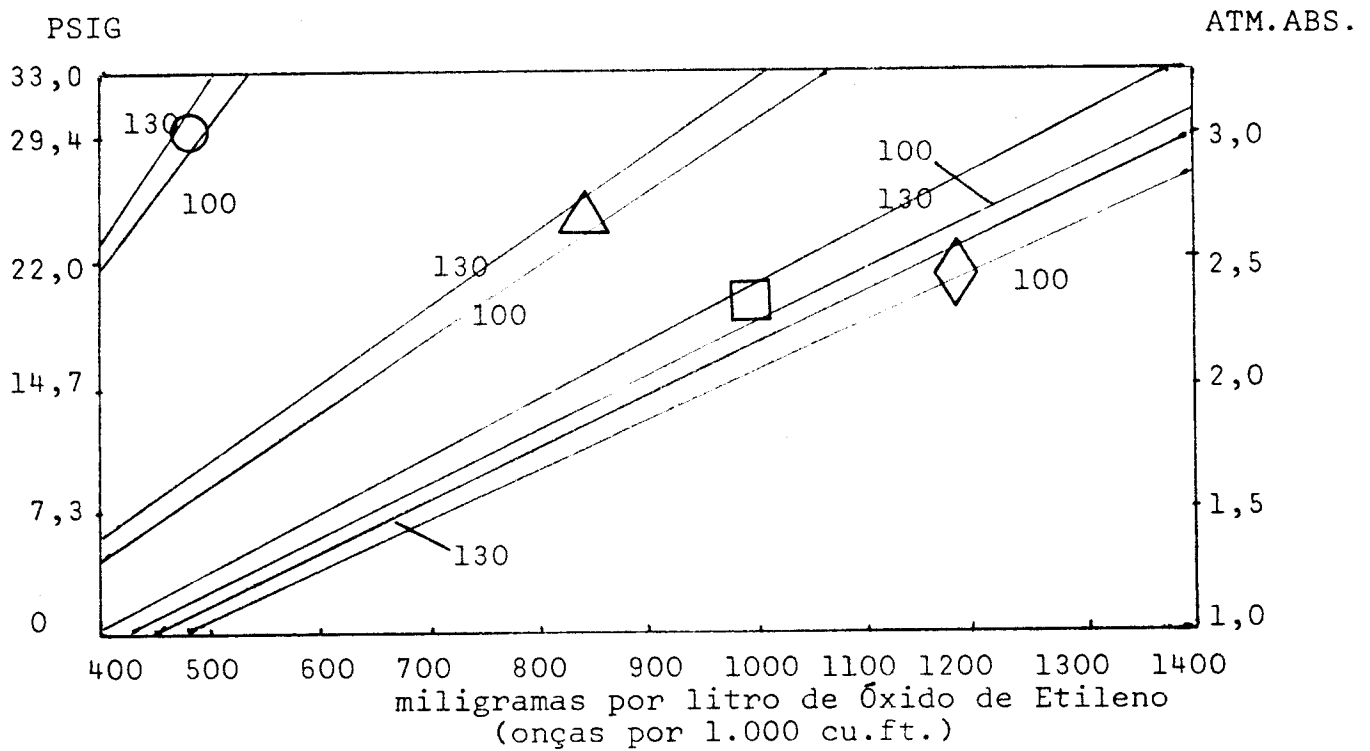
Figura 5: Relação pressão x concentração de O.E. a 54 °C



"Mistura de 10 % de Óxido de etileno e 90 % de gás carbonico"



Figura 6: Concentração de Óxido de Etileno (mg/l), usando "Linde Gases" da Union Carbide a 100 °F e 130 °F.



- - "Carboxide" (10 % O.E. - 90 % CO<sub>2</sub>)
- △ - Oxyfume 20 (20 % O.E. - 80 % CO<sub>2</sub>)
- - Oxyfume 12 (12 % O.E. - 88 % UCON)
- ◇ - Oxyfume 30 (30 % O.E. - 70 % CO<sub>2</sub>)

g. Método Microbiológico

A pimenta preta foi tratada na câmara em porções de 11 gramas para facilitar a diluição durante a contagem microbiológica. Após a esterilização a pimenta era transferida da câmara para um frasco Erlenmeyer de 250 ml, com 99 ml de água esterilizada sendo este colocado no agitador por 10 minutos para a liberação das bactérias. Foram feitas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  que eram a seguir inoculadas em meios de contagem total e de termofílicos aeróbicos de acordo com o método descrito por SHARF (1966). As placas foram incubadas a 32 °C e 55 °C por 48 horas, para contagem total e de termofílicos aeróbicos respectivamente.

Para verificar o poder de penetração dos gases, foram feitos testes triturando-se as amostras em liquidificador "Waring Blendor", após alguns tratamentos com os gases.

#### 4. RESULTADOS

##### 1. Umidade de Equilíbrio em Relação à Umidade Relativa e à Temperatura da Atmosfera.

As figuras 7 e 8 mostram a absorção e dessorção da água na pimenta preta em grão armazenada a diferentes temperaturas e umidades relativas. Observou-se que a 32 °C as umidades da pimenta de 12,76 e 12,32 % entravam em equilíbrio com a atmosfera de umidade relativa de 70 e 50 %, respectivamente. Sendo a pimenta colocada em atmosfera de 30 % de umidade relativa a 32 °C verificou-se o equilíbrio com a atmosfera quando o teor de umidade atingiu 12,03 %.

A 55 °C houve dessorção de água das amostras. As umidades da pimenta que entravam em equilíbrio a 30, 50 e 70 % de umidade relativa foram de 6,16 - 6,29 - 6,42 %, respectivamente.

Figura 7: Umidade de equilíbrio da pimenta a 32 °C.

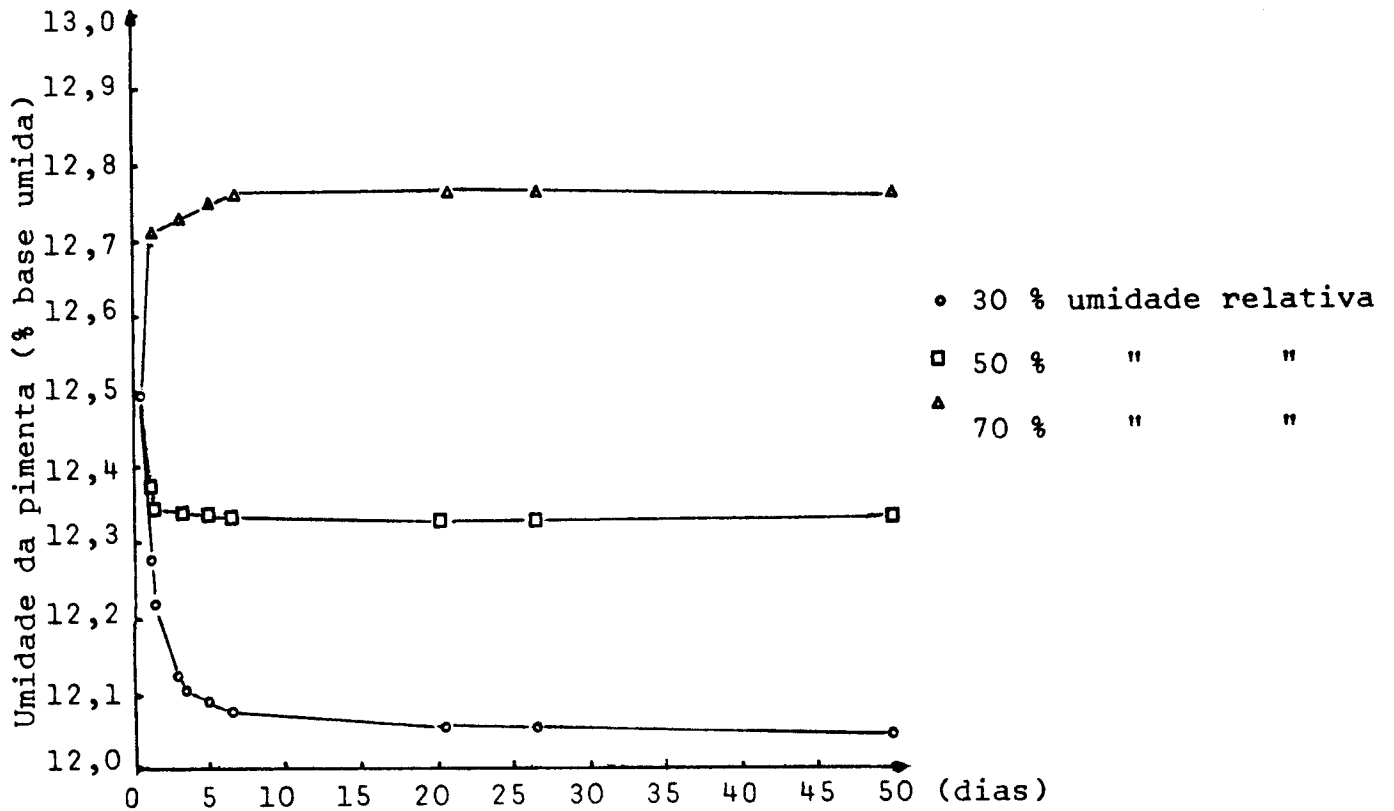
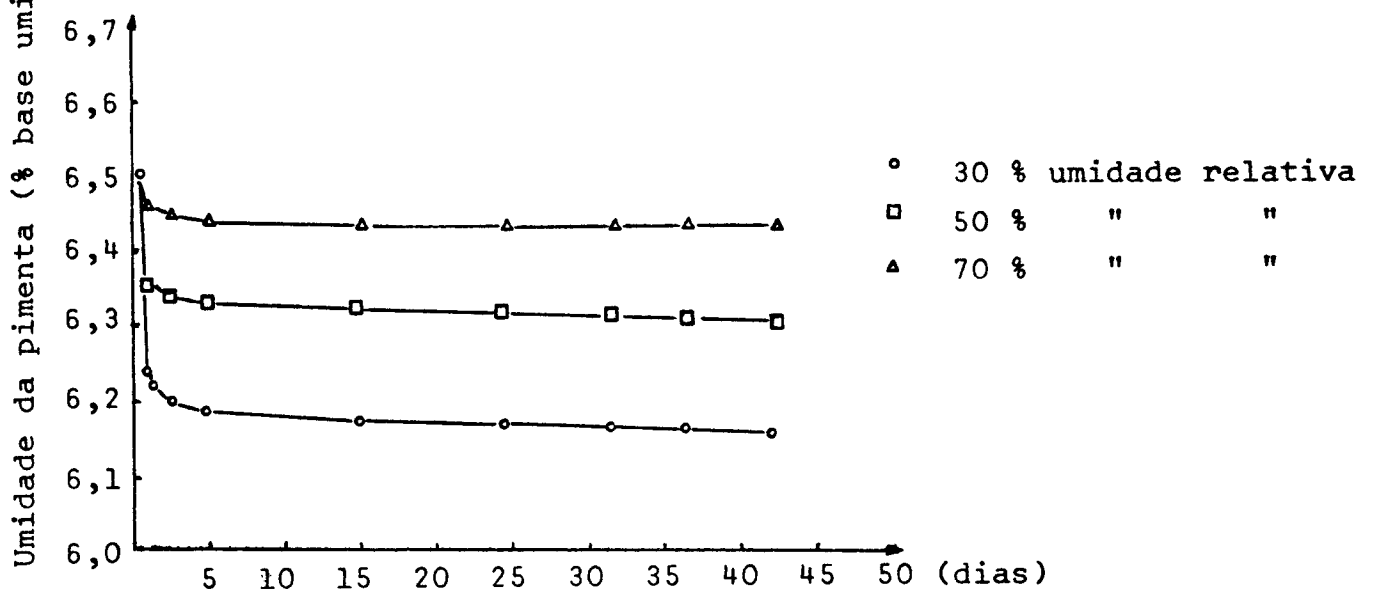


Figura 8: Umidade de equilíbrio da pimenta a 55 °C.



## 2. Contagem Inicial do Número de Bactérias

A concentração total de microrganismos determinada na pimenta preta em grão foi de  $4,2 \times 10^6$  por grama quando se contou apenas os da superfície e  $1,0 \times 10^7$  por grama quando a contagem foi feita triturando o produto em liquidificador. A contagem de bactérias termofílicas foi de  $5,1 \times 10^5$  e  $2,6 \times 10^5$  por grama para pimenta triturada e não triturada, respectivamente.

Tabela 10: Concentração inicial de microrganismos da superfície e do interior da pimenta preta.

<u>Tratamento</u>	<u>Contagem Total a 32 °C</u>	<u>Contagem de Termofílicos a 55 °C</u>
Moído	10.500.000	510.000
Sem moer	4.200.000	260.000

## 3. Tratamento com Óxido de Etileno

Os resultados da pimenta preta em grão tratada com óxido de etileno a 32 °C, durante diferentes tempos estão apresentados na tabela 11. Esses resultados mostram que os tratamentos de 4, 8 e 17 horas com concentração de 360 mg/l do gás, produziu redução da ordem de 70 % em relação à contagem inicial para qualquer umidade relativa testada. O mesmo tratamento conduzido à 55 °C reduziu o número de bactérias para cerca de 400 vezes menos, quando tratados com umidade relativa de 50 ou 70 % e cerca de 150 vezes quando tratados com 30 % de umidade relativa. Com respeito às bactérias termofílicas foi constatado que o tratamento de 17 horas em concentração de 360 mg/l de óxido de etileno, a

55 °C e sob umidade relativa de 50 ou 70 %, foi totalmente eficaz na destruição das bactérias, não se conseguindo nenhum sobrevivente.

Tabela 11: Efeito da variação do tempo de tratamento com óxido de etileno a 32 °C na esterilização da pimenta preta.

Tratamento número	Conc. mg/l	Tempo de tratº. horas	Pressão final lb/pol <sup>2</sup>	Contagem total nº/g	Contagem termofílicos nº/g
1	360	4	(A) 16	1.300.000	46.000
			(B) 18	1.360.000	8.000
			(C) 17	1.040.000	11.500
2	360	8	(A) 10	1.030.000	136.000
			(B) 13	1.130.000	116.000
			(C) 13	1.070.000	60.000
3	360	17	(A) 4	760.000	130.000
			(B) 7	1.150.000	300.000
			(C) 7	975.000	310.000
4 *	360	17	(A) 10	330.000	30.000
			(B) 13	13.000	0
			(C) 10	10.000	0

OBS: Tratamentos (A), (B) e (C) feitos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa, respectivamente.

\* Tratamento a 55 °C

Tratamentos 1, 2, 3 e 4 feitos com 20 polegadas de vácuo a 20 lb/pol<sup>2</sup>.

#### 4. Tratamento com Brometo de Metila

Os resultados da tabela 12 a seguir, dos tratamentos com brometo de metila a 32 °C, com 2.540 mg/l do gás por 8 horas, consegue-se reduzir o número total de microrganismos para 200 vezes menos em umidade relativa de 30 %. Com umidade relativa de 50 % a redução foi para aproximadamente 500 vezes menos. O mesmo tratamento conduzido a 70 % eliminou quase completamente as bactérias, obtendo-se apenas 75 microrganismos mesofílicos por grama e nenhum termofílico.

O tratamento de 17 horas proporcionou redução do número total de bactérias para aproximadamente 1.400 vezes menos a 30 % de umidade relativa sendo que a 50 e 70 % a contagem foi nula.

Tabela 12: Efeito da variação do tempo de tratamento com brometo de metila a 32 °C na esterilização da pimenta preta.

Tratamento número	conc. mg/l	Tempo de tratº. horas	Pressão final lb/pol <sup>2</sup>	Contagem total nº/g	Contagem termofílicos nº/g
1	2.540	8	(A) 1	22.500	8.150
			(B) 1	8.500	3.450
			(C) 1	75	0
2	2.540	17	(A) 1	3.000	260
			(B) 1	0	0
			(C) 1	0	0

OBS: (A), (B) e (C) Tratamentos feitos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa, respectivamente.

Tratamentos 1 e 2 feitos com 20 polegadas de vácuo à 2 lb/pol<sup>2</sup>.

##### 5. Tratamento com Mistura de Óxido de Etileno e Brometo de Metila

Os resultados da pimenta preta tratada a 32 e 55 °C com Óxido de etileno e brometo de metila estão apresentados na tabela 13. O tratamento conduzido por 4 horas de exposição com mistura de 1.080 mg/l de brometo de metila e 140 mg/l de Óxido de etileno reduziu para cerca de 75 vezes menos, a quantidade inicial de microrganismos a 30 % de umidade relativa. A eficiência na redução do número de microrganismos a 50 % de umidade relativa foi cerca de 40 vezes menos e 350 vezes menos a 70 % de umidade relativa.

O tratamento por 4 horas com o dobro da concentração de brometo de metila e 370 mg/l de Óxido de etileno, mostrou-se bastante eficiente, sendo nula a contagem de termofílicos. Em 70 % de umidade relativa a eficiência dos gases foi maior do que a 30 e 50 %, tendo reduzido o número inicial para aproximadamente 4.000 vezes menos.

O tratamento anterior conduzido por 8 horas de exposição, foi muito eficiente não se conseguindo contagem de termofílicos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa e obtendo-se eliminação de cerca de 99,99 % na contagem total dos microrganismos. O aumento de tempo para 17 horas com redução de brometo de metila para 540 mg/l e de Óxido de etileno para 58 mg/l, mostrou-se bastante interessante do ponto de vista prático pois com baixas concentrações dos gases foi grande a eliminação de microrganismos da ordem de 2.800, 7.000 e 4.000 vezes menos que o número inicial, respectivamente para 30, 50 e 70 % de umidade relativa. O tratamento com o dobro das concentrações dos gases mostrou-se ainda mais eficiente, não se obtendo contagem de termofílicos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa.



Com tratamento à 70 % de umidade relativa, obteve-se contagem nula de bactérias mesofílicas. Em umidades relativas de 30 e 50 % as contagens foram 105 e 30 bactérias por grama, respectivamente. Esse mesmo tratamento conduzido à 55 °C não apresentou contagem de termofílicos a 50 e 70 % de umidade relativa, mas a 30 % a redução foi para aproximadamente 100 vezes menos que o número inicial. A contagem total foi decrescente com o aumento da umidade relativa reduzindo para 800, 28.000 e 420.000 vezes menos em 30, 50 e 70 % de umidade relativa, respectivamente.

Tabela 13: Efeito da combinação de Óxido de etileno e brometo de metila na esterilização da pimenta preta.

Tratº. nº.	Conc. mg/l		Tempo de Tratº. horas	Pressão final lb/pol <sup>2</sup>	Contagem Total nº/g	Contagem Termofilicos nº/g
	Brom.Met.	Ox.Etil.				
1	1.080	140	4	(A) 8	58.000	60
				(B) 7	114.000	60
				(C) 8	12.000	0
2	2.100	370	4	(A) 11	16.000	0
				(B) 10	2.300	0
				(C) 12	1.080	0
3	2.100	370	8	(A) 10	650	0
				(B) 12	60	0
				(C) 12	30	0
4	540	58	17	(A) 4	1.500	600
				(B) 4	600	250
				(C) 3	1.070	30
5	1.080	140	17	(A) 8	105	0
				(B) 7	30	0
				(C) 8	0	0
* 6	1.080	140	17	(A) 6	5.200	2.500
				(B) 8	150	0
				(C) 4	10	0

Tratamentos:

- 1, 5 e 6 - Brometo de metila de 10 a 0 pol. de vácuo e óxido de etileno de 0 a 10 lb/pol<sup>2</sup>
- 2 e 3 - Brometo de metila de 20 a 0 pol. de vácuo e óxido de etileno de 0 a 20 lb/pol<sup>2</sup>
- 4 - Brometo de metila de 5 a 0 pol. de vácuo e óxido de etileno de 0 a 5 lb/pol<sup>2</sup>
- (A), (B) e (C) Feitos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa, respectivamente.
- \* Feito a 55 °C.

## 6. Efeito da proporção dos gases na esterilização

A tabela 14, mostra os resultados da variação da proporção dos gases no tratamento da pimenta preta com 8 e 17 horas de exposição a 32 °C. Com 8 horas de exposição nas proporções de brometo de metila e Óxido de etileno de aproximadamente 1:1, 3:1, 6:1, respectivamente, houve aumento da eficiência do tratamento com o aumento da proporção de brometo de metila. Com proporção de aproximadamente 1:6 ou seja 370 mg/l de Óxido de etileno e 2.100 mg/l de brometo de metila, não se conseguiu obter contagem de termofílicos nas umidades relativas usadas. A contagem total sofreu redução com o aumento da umidade relativa, tendo se obtido eliminação de cêrca de 99,99 % do número de microrganismos para as umidades relativas usadas.

Com o tratamento de 17 horas de exposição e proporções de aproximadamente 3:1, 4:1 e 10:1, de brometo de metila e Óxido de etileno, respectivamente, mostraram-se com eficiência pratica maior à medida que aumentava a proporção dos gases para 10:1, independentemente da concentração.

O tratamento com 540 mg/l de brometo de metila e 58 mg/l de Óxido de etileno apresentou redução de 99,98 % do número de microrganismos para às umidades relativas de 30, 50 e 70 %.

Os tratamentos com proporções de 3:1 e 4:1, mostraram-se bastante eficientes a 70 % de umidade relativa, pois não apresentaram contagem de termofílicos nessa umidade relativa e a redução do número total de microrganismos foi de 99,999 %.

Às umidades relativas de 30 e 50 % a destruição de microrganismos totais foi de 99,9 % e de microrganismos termofílicos de 98,7 % portanto menos eficiente que no caso de 70 % de umidade relativa.

Tabela 14: Efeito da variação da proporção de brometo de metila com óxido de etileno na esterilização.

Tratº. nº.	Conc. mg/l		Tempo de Tratº. horas	Pressão final lb/pol <sup>2</sup>	Contagem Total nº/g	Contagem Termofílicos nº/g
Brom.Met.	Ox.Etil.					
1	540	458	8	(A) 16	13.200	9.200
				(B) 17	11.100	4.200
				(C) 15	5.600	5.800
2	1.080	428	8	(A) 13	9.500	6.900
				(B) 17	1.400	640
				(C) 15	34.000	8.600
3	2.100	370	8	(A) 10	650	0
				(B) 12	60	0
				(C) 12	30	0
4	540	58	17	(A) 4	1.500	600
				(B) 4	600	250
				(C) 3	1.070	30
5	1.080	428	17	(A) 15	6.300	3.400
				(B) 10	5.200	2.100
				(C) 6	35	0
6	1.600	406	17	(A) 10	6.900	3.400
				(B) 9	4.200	1.800
				(C) 5	20	0

Tratamentos:

- 1 Brometo de metila de 20 a 15 pol. de vácuo e óxido de etileno de 15 pol. de vácuo até 20 lb/pol<sup>2</sup>
- 2 e 5 Brometo de metila de 20 a 10 pol. de vácuo e óxido de etileno de 10 pol. de vácuo até 20 lb/pol<sup>2</sup>
- 3 Brometo de metila de 20 a 0 pol. de vácuo e óxido de etileno de 0 pol. até 20 lb/pol<sup>2</sup>
- 4 Brometo de metila de 5 pol. de vácuo a 0 e óxido de etileno de 0 a 5 lb/pol<sup>2</sup>
- 6 Brometo de metila de 20 a 5 pol. de vácuo e óxido de etileno de 5 pol. de vácuo até 20 lb/pol<sup>2</sup>

(A), (B), (C) Feitos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa, respectivamente.

### 7. Capacidade de penetração dos gases juntos e separados

Pela contagem inicial de bactérias feita sem e com trituração em liquidificador, notou-se que cêrca de 50 % das mesmas não eram facilmente removíveis (ver tabela 10). Muito provavelmente grande parte das bactérias estão na parte interna dos grãos. Para verificar a possibilidade de não haver penetração suficiente dos gases que inativavam as bactérias no interior dos grãos, foram feitos experimentos fazendo-se contagem de bactérias sobreviventes naqueles dois casos. (tabela 15).

Os resultados mostraram que nos tratamentos com óxido de etileno e brometo de metila isolados, havia tendência para destruir mais as células da superfície do que as do interior, e com os gases misturados, as bactérias eram igualmente destruídas, quer do interior quer da superfície.

Tabela 15: Efeito dos gases sobre bactérias internas e de superfície da pimenta.

Tratº. nº	Conc. mg/l Brom.Met.	Ox.Et.	Tempo de Tratº horas	Pressão final lb/pol <sup>2</sup>	Contagem total nº/g	Contagem termofílicos nº/g
1	2.540	-	17	(A) 1	260.000	2.800
				(B) 1	400.000	48.000
				(C) 1	0	0
2	2.540	-	17	(A) 1	52.000	0
				(B) 1	22.000	0
				(C) 1	0	0
3	-	360	17	(A) 12	2.400.000	2.200.000
				(B) 12	2.500.000	2.320.000
				(C) 12	3.400.000	2.320.000
4	-	360	17	(A) 12	1.800.000	560.000
				(B) 12	2.000.000	750.000
				(C) 12	2.200.000	760.000
5	2.100	370	17	(A) 13	74.000	0
				(B) 15	300	0
				(C) 15	600	0
6	2.100	370	17	(A) 13	3.500	200
				(B) 15	900	0
				(C) 15	450	0

Tratamentos:

2, 4 e 6 - A amostra de pimenta foi somente homogeneizada.

1, 3 e 5 - A amostra de pimenta foi triturada em liquidificador

(A), (B) e (C) - Feitos a 30, 50 e 70 % de umidade relativa, respectivamente.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 1. Umidade de Equilíbrio do Alimento

A umidade de equilíbrio do alimento depende de alguns fatores tais como tamanho da câmara, temperatura, umidade relativa, estrutura, composição e umidade total inicial, necessitando um estudo prévio das melhores condições para cada caso de esterilização.

Para fins práticos, acondicionamento de 17 horas é suficiente para o alimento entrar em equilíbrio com certo teor de água para facilitar a esterilização. Após esse período a absorção ou a dessorção são bem menores e podem ser verificadas pelas figuras 7 e 8.

### 2. Contagem Inicial do Número de Bactérias

Verificou-se que cerca de metade do número de bactérias na pimenta preta se encontra na parte interna dos grãos sendo liberadas quando se faz a trituração para a contagem. O óxido de etileno tem poder de penetração bastante limitado o que consiste em problema para as indústrias que esterilizam condimentos nos Estados Unidos, pois nesse país só é permitido o uso do gás na esterilização da pimenta inteira (SAIR 1972).

O problema poderia ser resolvido com o uso de mistura adequada de gases que aumentasse a penetração para assim conseguir a eliminação das bactérias do interior dos grãos.

### 3. Tratamento com Óxido de Etileno

O tratamento com óxido de etileno para esterilização, usando

o gás "Carbetil" da " Oxigenio do Brasil S.A.", que contém 90 % de gás carbonico e 10 % de Óxido de etileno, permite utilizar concentração de Óxido de etileno de 360 mg/l quando se faz vácuo de 20 polegadas em uma câmara de esterilização, substituindo o ar retirado com a mistura até pressão de 20 lb/pol<sup>2</sup>. O gás carbonico é bacteriostático e é usado para vários fins em alimentos não tendo qualquer efeito nocivo sobre a pimenta, nem sobre a esterilização.

Embora essa mistura de gases seja usada para esterilização de instrumentos sirurgicos, nessa concentração é ineficiente para a esterilização da pimenta preta em grão. Tratamento prolongado de 17 horas em ambiente de umidade relativa de 50 % ou mais, permite reduzir o número de bactérias de aproximadamente 70 %, o que não é suficiente na prática de esterilização da pimenta. A concentração máxima admissivel de bactérias na pimenta após o tratamento é de 10.000 germes por grama para fins práticos (SAIR 1972), o que não seria conseguido quando se tivesse uma concentração inicial de mais de 1.000.000 bactérias por grama.

Normalmente se deveria usar concentração acima de 800 mg/l de Óxido de etileno para a esterilização de condimentos, e em equipamento especial devido a alta pressão necessária para a obtenção dessa concentração, quando o gás aplicado é o "Carbetil", ver figuras 5 e 6.

O tratamento com Óxido de etileno a 55 °C foi mais eficiente do que a 32 °C e os resultados estão de acordo com a orientação dada por PERKINS (1969) que aconselha temperatura de 49 a 60 °C para a esterilização.



Com o aumento do período de exposição, de 4 para 17 horas não se conseguiu aumentar muito a eficiência da esterilização, devido à baixa concentração de óxido de etileno usada. Esses resultados estão de acordo com os de GILBERT e colaboradores (1964).

#### 4. Tratamento com Brometo de Metila

O tratamento com brometo de metila usando "Formicida Blenco" da "The Dow Chemical Co." que contém 98 % de brometo de metila e 2 % de cloropicrina, permite destruir bactérias da pimenta preta usando-se concentração aproximadamente 50 vezes maior que a da concentração usada para fumigação. Essa mistura é usada normalmente em fumigação de alimentos, em concentrações variando de 10 a 50 mg/l, não tendo qualquer efeito nocivo sobre a pimenta preta (MONRO 1962).

A concentração usada para se conseguir esterilização é bastante alta, não sendo aconselhável o seu uso na prática devido à grande quantidade que poderia permanecer no alimento como resíduo.

#### 5. Tratamento com Mistura de Óxido de Etileno e Brometo de Metila

Para testar o efeito sinérgico dos gases, foram usadas concentrações variando de 540 a 2.100 mg/l de brometo de metila e 58 a 458 mg/l de óxido de etileno. Houve queda de pressão na câmara após 4, 8 e 17 horas de tratamento, mostrando a diminuição da concentração dos gases o que é devido principalmente a absorção, adsorção e polimerização do óxido de etileno, assim como a vazamento ocorrido na própria câmara de esterilização. No presente trabalho procurou-se relacionar apenas o efeito bactericida dos gases na destruição dos microrganismos, necessitando estudos posteriores a verificação da influência daqueles fatores na esterilização,

assim como a análise dos resíduos formados em cada tratamento.

Nas concentrações usadas, com o aumento da umidade relativa de 30 para 70 % houve tendência para eliminação de maior quantidade de microrganismos, o que está de acordo com o trabalho de Perkins e Lloyd. O aumento do tempo de 4 para 17 horas quando se usava a mesma concentração de gás melhorava bastante a eficiência na esterilização.

O efeito sinérgico é observado quando se compara o tratamento 3 da tabela 11 com o tratamento 4 da tabela 14, onde por redução da quantidade de óxido de etileno, se conseguiu eliminar quase totalmente as bactérias da amostra.

Esse efeito também pode ser observado para o brometo de metila quando se compara o tratamento 2 da tabela 12 com o tratamento 4 da tabela 14, no qual usando se aproximadamente a quinta parte da concentração de brometo de metila com apenas 58 mg/l de óxido de etileno, se conseguiu efeito praticamente equivalente.

O aumento de temperatura para 55 °C não melhora muito a eficiência da esterilização quando comparado com tratamento nas mesmas condições a 32 °C. Isso se deve provavelmente à alta secagem que ocorre na pimenta durante o acondicionamento à alta temperatura. Por isso é aconselhável o uso da temperatura de 55 °C para a esterilização, porém com acondicionamento em temperatura inferior.

#### 6. Efeito da Proporção dos Gases na Esterilização

A proporção de mistura de gás demonstrou ser outro fator importante na esterilização com tratamento de 8 e 17 horas de exposição a 32 e 55 °C. A proporção crescente de 1:1 até 1:10 de óxido de

etileno e brometo de metila, aumentou proporcionalmente a eficiência da esterilização. Com baixa concentração, mas na proporção de 1:10, a eficiência dos gases é grande mesmo quando se compara com aproximadamente o quadruplo da concentração dos dois gases, mas em proporções diferentes.

O brometo de metila tem poder bactericida dez vezes menor que o óxido de etileno de acordo com PHILLIPS citado por HUGO (1971) mas devido ao seu alto poder de penetração quando é usado em mistura com óxido de etileno aumenta muito a eficiência do tratamento, devido a um efeito sinérgico, obtendo-se bons resultados finais na destruição de bactérias.

## 7. Resíduos

Devido à baixa umidade e à inexistência de qualquer composto clorado na pimenta, os resíduos de etileno glicol e etileno cloridrato, são insignificantes, podendo porém permanecer relativamente alta porcentagem de etileno bromidrato, devido ao uso de brometo de metila. Embora ocorra a possibilidade de formação desses resíduos, eles são facilmente eliminados por aeração, mas mesmo assim há necessidade de sua determinação em estudos posteriores.

Quando se considera a pimenta negra como "alimento", mesmo assim o resíduo pode ser considerado insignificante, pois o seu consumo é mínimo. Muito diferente porém seria o caso de farinha ou outro alimento comum em regime alimentar humano diária e consumido em grande quantidade.

De acordo com FURIA (1968) a concentração de pimenta preta que normalmente é usada em embutidos de carne, é da ordem de 0,1 a 0,3 % o que torna insignificante o teor de resíduo no produto final.

## 6. CONCLUSÕES

1. O óxido de etileno comercial em mistura com gás carbonico é muito difícil de ser usado sozinho na esterilização de condimentos. A concentração de 360 mg/l na câmara, conseguida pela retirada do ar com vácuo de 20 polegadas e adição da mistura até 20 lb/pol<sup>2</sup>, não é suficiente para proporcionar "esterilização comercial" da pimenta preta em grão.
2. O brometo de metila é um agente eficiente na destruição de bactérias quando usado na concentração de 2.540 mg/l.
3. À temperatura de 55 °C tem efeito mais pronunciado do que à 32 °C na esterilização.
4. A mistura de brometo de metila e óxido de etileno tem maior efeito letal sobre as bactérias contaminantes do produto alimenticio do que os gases isoladamente.
5. A umidade relativa de 50 % ou mais aumenta a eficiência na esterilização do condimento pelos gases usados.
6. A melhor proporção da mistura de gases para a destruição de bactérias é de pelo menos 10 partes de brometo de metila para 1 de óxido de etileno.
7. O tratamento da pimenta preta com 540 mg/l de brometo de metila e 58 mg/l de óxido de etileno por 17 horas, mostrou ser o mais eficiente.
8. Na esterilização da pimenta do reino preta deve ser levado em consideração que aproximadamente 50 % dos microrganismos contaminantes podem se encontrar na parte interna dos grãos.

7. BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C. - Official methods of analysis of Association of Official Agriculture Chemists. Washington, D.C. 10 th.ed.1965.
- BLACKE, D.F. & STUMBO, C.R. - Ethylene oxide resistance of microorganisms: Important in spoilage of acid and high-acid foods. *Journal of Food Science* 35:26-29, 1970.
- ERNST, R.B. & SHULL, J.J. - Ethylene oxide gaseous sterilization. I concentration and temperature effects. *Appl. Microbiol.*, 10:337-341, 1962.
- - Ethylene oxide gaseous sterilization  
II influence of method of humidification. *Appl. Microbiol.*, 10:342-344, 1962.
- FRIEDL, J.L.; ORTENZIO, LF. & STUART, L.S. - The sporocidal activity of ethylene oxide as measured by the A.O.A.C. sporicide test. *Association of Official Agriculture Chemists* 39(2):480-483, 1956.
- FURIA, T.E. - Handbook of Food Additives. Ohio. The Chemical Rubber Co., 1968. p.193-195.
- GILBERT, G.L.; et al. - Effect of moisture on ethylene oxide sterilization. *Appl. Microbiol.* 12(6):496-503, 1964.
- HAENNI, E.O.; et al. - New nonflammable formulations for sterilizing sensitive materials. *Industrial and Engineering Chemistry* 51(5):685-688, 1959.

- HUGO, W.B. - Inhibition and destruction of the microbial cell. London, Ed. Academic Press, 1971. p.225-258.
- JAMES, L.H. - Reducing the Microbial content of spices. Food Industries 8:428-429, 1938.
- L'AIR LIQUIDE Service Agriculture - Alimentation. Bulletin: Sterilisation, Desinfection et Desinsectisation par les Melanges Oxyde d'ethylene-anhydride carbonique et oxyde d'ethylene-freons, Paris, 6, 1968.
- LAUG, E.P. - Bromide residues in foodstuffs. Industrial and Engineering chemistry 33(6):803-805, 1941.
- LIU, T.S.; HOWARD, G.L. & STUMBO, C.R. - Dichlorodifluoromethane-Ethylene oxide mixture as a sterilant at elevated temperatures. Food Technology 22(1):86-89, 1968.
- LLOYD, A.H. - Sterilized spices: New factor in food quality control. Food Industries 8:424-425, 1938.
- MACLACHLAN, D.S.; et al. - Fumigation of used bags with toxic gases for the control of bacterial ring rot of potato. Canadian Journal of Agricultural Science 33(3-4):132-140, 1953.
- MANUFACTURING CHEMISTS ASSOCIATION - Properties and Essential Information for Safe Handling and use of Methyl Bromide. Chemical safety data sheet SD-35, Washington, 1968.
- Properties and Essential Information for Safe Handling and use of Ethylene Oxide. Chemical safety data Sheet SD-38, Washington, 1971.
- MAYR, G. & KAEMMERER, H. - Fumigation with ethylene oxide. Food Manufacture 4:169-170, 1959.

- MICHAEL, G.T. & STUMBO, C.R. - Ethylene oxide sterilization of Salmonella senftenberg and Escherichia coli: Death kinetics and mode of action. *Journal of Food Science* 35:631-633, 1970.
- MICRO-BIOTROL CO. - Boletim Vacugas, Illinois.
- MONRO, H.A.U. - Manual de Fumigacion contra Insectos. Roma, Ed. Organizacion de las Naciones para la Agricultura y la Alimentacion. 1962.
- MOORE, W.J. - (Fisico-Quimica), Rio de Janeiro, Ed. Ao Livro Tecnico, 1968.
- MORENO, A.G. - Contribuição para o estudo de alguns métodos de contaminantes da pimenta-do-reino, variedades preta e branca utilizadas, como condimento na indústria da carne. São Paulo 1971 (Tese Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo).
- PAPPAS, H.J. & HALL, L.A. - The control of thermophilic bacteria. *Food Technology* 12:456-458, 1952.
- PERKINS, J.J. - Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences. 2<sup>rd</sup>. Ed. Illinois, Charles C. Thomas, 1969. p. 501-530.
- RAUSCHER, H.; MAYR, G. & KAEMMERER, H. - Ethylene oxide for cold sterilization. *Food Manufacture* 4:169-172, 1957.
- RICHARDSON, L.T. & MONRO, H.A.U. - Fumigation of jute bags with ethylene oxide and methyl bromide to eradicate potato ring rot bacteria. *Appl. Microbiol.*, 10:448-451, 1962.
- ROEHM, L.S.; SHRADER, S.A. & STENGER, V.A. - Bromide residues in cereals fumigated with methyl bromide. *Cereal Chem.* 19(3): 235-242, 1942.

- SAIR, L. - Two-step method for producing sterilized ground spices  
U.S. Pat. n<sup>o</sup> 3.647.487, 1972.
- SAVAGE, R.A. & STUMBO, C.R. - Characteristics of Progeny of Ethylene oxide treated Clostridium bolulinum type 62 A spores.  
Journal of Food Science, 36:182-184, 1971.
- SCUDAMORE, K.A. & HEUSER, S.G. - Ethylene oxide and its persistent reaction products in wheat flour and other commodities: Residues from fumigation or sterilisation, and effects of processing. Pestic. Sci., 2(3-4):80-91, 1971.
- SHARF, J.M. - Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2<sup>rd</sup> Ed. American Public Health Association, Inc., 1966.
- UNION CARBIDE - Gas products. Buletin Linde gas sterilants, New York, p. 12
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE - Food and Drug Administration - Maryland. Federal Register 2, p. 453, 1969.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE - Food and Drug Administration - Maryland, Food and Drugs p. 370, 389, 422, 1966.
- YESAIR, J. & WILLIAMS, O.B. - Spice contamination and its control  
Food Research 7:118-126, 1942.



WILSON, R.E. - Humidity control by means of sulfuric acid solutions, with critical compilation of vapor pressure, Data. The Journal of Industrial and Engineering Chemistry 13(4): 326-331. 1921.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Evaluation of some pesticide residues in food. WHO Pesticide Residues Series n° 1, Geneva. p. 280:288, 1972.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fumio Yokoya pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos Dr. André Tosello pelo apoio fornecido.

Aos professores Dr. Jorge Leme Junior e Emilio Contreras pela colaboração e interesse demonstrado.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

SERVIÇOS GRÁFICOS EXECUTADOS PELA  
FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
RUA DR. PELÁGIO LOBO Nº 63 - TEL. 8.78.22  
13100 - CAMPINAS - SÃO PAULO - BRASIL