



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SECÇÃO CIRCULANTE

**VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO
PARA POLPA DE TOMATE EM UNIDADE UHT**

CRISTIANA DE PAULA PACHECO

Engenheira de Alimentos

Orientadora : Prof^a Dr^a Pilar Rodriguez de Massaguer

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do grau de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – SP
2001

i



000114255

UNIDADE	Be		
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP		
	P115v		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	45277		
PROC.	16-292/01		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00		
DATA	07/10/01		
N.º CPD			

CM00157798-9

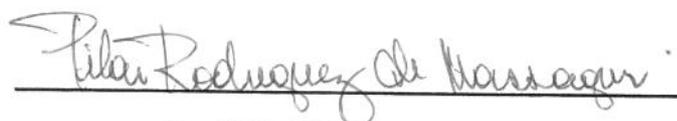
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P115v Pacheco, Cristiana de Paula
Validação do processo de esterilização para polpa de
tomate em unidade UHT / Cristiana de Paula Pacheco. –
Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Esterilização. 2.Produtos de tomate. 3.Fungos.
4.Bacillus (Bactéria). I.Massaguer, Pilar Rodriguez de.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Pilar Rodriguez de Massaguer
(orientadora)



Prof. Dr. Gustavo Ferreira Leonhardt
(miembro)



Profª Drª Hilary C. de Menezes
(miembro)

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(suplente)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1 – Deterioração de Alimentos por Fungos Termorresistentes.....	5
1.1 – <i>Características Gerais</i>	5
1.2 – <i>Efeitos da Contaminação</i>	7
1.3 – <i>Níveis Aceitáveis de Contaminação</i>	9
1.4 – <i>Produção e Ativação de Ascosporos</i>	10
1.5 – <i>Fatores que Afetam a Resistência Térmica dos Ascosporos</i>	12
1.6 – <i>A Cinética de Inativação</i>	15
1.7 – <i>O método de Linearização de Alderton e Snell (1970)</i>	17
2 – Deterioração de Alimentos por <i>Bacillus coagulans</i>	18
3 – Esterilização Contínua em Sistemas Assépticos	21
4 – Técnicas de Validação Biológica de Processos Térmicos Contínuos para Alimentos	
Fluídos.....	24
4.1 – <i>Inoculação Direta de Esporos Livres no Produto Antes do Aquecimento</i>	26
4.2 – <i>Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados em Alginato de Sódio no Alimento Antes do Tratamento Térmico</i>	27
5 – Bioindicadores	27
5.1 – <i>O alginato</i>	29
5.2 – <i>Considerações para Escolha do Bioindicador</i>	32
5.3 – <i>Métodos de Contagem dos Sobreviventes a partir dos Bioindicadores</i>	34
6 – Opções para Seleção do Microrganismo Teste.....	37
7 – Aplicação de Bioindicadores em Processamento de Alimentos.....	38
8 – A Unidade de Processamento Contínuo Asséptico <i>Microthermics</i> UHT-HTST Lab-25-DH	44
9 – Esterilização e Limpeza CIP da Unidade Asséptica.....	46

10 – O Valor de Esterilização	50
10.1 – Considerações sobre o Método do Ponto Equivalente.....	51
MATERIAIS E MÉTODOS	55
1 – Fluxograma do Trabalho Prático	55
2 – A Matéria-prima	57
3 – As Culturas.....	57
4 – A Embalagem	57
5 – Os Sanitizantes	58
6 – A Desaeração da Polpa de Tomate 8°BRIX	58
7 – Metodologia para Produção, Coleta dos Esporos e Ativação Térmica de <i>Neosartorya fischeri</i> e de <i>Bacillus coagulans</i>	60
7.1 – Produção e Coleta dos Esporos.....	60
7.2 – Ensaio de Ativação Ótima dos Esporos	61
7.3 – Contagem da Suspensão de <i>Neosartorya fischeri</i> e de <i>Bacillus coagulans</i>	62
8 – Avaliação Esporicida do Mikro Chlor e do P ₃ Oxônia.....	63
8.1 – Avaliação do Mikro Chlor.....	63
8.2 – Avaliação do P ₃ Oxônia	64
9 – Validação do Processo Térmico Utilizando Suspensão de Ascosporos Livres de <i>Neosartorya fischeri</i>	64
9.1 – Parâmetros de Destruição Térmica Utilizados	65
9.2 – Cálculo do Inóculo.....	65
9.3 – Inoculação Direta dos Ascosporos de <i>Neosartorya fischeri</i>	66
10 – Validação da Esterilização de Polpa de Tomate Utilizando Esporos Imobilizados de <i>N. fischeri</i> e de <i>B. coagulans</i> em Alginato de Sódio.....	67
10.1 – Parâmetros de Destruição Térmica Utilizados para Ascosporos Imobilizados de <i>Neosartorya fischeri</i>	68
10.2 – Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica Utilizados para Esporos Imobilizados de <i>Bacillus coagulans</i>	69
10.3 – Preparo dos Bioindicadores	71
10.4 – Inoculação e Recuperação dos Bioindicadores.....	72
11 – Operação da Unidade Asséptica Microthermics UHT-HTST Lab 25-DH.....	74
11.1 – O Fluxograma da Unidade Asséptica	74
11.2 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV com 3 Tubos de Retenção	75
11.3 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV Somente com Aquecedores e Resfriadores	76
11.4 – A Esterilização da Unidade Asséptica	77
11.5 – O Processamento com Inoculação Direta de Esporos	80
11.6 – O Processamento com Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados.....	80

11.7 – A Limpeza CIP	81
11.8 – Desligando o Equipamento	82
12 – Cálculo do Valor F_s e F_0	82
13 – A Velocidade do Fluido na Unidade Asséptica	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
1 – Metodologia para Produção, Coleta dos Esporos e Ativação Térmica de <i>Neosartorya fischeri</i> e de <i>Bacillus coagulans</i>	87
1.1 – Contagem da Suspensão de Ascosporos de <i>Neosartorya fischeri</i>	87
1.2 – Contagem da Suspensão de Esporos de <i>Bacillus coagulans</i> CCT 2467	88
2 – Avaliação da Ação Esporicida do Mikro Chlor e do P₃ Oxônia	88
2.1 – Avaliação do Mikro Chlor a 150ppm	88
2.2 – Avaliação do P ₃ Oxônia	89
3 – Inoculação Direta de Ascosporos Livres de <i>Neosartorya fischeri</i>	90
3.1 – Cálculo do Inóculo	90
3.2 – Esterilização da Unidade Asséptica Microthermics para Inoculação Direta	91
3.3 – Os Processos de Inoculação Direta de Ascosporos Livres de <i>N. fischeri</i>	92
4 – Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados de <i>Neosartorya fischeri</i> e de <i>Bacillus coagulans</i> em Alginato/Tomate	99
4.1 – Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica para Ascosporos Imobilizados de <i>N. fischeri</i> em alginato/tomate	99
4.2 – Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica para Esporos Imobilizados de <i>B. coagulans</i> em alginato/tomate	105
4.3 – Padronização das Esferas de Alginato de Sódio com Suspensão de <i>N. fischeri</i>	109
4.4 – Padronização das Esferas de Alginato de Sódio com Suspensão de <i>B. coagulans</i>	110
4.5 – Esterilização da Unidade Asséptica Microthermics para Inoculação Indireta	111
4.6 – Os Processos de Inoculação Indireta de Ascosporos Imobilizados de <i>N. fischeri</i> em Alginato/Tomate	112
4.7 – Os Processos de Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados de <i>B. coagulans</i> em Alginato/Tomate	119
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
APÊNDICE	143
Apêndice 1 – Figuras da Unidade Asséptica Microthermics e do fungo <i>N. fischeri</i>	143
Apêndice 2 – Programação do Controle Automático de Enchimento	151
Apêndice 3 – Certificação da Capela de Fluxo Laminar*	152
Apêndice 4 – Meios de Cultura e Soluções Utilizadas	153

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Microrganismos, associados a alimentos, utilizados como bioindicadores</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 2 - Contagem da população média da suspensão de ascósporos de <u>N. fischeri</u>.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 3 - Contagem da população média da suspensão de esporos de <u>B. coagulans</u></i>	<i>88</i>
<i>Tabela 4 - Caracterização da avaliação do Mikro Chlor.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 5 - Caracterização da avaliação do P₃ Oxônia</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 6 - Cálculo do volume de inóculo para metodologia de inoculação direta.....</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 7 - Condições mínimas dos processos de esterilização da unidade asséptica para metodologia de inoculação direta.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 8 - Condições de processamento da polpa de tomate para inoculação direta</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 9 - Resultado dos processos de inoculação direta de <u>N. fischeri</u></i>	<i>92</i>
<i>Tabela 10 – Mínimas temperaturas verificadas durante processos de inoculação direta de <u>N. fischeri</u> em polpa de tomate.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 11 – Tempos de permanência calculados baseando-se na velocidade média 0.406 m/s em cada etapa do processo em unidade UHT com fluxo de 1 l/min e distância entre os pontos de medição de temperatura.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 12 – Faixa de variação de temperatura, no tubo de retenção, verificada durante processos de inoculação direta de <u>N. fischeri</u> em polpa de tomate</i>	<i>96</i>
<i>Tabela 13 - Resultado do ensaio de termorresistência de ascósporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate por enumeração direta dos sobreviventes (em UFC/ml)</i>	<i>100</i>
<i>Tabela 14 – Análise estatística para determinação do expoente “a”</i>	<i>101</i>
<i>Tabela 15 – Análise estatística de regressão e anova para determinação do valor D a cada temperatura testada no ensaio de termorresistência de ascósporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabela 16 – Análise estatística de regressão e anova para determinação do valor Z para ascósporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabela 17 – Resultado do ensaio de termorresistência de esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u> em alginato/tomate, pela análise quantal de Spearman-Kärber (tubos positivos+ e tubos negativos-). </i>	<i>105</i>
<i>Tabela 18 – Determinação do valor D pelo método de Spearman – Karber para esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u>, em alginato/tomate.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabela 19 – Análise estatística de regressão e anova para determinação do valor Z para esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u> em alginato/tomate.....</i>	<i>107</i>

<i>Tabela 20 – Comparação entre os parâmetros de destruição térmica para esporos de <u>N. fischeri</u> e de <u>B. coagulans</u> imobilizados em alginato/tomate.....</i>	<i>108</i>
<i>Tabela 21 – Padronização das esferas de alginato de sódio com suspensão de ascosporos de <u>N. fischeri</u>.....</i>	<i>109</i>
<i>Tabela 22 – Padronização das esferas de alginato de sódio com suspensão de esporos de <u>B. coagulans</u>.....</i>	<i>110</i>
<i>Tabela 23 – Condições mínimas dos processos de esterilização da unidade asséptica para metodologia de inoculação indireta.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabela 24 – Condições de processamento da polpa de tomate para inoculação indireta de ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.....</i>	<i>112</i>
<i>Tabela 25 – Resultado dos processos de inoculação indireta de ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabela 26 – Mínimas temperaturas verificadas durante processos de inoculação indireta de ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.....</i>	<i>114</i>
<i>Tabela 27 – Tempos de permanência calculados, para inoculação de <u>N. fischeri</u>, baseando-se na velocidade média 0.406 m/s em cada etapa do processo em unidade UHT com fluxo de 1 l/min e distância entre os pontos de medição de temperatura.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabela 28 – Faixa de variação de temperatura, no tubo de retenção, verificada durante processos de inoculação indireta de <u>N. fischeri</u>.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabela 29 – Condições de processamento da polpa de tomate para inoculação indireta de <u>B. coagulans</u>.....</i>	<i>119</i>
<i>Tabela 30 – Resultado dos processos de inoculação indireta de <u>B. coagulans</u>.....</i>	<i>120</i>
<i>Tabela 31 – Mínimas temperaturas verificadas durante processos de inoculação indireta de <u>B. coagulans</u>.....</i>	<i>121</i>
<i>Tabela 32 – Tempos de permanência calculados, para inoculação de <u>B. coagulans</u>, baseando-se na velocidade média 0.406 m/s em cada etapa do processo em unidade UHT com fluxo de 1 l/min e distância entre os pontos de medição de temperatura.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabela 33 – Faixa de variação de temperatura, no tubo de retenção, verificada durante processos de inoculação indireta de <u>B. coagulans</u>.....</i>	<i>122</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Áreas de medida biológica em função do número de sobreviventes ao processo por unidade.</i>	36
<i>Figura 2 – O fluxograma da unidade asséptica.</i>	74
<i>Figura 3 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV com 3 Tubos de Retenção</i>	75
<i>Figura 4 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV Somente com Aquecedores e Resfriadores.</i>	76
<i>Figura 5 – História térmica mínima do processo a)105°C/30seg e b)109°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com suspensão de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	97
<i>Figura 6 – História térmica mínima dos processos c)115°C/30seg e d)121°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com suspensão de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	98
<i>Figura 7 – História térmica mínima do processo d)126°C/60seg para polpa de tomate, inoculada com suspensão de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	99
<i>Figura 8 – Resultado do ensaio de termorresistência de ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate</i>	100
<i>Figura 9 – Determinação do expoente “a” para o menor tratamento térmico de ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.</i>	101
<i>Figura 10 – Linearização das curvas de inativação térmica de ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate</i>	102
<i>Figura 11 – Determinação do valor Z para ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u> em alginato/tomate.</i>	104
<i>Figura 12 – Determinação do valor Z para esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u> em alginato/tomate.</i>	107
<i>Figura 13 – História térmica mínima dos processos a)105°C/30seg e b)109°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	116
<i>Figura 14 – História térmica mínima dos processos c)115°C/30seg e d)121°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	117
<i>Figura 15 – História térmica mínima dos processos e)124°C/30seg e f)126°C/60seg para polpa de tomate, inoculada com ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	118
<i>Figura 16 – História térmica mínima do processo g)126°C sem retenção para polpa de tomate, inoculada com ascosporos imobilizados de <u>N. fischeri</u>, em unidade UHT.</i>	119
<i>Figura 17 – História térmica mínima dos processos a)105°C/30seg e b)109°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u>, em unidade UHT.</i>	123

<i>Figura 18 – História térmica mínima dos processos c)115°C/30seg e d)121°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u>, em unidade UHT.</i>	<i>124</i>
<i>Figura 19 – História térmica mínima do processo e)124°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com esporos imobilizados de <u>B. coagulans</u>, em unidade UHT.</i>	<i>125</i>
<i>Figura 20 – Unidade Asséptica UHT mostrando em primeiro plano capela de enchimento</i>	<i>143</i>
<i>Figura 21 – Linha de injeção (esquerda) e coleta (direita) de esferas</i>	<i>145</i>
<i>Figura 22 – Coletor (primeiro plano) e injetor (segundo plano) de esferas</i>	<i>145</i>
<i>Figura 23 – Ascosporos de <u>N. fischeri</u> em meio Ágar Extrato de Malte (MEA).....</i>	<i>147</i>
<i>Figura 24 – Suspensão de ascosporos de <u>N. fischeri</u></i>	<i>147</i>
<i>Figura 25 – Produção das esferas de alginato/tomate em solução de cloreto de cálcio</i>	<i>149</i>

NOMENCLATURA

T	Temperatura. (°C)
T_{ref}	Temperatura de referência. (°C)
T_e	Temperatura equivalente. (°C)
D	Tempo de redução decimal. Tempo necessário para reduzir em 90% a população inicial de microrganismos, nutrientes ou fatores de qualidade. (min)
Z	Intervalo de temperatura para causar variação de 10 vezes no valor D. (°C)
F_o	Valor de esterilização. Tempo requerido para inativar microrganismos à temperatura de referência constante (121°C) com Z=10°C. (min)
F_p	Valor de esterilização alvo para o produto com base no valor Z=10°C. (min)
F_s	Valor de esterilização integrado. (min)
N_o	População inicial de microrganismos por unidade de volume. (UFC/ml)
N	População final de microrganismos sobreviventes após um tempo t de tratamento térmico a uma temperatura definida, por unidade de volume, o que equivale à probabilidade de uma unidade não estéril (PUNE). (UFC/ml)
γ	Número de reduções decimais ocasionadas por determinado processo térmico.
a	Expoente para linearização.
K	Constante de taxa de morte. Coeficiente angular da curva linearizada. (min⁻¹)
C	Constante e intercepto da curva linearizada.
lag	Fator de atraso térmico.
log	Função logarítmica.
Q	Vazão ou taxa de fluxo. (m³/s ou l/min)
V_{media}	Velocidade média desenvolvida por um fluido durante seu escoamento. (m/s)

- V_{maxima}** Velocidade máxima desenvolvida pela partícula mais rápida de um fluido durante seu escoamento. **(m/s)**
- t** Tempo de residência durante o processo. **(seg)**
- t_e** Tempo de residência equivalente durante o processo. **(seg)**
- A** Fator pre-exponencial para reação de primeira ordem. **(s⁻¹)**
- E_a** Energia de ativação aparente. **(kj/mol)**
- G** Relação de redução térmica. **(s ou min)**
- R** Constante universal de gases. **(8,1314 j/mol.k)**
- min** Minuto.
- seg** Segundo.
- μ** Viscosidade do fluido. **(Pa.s)**
- ρ** Densidade do fluido. **(g/ml)**
- φ_{interno}** Diâmetro interno da tubulação. **(m)**
- L** Comprimento da tubulação. **(m)**
- n** Índice de comportamento do escoamento
- k** Conditividade térmica. **(Pa.sⁿ)**
- SPO** Saída do produto estéril (Sterile Product Outlet).
- MEA** Meio de subcultura Ágar Extrato de Malte .
- DTA** Meio de subcultura Ágar Dextrose Triptona.
- DTB** Meio de subcultura Caldo Dextrose Triptona.
- NA** Meio de subcultura Ágar Nutriente

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo principal validar o processo comercial aplicado para polpa de tomate 8°BRIX com pH 4,3 envasada em embalagem cartonada multicamadas. Tradicionalmente este processo utiliza como alvo bacteriano *Bacillus coagulans*, porém levando em consideração que a contaminação observada no Brasil, para linha de produção deste produto, por bolores termorresistentes foi de <1 a 8 UFC/100ml de amostra, segundo Baglioni (1998); estes últimos foram utilizados como alvo nos processos térmicos aplicados nas indústrias de tomate. No entanto, a comparação da resistência térmica dos dois microrganismos se fez necessária já que a cinética de destruição térmica dos bolores termorresistentes não é sempre linear.

O valor da esterilização requerido pelo produto foi estabelecido e o processo térmico foi redimensionado (em termos do tempo de retenção e da temperatura para simular o equivalente em planta de escala comercial), e testado mediante dois métodos de validação: inoculação direta de esporos do fungo termorresistente no produto a ser processado e inoculação indireta de esporos imobilizados do fungo e da bactéria em esferas de alginato/tomate. Todos os processos aplicados foram realizados em unidade de processamento asséptico *Microthermics* UHT-HTST lab-25-DH de escala laboratorial, escolhida em função de sua versatilidade para alimentos líquidos à viscosos.

Para inoculação direta, um protocolo de 5 temperaturas (105,109,115,121 e 126°C) foi testado com 2 tempos de retenção (30 e 60seg) programados. Foi calculada a população inicial viável, necessária para obtenção de 20% de contaminação, a fim de determinar o número de reduções decimais de cada processo. Somente na temperatura mais baixa de esterilização (105°C) encontrou-se sobreviventes do

fungo termorresistente. Como nenhuma contaminação foi verificada para processos maiores do que 109°C/30seg, estes foram validados juntamente com os procedimentos de CIP, para a unidade asséptica e para as embalagens.

Para inoculação indireta, foram aplicadas 6 temperaturas (105,109,115,121,124 e 126°C) com 2 tempos de retenção (30 e 60seg) programados; além de um processo à temperatura mais alta de esterilização (126°C) sem retenção, para avaliar somente o efeito da letalidade dos aquecedores e resfriadores na redução da carga inicial de esporos do fungo. Os bioindicadores foram padronizados em esferas de 2,6mm de diâmetro médio e 0,0093g/esfera para o fungo, e de 2,2mm de diâmetro médio e 0,0071g/esfera para a bactéria. Os resultados deste teste mostraram que processos acima de 115°C/30seg não permitiram a sobrevivência do fungo nas esferas, mesmo com níveis de inoculação de 10^6 esporos. No caso de esferas com esporos de bactéria, processos acima de 109°C/30seg não apresentaram sobreviventes mesmo com níveis de inoculação de 10^5 esporos.

Após analisar todos os tratamentos térmicos aplicados e seus resultados, o processo a 126°C/60seg foi sugerido como o mais efetivo na eliminação de bolores e bactérias termorresistentes, comuns à polpa de tomate. Este binômio validado apresentou um alto fator de segurança já que um aquecimento a 126°C sem retenção, seguido de resfriamento, foi suficiente para destruir a carga alvo de microrganismos testada. No entanto, devido a alta variabilidade da carga inicial de bolores e de bactérias observada nas plantas das indústrias, a resistência térmica dos mesmos, além dos níveis de oxigênio remanescente no produto e nas embalagens, o fator de segurança tornou-se indispensável para obter um binômio adequado para o processamento térmico da polpa de tomate.

SUMMARY

This research aimed to validate the commercial process applied for tomato pulp 8°BRIX and pH 4,3 packed in Tetra Brik package. Traditionally, this process uses *Bacillus coagulans* as target, but considering that contamination was observed with heat resistant mold (<1 to 8 CFU/100ml of sample), in Brazil, for production line of tomato pulp, according to Baglioni (1998); this mold were used as target for thermal processes applied to the tomato industry. Nevertheless, the comparison of heat resistance for both microorganisms was needed since the kinetic of heat resistant molds thermal destruction is not always linear.

The required sterilization value for the product was established and the thermal process was redesigned (in terms of retention time and temperature to simulate the equivalent in commercial scale), and tested by two methods of validation: direct resistant molds spores inoculation into the product to be processed and indirect inoculation of target mold and bacteria immobilized spores in alginato/tomato balls. All applied processes were carry out in an aseptic processing unit *Microthermics* UHT-HTST lab-25-DH laboratorial scale, choosen in function of its versatility for liquid to viscous foods.

For direct inoculation, a protocol of 5 temperatures (105,109,115,121 e 126°C) was tested with 2 scheduled retention times (30 e 60seg). It was calculated the initial population, designed to obtain 20% contamination, determine the number os decimal reductions of each process. Only at lower sterilization temperature (105°C) heat resistant mold survivors were found . As no contamination was verified for process

over 109°C/30seg, they were validated together with the CIP procedure for the aseptic unit and packages.

In indirect inoculation 6 temperatures (105,109,115,121,124 e 126°C) were applied with 2 scheduled of retention times (30 e 60seg) besides, one process at highest esterilization temperature (126°C) without retention was tested to evaluate only the effect of heaters and coolers lethalties on reduction of mold initial load. The bioindicators were standardized in spore balls with 2,6mm mean diameter and 0,0093g/ball for the mold and with 2,2mm mean diameter and 0,0071g/ball for the bacteria. The results of these tests showed that processes over 115°C/30seg did not allow the survival of molds spores balls even with total inoculation levels of 10⁶ spores. In the case of bacterial spore balls, processes over 109°C/30seg did not showed survivors even with total inoculation levels of 10⁵ spores.

After data all thermal treatments and their results, the process 126°C/60seg was suggested as the most effective on elimination of heat resistant and comun molds and bacteria on tomato pulp. This evaluated binomium produced a high safety factor, since heating at 126°C without retention, followed by cooling, was enough to destroy the tested target microorganisms load. However, on account of high variability of initial molds and bacterial load observed at industry plants, the thermal resistance of these microorganisms, besides the residual oxigen level in product and packages, the safety factor becomes undispensable for the proper thermal process binomium for tomato pulp.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a existência de contaminação esporádica por bolores, verificada no Brasil, em produtos derivados de tomate envasados por processo UHT, gera a necessidade de constantes pesquisas que detectem as possíveis causas desta contaminação, procurando controlá-las para satisfazer o consumidor final.

Apesar de serem relativamente baixas em termos estatísticos, (para Baglioni, 1998 foi de 1UFC/100ml de produto antes da esterilização e de 1UFC/100ml de produto de final) apresentam efeito repulsivo no consumidor quando o mesmo abre uma embalagem contaminada e passa a questionar os aspectos de qualidade e os procedimentos higiênicos utilizados no processo produtivo do alimento que está sendo consumido.

O mercado brasileiro de produtos derivados de tomates, em 1996, atingiu um valor de R\$ 240.000/ton sendo que a porcentagem de derivados envasados assepticamente foi de 39% e que deste último índice 98% abrange a comercialização de polpa de tomate. Sabendo que o tomate é a hortaliça mais industrializada do Brasil e, possivelmente do mundo, apresentando, portanto, grande valor comercial e financeiro (Bernhardt, 1994) e, que o processo térmico dos derivados de tomate em embalagens cartonadas multicamadas foi estabelecido na Itália nos anos 80, pela Tetra Pak brasileira e italiana, conquistando atualmente todo o mercado, percebe-se a real necessidade de se validar o processo que já existe, em produtos derivados de tomate, para poder definir, nas condições brasileiras do produto, qual o alvo mais resistente do processo térmico e quais seriam, então, os parâmetros necessários para garantir um processamento asséptico seguro e eficaz .

Após verificação do processo produtivo em questão, concluiu-se que uma das causas prováveis da contaminação estaria associada à presença de fungos filamentosos termorresistentes que, possivelmente, sobrevivem à choques térmicos de 75-80°C/30 min. Na maioria dos casos, estes fungos não são resistentes ao calor, já que este destrói facilmente conídios e hifas. As poucas espécies que possuem termorresistência, caracterizam-se pela produção de esclerócios ou ascosporos, que se verificam em alimentos deteriorados, sugerindo então, que isto ocorre devido à sobrevivência destes ascosporos ao tratamento de pasteurização (Splittstoesser, 1991).

O processo de pasteurização, normalmente aplicado a produtos vegetais ácidos, ativa ascosporos que estejam dormentes, com posterior germinação e crescimento, ocasionando deterioração no produto final já embalado (Beuchat, 1986 ; Enigl et al, 1993).

As espécies de fungos comumente envolvidas nos processos de deterioração de alimentos são *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (Splittstoesser, 1991 ; Maggi et al, 1994 ; Tournas, 1994 ; Gumerato, 1995 ; Baglioni, 1998).

Em um levantamento feito por Baglioni (1998) com polpa de tomate 8°Brix processada assepticamente, foram analisados 9 lotes da safra de 1996 e 6 lotes da entressafra de 1997 onde verificou-se que os pontos de maior contaminação na linha de produção foram a matéria prima e a água de lavagem (<1 a 8 UFC/ml de amostra).

De 50 bolores isolados a partir de uma única indústria, foi selecionado mediante choques térmicos programados, o fungo denominado *Neosartorya fischeri* cuja resistência térmica à 94°C foi de 4,29min apresentando comportamento não logaritmo na destruição térmica e sobrevivendo à 100°C/25min em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^\circ\text{C}$ de precisão).

Vale acrescentar que, além da deterioração dos alimentos, os fungos de modo geral, e não somente os termorresistentes, produzem metabólitos secundários, inclusive substâncias tóxicas, como as micotoxinas patulina e variotina, por *Byssoschlamys nivea*, e terreina e verruculogena, por *Neosartorya fischeri*; todas com sérias implicações potenciais para a saúde pública já que, em animais apresentaram propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas. (Frisvad & Samson, 1991 ; Hopkins, 1993).

Em alguns produtos, a combinação de fatores como tratamento térmico relativamente fraco, alta viscosidade dos produtos e/ou alta carga microbiana inicial, trazem elevado risco de sobrevivência, sobretudo se a cinética do alvo microbiano não for linear; isto explica a ênfase especial no controle da segurança microbiana. A melhor prova de esterilidade é a ausência de qualquer tipo de crescimento após o processo térmico do alimento.

Assim percebe-se a real demanda pela validação biológica de processos térmicos potencializada pela emergência de microrganismos patogênicos e deteriorantes que podem sobreviver a processos UHT.

OBJETIVOS

Em termos gerais, esta pesquisa envolveu o seguinte objetivo :

Determinar o valor da esterilização F requerido para um processo microbiologicamente seguro, validando biologicamente o mesmo, em unidade Microthermics UHT-HTST lab-25-DH de escala laboratorial

Para a realização deste objetivo geral se fez necessário atingir os objetivos específicos :

- ⇒ Produção e coleta dos ascosporos do fungo e esporos da bactéria;
- ⇒ Ativação ótima dos ascosporos do fungo e esporos da bactéria;
- ⇒ Metodologia de inoculação direta para validação do processo térmico requerido utilizando suspensão de ascosporos livres de *Neosartorya fischeri* ;
- ⇒ Preparo dos Bioindicadores com ascosporos *Neosartorya fischeri* imobilizados ;
- ⇒ Preparo dos Bioindicadores com esporos de *Bacillus coagulans* imobilizados;
- ⇒ Validação da esterilização de polpa de tomate utilizando esporos imobilizados de *Neosartorya fischeri* e de *Bacillus coagulans* separadamente;
- ⇒ Cálculo do valor de esterilização “on line” baseado nos alvos indicados acima.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – Deterioração de Alimentos por Fungos Termorresistentes

1.1 – Características Gerais

Os ascosporos dos bolores termorresistentes possuem resistência térmica variada dependendo da espécie, idade do microrganismo, pH, presença de açúcares, gorduras e ácidos no meio. Dentre as espécies comumente isoladas, observa-se que as mais resistentes são *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (Nielsen et al, 1988 ; Splittstoesser, 1991 ; Maggi et al, 1994).

O gênero *Byssochlamys* pertence ao grupo dos ascomicetos produtores de ascos sem ascocarpos. Os ascos são constituídos por oito ascosporos, sendo que estes últimos constituem a base da resistência térmica do microrganismo. (Olliver & Smith, 1933 ; Brown & Smith, 1957 ; Yates & Ferguson, 1963)

Os ascos em fungos do gênero *Neosartorya*, microrganismo de interesse, são produzidos em cleistotécios dando à colônia uma aparência granular. A única espécie significativa e reconhecida potencialmente como deterioradora de alimentos é *Neosartorya fischeri* (Pitt & Hocking, 1985). Os ascos podem sofrer ruptura espontânea, de modo que só os ascosporos livres são observados (Splittstoesser, 1991). Este fungo caracteriza-se por apresentar, a 30°C por 7 dias de incubação, colônias de cor branca creme em meio Ágar Extrato de Malte (MEA). A fase anamorfa revela o gênero *Aspergillus* (*A. fischeri*) sendo que os ascosporos podem ser lisos ou espinhosos possuindo duas cristas equatoriais (Splittstoesser, 1991).

Existem três variedades da espécie *Neosartorya fischeri* : *Neosartorya fischeri* var *fischeri*, *Neosartorya fischeri* var *glabra* e *Neosartorya fischeri* var *spinosa* distinguidas pelas ornamentações nos ascosporos.

Já o gênero *Talaromyces*, apresenta o ascocarpo na forma de gimnotécio, ou seja, um emaranhado de hifas, onde estão os ascos.

Fungos termorresistentes têm sido isolados a partir de alimentos ácidos in natura e processados. Olliver & Rendle (1934) detectaram *Byssochlamys fulva* como agente causador de deterioração em produtos à base de frutas.

Kavanagh et al (1963) e Nielsen (1991) observaram que *Neosartorya fischeri* var *glabra* e *Neosartorya fischeri* var *spinosa* foram isoladas, em sua maioria, de produtos ácidos termoprocessados, diferenciando-se da variedade *fischeri* que é comumente encontrada no solo. Tal ocorrência também foi verificada por Jesenka et al (1991), que encontraram ascosporos de *Neosartorya fischeri* em quantidades significativas no solo, isolados em diferentes partes do mundo. Assim sendo, frutas e vegetais que têm contato direto com o solo são particularmente mais susceptíveis à contaminação por estes microrganismos.

Sob este enfoque, em 1963, Kavanagh et al encontraram *Neosartorya fischeri* em morangos enlatados; em 1975 Van der spuy et al detectaram *Talaromyces flavus* em suco de maçã; em 1989, Aragão isolou *Neosartorya fischeri* a partir de polpa de morango e, finalmente em 1995, Gumerato identificou *Neosartorya fischeri* em polpa de maçã.

Mas, a contaminação por bolores também foi verificada em outros tipos de produtos: Yates & Ferguson (1963) isolaram *B. nivea* a partir de conservas de pepino; Engel & Teubere (1991) isolaram *B. nivea* de leite cru, queijo e leite pasteurizado integral; Spotti et al (1992) isolaram *B. nivea*, *B. fulva* e *T. flavus* de tomate in natura e, Kotzekidou (1997), isolou *B. fulva*, *B. nivea* e *N. fischeri* de massa de tomate. Já Baglioni (1998) isolou todos os fungos acima a partir de polpa de tomate 8°BRIX.

1.2 – Efeitos da Contaminação

As alterações provocadas por fungos termorresistentes em produtos processados caracterizam-se, principalmente, pela presença de micélio e desintegração progressiva no caso de substrato sólido. Na eventual produção de gases pelos microrganismos atuantes, pode ocorrer leve estufamento das embalagens.

Em embalagens contendo baixos níveis de oxigênio atmosférico (<0,3% de O₂) ocorre o amolecimento extensivo de frutas processadas em detrimento da ação de *Byssochlamys*, embora haja a formação de pequena quantidade de micélio (Olliver & Rendle, 1934). No caso de produtos líquidos infectados com este gênero de fungo e sob baixas tensões de oxigênio, a fermentação ocorre com produção de CO₂, causando estufamento nas embalagens e deterioração (Hocking & Pitt, 1984).

Se a matéria-prima estiver excessivamente contaminada por fungos advindos do solo, ou seja, com uma carga inicial muito grande, o produto final poderá ser deteriorado, mesmo quando submetido a um tratamento térmico correto, já que este está dimensionado para ocasionar um número determinado de reduções decimais da suposta população microbiana inicial (Leitão, 1973 ; Figueiredo, 1974 ; Paisano, 1974 ; Vicini, 1984 ; Porreta, 1992).

Em produtos solidificados como géis de frutas, os fungos termorresistentes causam deterioração pelo crescimento de colônias visíveis na superfície do produtos e pela solubilização da pectina ou amido do substrato. Mas, em algumas situações, a quantidade de crescimento fúngico é tão limitada que colônias ou mesmo fragmentos miceliais não podem ser detectados. Esta situação foi observada por Hocking & Pitt, em 1984 e por Splittstoesser, em 1991, no gel de amido do recheio de torta de limão, solubilizado pela ação de *Byssochlamys*.

A deterioração microbiológica em produtos de tomate é causada por microrganismos capazes de se desenvolver abaixo de pH 4,6. Estes microrganismos envolvem bactérias esporogênicas (associadas a tratamento térmico insuficiente ou resfriamento inadequado), bactérias não esporogênicas, fungos filamentosos e algumas leveduras (pela recontaminação pós processo).

Além de provocar mudanças organolépticas nos produtos de tomate, o crescimento de fungos pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos típicos de produtos de baixa acidez, já que a ação metabólica dos fungos elevará o pH do produto. Este fenômeno é conhecido como **metabiosis** (Odlaug & Pflug, 1979 ; Mundt & Norman, 1982 ; Draughon et al , 1988).

Vicini et al (1983) relataram um caso de deterioração, por fungo, em derivados de tomate envasado assepticamente. Houve estufamento de embalagens cartonadas contendo suco de tomate. Este tipo de alteração caracterizou-se também pela presença de micélio esbranquiçado, aroma alcoólico e predominância de CO₂. O microrganismo deteriorador foi identificado como *Mucor spinescens*, um fungo com baixa resistência térmica e com metabolismo fermentativo.

Após três semanas de incubação à 25°C devido a alteração do meio pela ação do microrganismo deteriorador, outras espécies foram identificadas: *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus nigricans* e *Mucor racemosus* (Porreta, 1992).

1.3 – Níveis Aceitáveis de Contaminação

A contagem de filamentos de fungos em produtos de tomate, pelo método de Howard (% de campos positivos) vem sendo empregada para determinar o grau de limpeza e os procedimentos utilizados no processamento. Uma baixa contagem obtida não assegura que os procedimentos tenham sido adequados, entretanto, uma alta contagem **sempre** denota que, ou o processo foi insuficiente ou a sanitariedade da planta foi inadequada (Paisano, 1974 ; Yokoya, 1976 ; Fonseca, 1982). A tolerância máxima para contagem de Howard, em derivados de tomate, varia de acordo com a legislação de cada país. Nos Estados Unidos, 40% ; na Itália, 60% ; no Chile, 40-60% e, no Brasil, 40% (Fernandes, 1995).

Uma contagem de 5 ascósporos de fungos termorresistentes, por 100g (ml) de produto, em uma etapa imediatamente anterior ao tratamento térmico constitui alto nível de contaminação (Beuchat & Pitt, 1992). Em alguns produtos como "blends" de sucos de frutas que serão processados pelo sistema UHT, e que não contenham conservantes químicos, um nível inferior à 2 ascósporos por 100ml de produto é requerido para garantir um processo microbiologicamente seguro (Hocking & Pitt, 1984).

A fim estabelecer níveis aceitáveis de ascósporos de fungos termorresistentes em determinado alimento, deve-se considerar :

- 1) Se a matéria prima é o ingrediente principal ou não ;
- 2) Se o produto final conterá conservantes ou não ;
- 3) Qual o tratamento utilizado ;
- 4) Qual a incidência de operações de concentração e/ou congelamento

(Hocking & Pitt, 1984 ; Eiroa, 1989 ; Beuchat & Pitt, 1992).

1.4 – Produção e Ativação de Ascosporos

A produção e ativação de ascosporos de fungos termorresistentes são dependentes tanto de fatores genéticos quanto de fatores externos como tempo, temperatura, meio de crescimento ou aquecimento.

Uma vez que os ascosporos de fungos termorresistentes são formados, desenvolvem uma dormência com o tempo, que pode ser quebrada por um tratamento térmico sub-letal denominado ativação. Esta prática permite a germinação e o crescimento em condições favoráveis (Beuchat & Rice, 1979 ; Beuchat, 1986 ; Conner & Beuchat, 1987a ; Beuchat, 1988b ; Splittstoesser et al, 1993).

A natureza do meio de aquecimento influencia a taxa de ativação de ascosporos de fungos termorresistentes. Splittstoesser & Splittstoesser (1977) compararam suco de uva 5°BRIX e água destilada como meio de aquecimento na ativação de *Byssochlamys fulva* e *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya*). O resultado demonstrou que a taxa de ativação, para *N. fischeri*, foi mais acentuada utilizando suco de uva como meio de aquecimento devido, possivelmente, à presença de açúcares .

Testes posteriores, com a mesma linhagem do fungo, em suco de maçã e em suco de tomate, apresentaram o mesmo efeito estimulante na ativação dos ascosporos. Kotzekidou (1997) também trabalhou com suco de tomate (pH 4,2) e constatou que a ativação de ascosporos de *Neosartorya fischeri* é maior e mais eficiente quando comparada com tampão fosfato (pH 7,0).

Diferentes linhagens de fungos termorresistentes, para um determinado meio de aquecimento, também ocasionam variação na taxa de ativação. King & Halbrook (1987) encontraram diferentes parâmetros ótimos de ativação para três linhagens de *Talaromyces flavus* em meio sintético : 12-15min/80°C ; 6-8min/85°C e 1-2min/90°C. Segundo Spotti et al (1992), não é possível individualizar uma combinação tempo/temperatura de ativação que seja ótima para todas as cepas de fungos termorresistentes isoladas de determinado alimento.

Estudando a resistência térmica de linhagens de *Neosartorya fischeri*, em suco de maçã 12,3°BRIX e pH 3,8. Conner & Beuchat (1987) e Gumerato (1995) observaram que choques térmicos a 84°C por 30 min e a 85°C por 5 min, respectivamente, ativaram os ascosporos incrementando em 10 vezes e em 1000 vezes a população inicial quando em comparação com os ascosporos que não foram submetidos ao tratamento térmico sub-letal.

Gomez et al (1989) realizaram um estudo sobre o tratamento térmico, por calor seco, na recuperação de ascosporos de *Neosartorya fischeri* submetidos à 95°C por 30 e 60 min com 50% de umidade relativa. Os resultados demonstraram que o processo de rehidratação dos ascosporos é afetado pela temperatura do meio de recuperação, sendo que a temperatura e a taxa de recuperação dos ascosporos são diretamente proporcionais até que seja atingida a temperatura ótima de ativação dos ascosporos.

1.5 – Fatores que Afetam a Resistência Térmica dos Ascosporos

A comparação da resistência térmica entre espécies de fungos termorresistentes a um determinado tratamento térmico, em um meio de aquecimento definido, depende das cepas de estudo. Spotti et al (1992) relataram que *Neosartorya fischeri* foi a espécie fúngica mais termorresistente quando comparada com *Byssochlamys fulva* e *Talaromyces flavus*, sendo que todas foram isoladas de diversos tipos de frutas.

Diferentes linhagens de uma mesma espécie de fungos termorresistentes também ocasionam variação na resistência térmica dos mesmos. Tal fato foi demonstrado por Beuchat (1986) ; Conner & Beuchat (1987 a) ; Spotti et al (1992) e Kotzekidou (1997), para *Neosartorya fischeri*.

A natureza do meio de aquecimento, que compreende pH, teor de sólidos solúveis e tipos de ácidos orgânicos presentes, também afetam a sensibilidade de ascosporos de fungos termorresistentes ao calor. Conner & Beuchat (1987 a) demonstraram que a resistência térmica de *Neosartorya fischeri* aumenta conforme aumenta-se o pH do meio de aquecimento acima de 6 e, que entre 3,5-5,5 isto não se verifica.

Comparações de resistência térmica de ascosporos de fungos termorresistentes, em diferentes meios de aquecimento, quando submetidos ao mesmo tratamento térmico, foram feitas por Splittstoesser & Splittstoesser (1977). Neste experimento constatou-se que sucos de frutas e de vegetais exercem efeito protetor contra a inativação térmica dos ascosporos.

Maiores quantidades de sólidos solúveis no meio de aquecimento também podem exercer um efeito protetor sobre os ascosporos de fungos termorresistentes.

Splittstoesser & Splittstoesser (1977) trabalharam com ascósporos de *Byssoschlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* em sucos de uva com diferentes °BRIX e constataram que *Neosartorya fischeri* foi mais susceptível à ação do teor de sólidos promovendo, por isso, o aumento da sua resistência térmica. Tournas & Traxler (1994) observaram que ascósporos de *Neosartorya fischeri* apresentaram maior resistência térmica em concentrado de abacaxi do que em suco de abacaxi, quando ambos foram utilizados como meio de aquecimento em todas as temperaturas testadas. Isto indicou que o concentrado exerceu um efeito protetor em função da alta porcentagem de sólidos solúveis.

Conner & Beuchat (1987) trabalharam com *Neosartorya fischeri* e observaram que o tipo de meio de cultura utilizado para esporulação não afetava a termorresistência dos ascósporos. Entretanto, o meio de suspensão para aquecimento dos ascósporos interferiu na resistência térmica destes ascósporos. Isto foi demonstrado já que a partir de uma suspensão 10^6 esporos/ml inoculada em suco de maçã 12,3°BRIX e pH 3,8, com choque térmico de 90°C/30min, foi detectado sobreviventes enquanto que em suco de uva 16,6°BRIX e pH 3,4 não houve sobreviventes. Assim, o pH e o conteúdo de sólidos solúveis poderiam influenciar a resistência térmica dos ascósporos submetidos a altas temperaturas .

Já a tolerância de ascósporos de fungos termorresistentes aos ácidos orgânicos durante a exposição à altas temperaturas depende do tipo de ácido, da concentração da forma não dissociada do mesmo e do pH do meio de aquecimento. Conner & Beuchat (1987 a) verificaram o aumento da inativação térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri* quando, ao meio de aquecimento, foi adicionado ácido fumárico, seguido de ácido cítrico, málico e tartárico.

A presença de conservantes no meio de aquecimento tende a aumentar os efeitos letais do calor, segundo Beuchat & Rice (1979). Para Splittstoesser & Churey (1991), os ascosporos de *Neosartorya fischeri* foram afetados quando aquecidos na presença de baixas concentrações de SO₂. Os resultados demonstraram que a adição de 0, 5, 50 e 100ppm de SO₂ resultou em valores D_{80°C} de 123, 75, 8,5 e 6,1 min, respectivamente. A partir destes resultados, concluíram que a forma não dissociada do SO₂ foi responsável pela sensibilização de ascosporos de *Neosartorya fischeri* ao calor, já que aumentando o pH de 3,3 para 5,0 a forma não dissociada do SO₂ foi reduzida para 0,059%, aproximadamente.

Tournas & Traxler (1994) examinaram o efeito da idade dos ascosporos de *Neosartorya fischeri* sobre sua resistência térmica. Este fungo cresceu e produziu ascosporos em meio Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) à 30°C durante 1, 2, 3 e 6 meses de incubação. Em cada um destes tempos de incubação os ascosporos foram aquecidos à 88°C em água deionizada, por mais de uma hora, sendo retiradas amostras a cada 5 min, diluídas apropriadamente, plaqueadas em Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) e incubadas por 10 dias com contagem das colônias. De posse dos resultados, foram construídas curvas de sobrevivência e calculados os valores D à 88°C. Evidenciou-se um aumento do valor D proporcionalmente ao tempo de incubação denotando então maior resistência térmica já que, para ascosporos de 6 meses de idade D_{88°C} foi de 15,5 min enquanto que para 1 mês de idade D_{88°C} foi de 7,4 min. Tal fato entra em concordância com os estudos de Conner & Beuchat (1987a).

1.6 – A Cinética de Inativação

A determinação do tempo e da temperatura de aquecimento requeridos para a conservação de produtos processados constitui a base de uma comercialização segura. Porém o cálculo deste binômio só é viabilizado se a taxa de morte dos microrganismos visados for constante, ou seja, se seguir uma ordem logarítmica de destruição.

Somente 40% dos microrganismos apresentam a taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, obtém-se uma linha reta quando se constrói a curva de morte plotando-se o log do número de sobreviventes *versus* o tempo de aquecimento a uma dada temperatura (King et al, 1979 ; Pflug, 1992).

A curva de inativação térmica exibida pelos fungos termorresistentes é NÃO LOGARÍTMICA pois apresenta um "ombro" no início, caracterizado pela lenta diminuição do número de sobreviventes, seguido de uma taxa de morte acelerada e uma cauda posterior. À medida que a temperatura de inativação aumenta, a fase "lag" ou "ombro" diminui, ficando a curva semelhante a uma reta (King et al, 1979 ; Bayne & Michener, 1979 ; King & Halbrook, 1987, King Jr. & Whitehand, 1990 e Baglioni, 1998).

Rahn (1945), citou um trabalho de Smith (1921) em que o autor, observando as curvas de sobreviventes de esporos de fungos, notou que as mesmas eram côncavas para baixo quando a morte era causada por tratamento térmico ou por ação de determinados desinfetantes. Observou também que, no caso de *Staphilococcus*, cujas células estão dispostas na forma de cachos, a destruição não é uniforme e, só é detectada quando a última célula do cacho é totalmente destruída.

Desta maneira, a curva de sobreviventes assemelha-se à de microrganismos multicelulares, ou seja, apresenta-se côncava para baixo.

A medida da resistência térmica de microrganismos que seguem uma taxa de morte logarítmica é feita pela determinação dos parâmetros "D" e "Z". Sob este enfoque, Alderton & Snell (1970) introduziram uma metodologia de linearização para as curvas de morte não logarítmicas, semelhantes àquelas exibidas pelos fungos termorresistentes, permitindo então, que se calcule parâmetros análogos a "D" e "Z" da respectiva curva logarítmica.

Devido à impossibilidade de calcular os valores **D** e **Z** nas condições de não linearidade apresentadas pelas curvas de sobreviventes, King et al (1979) estudaram a possibilidade de linearização das curvas no caso de *B. fulva* utilizando o método de Alderton e Snell (1970). Com isto, concluíram que os resultados calculados por este método aproximavam-se muito dos dados experimentais obtidos nas temperaturas aplicadas. O desvio percentual entre o tempo experimental e o calculado foi de até 1,1%. Acrescentaram também que as curvas construídas a partir das temperaturas de 87,8 e 90°C pareciam lineares já que encobriam desvios não evidenciados à baixas temperaturas .

Bayne & Michener (1979) , Aragão (1989) e Baglioni (1998), verificaram que os tempos de aquecimento, a uma determinada temperatura, necessários para que haja certo número de reduções decimais são mais próximos dos valores experimentais quando é empregado o método de linearização da curva proposto por Alderton & Snell (1970) para obtenção dos parâmetros cinéticos "D" e "Z", em comparação com os cálculos utilizando somente os dados referentes à porção linear da curva de morte não logarítmica.

1.7 – O método de Linearização de Alderton e Snell (1970)

A linearização da curva de sobreviventes é dada pela equação abaixo :

$$(\log N - \log N_0)^a = Kt + C \quad (1)$$

onde :

N_0 = população inicial de esporos

N = população de sobreviventes após tratamento térmico

K = constante de taxa de morte/coeficiente angular da curva linearizada

C = coeficiente linear da curva linearizada

a = expoente para linearização

O valor de "a", que equivale ao inverso do coeficiente angular da curva dada por $\log (\log N - \log N_0)$ versus $\log t$, deve ser calculado para o menor tratamento térmico, podendo ser aplicado na linearização das demais curvas. Se a taxa de morte seguir a equação 1 e não houver erros experimentais, "C" assume o valor de zero. Desta maneira, para o cálculo do valor expoente "a", a expressão é rearranjada da seguinte forma :

$$\log (\log N - \log N_0)^a = \log (kt) \quad (2)$$

$$a \log (\log N - \log N_0) = \log k + \log t \quad (3)$$

$$\log (\log N - \log N_0) = 1/a \log k + 1/a \log t \quad (4)$$

Desta maneira, o valor de "a" é obtido pelo inverso da inclinação do gráfico

$$\log (\log N - \log N_0) \text{ versus } \log t$$

Da equação 1, considerando-se $C = 0$, pode-se equiparar as equações de **K** e **D** :

$$1/k = t (\log N_0 - \log N)^a \quad (5)$$

Assumindo $a = 1$, a equação acima torna-se similar à curva logarítmica linear, ou seja :

$$D = t (\log N_0 - \log N) \quad (6)$$

Por analogia das equações 5 e 6, "1/k" seria equivalente a "D". Já o parâmetro equivalente à "Z" pode ser obtido invertendo-se o valor do coeficiente angular da curva - $\log k$ versus T.

2 – Deterioração de Alimentos por *Bacillus coagulans*

O gênero *Bacillus* caracteriza-se por apresentar sua célula em forma de bastonete reto, geralmente Gram + com produção de endosporos. Possui ainda metabolismo aeróbio capaz de produzir catalase, acetil metil carbinol e ácido láctico a partir da glicose.

Bacillus coagulans apresenta-se sob forma de bastonete longo com pH ótimo de crescimento em torno de 5, mas pode desenvolver-se em pH até 4, dependendo da população inicial e da linhagem.

Sua temperatura de crescimento abrange a faixa geral de 35°C a 55°C, mas não a 65°C. Sua temperatura ótima de crescimento está próxima de 45°C . Desenvolve-se preferencialmente em alimentos com baixa acidez, fermentando os carboidratos presentes no alimento com produção de ácidos graxos de cadeia curta que azedam o produto. Durante o processo de fermentação, pouco ou nenhum gás é produzido (fermentação tipo “flat-sour”), não havendo, portanto, estufamento da embalagem.

Assim, a deterioração só é percebida pelo consumidor no momento de abertura da embalagem, gerando por consequência, grande prejuízo para os fabricantes, já que a rejeição ao produto é imediata.

Os esporos deste microrganismo podem ser encontrados em produtos esterilizados já que são extremamente resistentes a tratamentos térmicos (APHA, 1992). Em produtos derivados de tomate, é a espécie deterioradora mais importante dentre as bactérias esporogênicas aeróbias-anaeróbias facultativas. Seus esporos germinam a pH 4,2 ou superior, produzindo odor característico (Murrel, 1985). Já as células vegetativas podem suportar um pH de até 4 se a temperatura estiver entre 21 e 38°C, fato que deve-se à característica acidúrica do microrganismo em questão. Vale acrescentar que, se o teor de sólidos solúveis presente no produto for superior a 18% não haverá condições satisfatórias para o crescimento; no entanto a polpa de tomate com 8°BRIX denota condição favorável ao desenvolvimento de *Bacillus coagulans*.

Estima-se que os níveis de contaminação, por esporos desta bactéria, estejam em torno de $3,5 \times 10^5$ esporos/g de solo e de $6,5 \times 10^1$ a $1,1 \times 10^3$ esporos/g de tomate não lavado. (Alskog, 1995)

A causa da deterioração dos produtos, por esta bactéria, decorre de tratamento térmico insuficiente ou resfriamento pós processo inadequado. Sendo assim, as medidas de controle para evitar a contaminação englobam tratamento térmico e resfriamento adequados, boas práticas de higiene e sanitização da planta, procedimentos corretos para lavagem, seleção e manuseio da matéria prima, que deve ser de boa qualidade. (Leitão, 1973 ; Figueiredo, 1974 ; Paisano, 1974 ; Fonseca 1982 ; Vicini, 1984 ; Porreta, 1992)

Devido ao fato de possuir esporos com elevada resistência térmica e células viáveis que adaptam-se bem às condições dos produtos derivados de tomate, a espécie *Bacillus coagulans* torna-se um microrganismo alvo para os processos comerciais de esterilização destes produtos envasados assepticamente em embalagens cartonadas, principalmente pelo fato do produto final ser conservado à temperatura ambiente.

Assim sendo, é de extrema importância a determinação da resistência térmica das linhagens de interesse a fim de dimensionar o tratamento térmico adequado para cada processo.

Diferentes linhagens do microrganismo em questão apresentam diferentes valores de **D**, à 100°C, variando entre 0,2 a 0,65min, mediante Pirone et al em 1989, (citando dados de Amaha et al, 1957 e Lunch at al, 1988).

Também em 1989, Pirone et al afirmaram que a resistência térmica dos esporos de *Bacillus coagulans*, em pasta de tomate, é função do pH. Os autores efetuaram tratamentos térmicos entre 88°C e 98°C variando o pH de 4,2 a 4,4 e recuperaram os possíveis sobreviventes em meio de subcultura TSA (Tryptona Soya Agar). Como resultado descreveram que, quanto menor o pH menor a resistência térmica já que ,

para valores extrapolados a 100°C com pH de 4,2 ; 4,3 ; 4,4 e 4,5, o valor do tempo de redução decimal **D** obtido foi de 2,57 ; 2,88 ; 3,01 e 3,09 min, respectivamente, com valor de $Z=10^{\circ}\text{C}$. Vale acrescentar que o tratamento a 88°C demonstrou-se subletal pois gerou uma curva de morte não logarítmica, sugerindo que os esporos estariam sendo, inicialmente ativados nesta temperatura, para ao longo do tempo, serem destruídos.

3 – Esterilização Contínua em Sistemas Assépticos

No intuito de atender à crescente procura por produtos de alta qualidade, as indústrias de alimentos estão fazendo investimentos progressivos no desenvolvimento de processos adequados para produtos assépticos. Utilizar um processo asséptico significa submeter o produto e o material de embalagem à uma esterilização individual, diferentemente, portanto, da esterilização comercial em latas. A técnica em questão substitui um processo térmico severo por um outro à temperatura mais elevada, porém com tempo mais curto, conservando as características nutricionais do produto.

Ao se combinar tratamento térmico mais brando com produtos de difícil processo devido, por exemplo, à alta viscosidade, baixa acidez e presença de partículas, percebe-se o risco potencial de sobrevivência de esporos bacterianos, especialmente se a carga inicial for consideravelmente alta (Ronner, 1990).

Neste sentido, há grande demanda pela validação biológica dos processos assépticos que garantam a esterilidade do produto sem alterar suas características organolépticas.

O princípio da validação biológica está na avaliação do processo térmico que começa com a escolha do valor F_0 , usando um organismo indicador que é introduzido no processo sendo, posteriormente, recuperado e quantificado. Partindo do mesmo princípio é também possível identificar pontos críticos do processo asséptico.

O conceito de esterilização comercial envolve a eliminação ou a minimização de determinada carga de organismos indesejáveis dentro de um ambiente definido que pode ser, por exemplo, um alimento formulado. Na esterilização por calor, os alimentos são aquecidos à temperaturas suficientemente altas e por períodos suficientemente longos para destruir a atividade de deterioradores biológicos e de enzimas. Como resultado, alimentos esterilizados têm maior vida de prateleira. No entanto, tratamentos térmicos severos produzem alterações significativas nas características sensoriais e nutricionais dos alimentos. Mas, o aprimoramento das técnicas de processos tem reduzido o dano irreversível aos nutrientes e componentes organolépticos através de tratamentos mais brandos, em termos do tempo de choque térmico mínimo necessário; afinal, atualmente pode-se prever o tempo requerido para esterilizar determinado alimento pois o mesmo é influenciado pelo estado físico e pH do alimento, por sua carga contaminante inicial e pela resistência térmica dos microrganismos provavelmente presentes na matéria-prima, antes do tratamento térmico.

Os processos de preservação de alimentos devem denotar produtos estáveis durante o período de estocagem e, espera-se que, ao final do processamento, todas as unidades dos lotes processados estejam estéreis.

O termo estéril, definido comercialmente, tem conotação de produto livre de organismos viáveis, no entanto, o mesmo não se aplica quando se trata de grandes quantidades de produto (centenas de embalagens), uma vez que nem todas as unidades de lotes desta ordem estarão estéreis ao final de um processo comercial de esterilização.

Sabe-se que isto ocorre porque a morte dos organismos individuais, de uma população microbiana homogênea, sujeita ao calor, radiação e/ou agentes químicos, geralmente segue um padrão logarítmico. Assim sendo, somente um tratamento tendendo ao infinito seria eficiente ao ponto de garantir a esterilidade de todas as unidades dos lotes processados. Com isto, torna-se necessário expressar o ponto final dos processos de preservação, por calor, através de um conceito que considera o número de falhas, por quantidade de embalagem processada, ou seja, a probabilidade de unidades não estéreis ao final do processo - PUNE. (Fellows, 1988 ; Pflug, 1990)

O alvo do processamento térmico deve ser conhecido para que se estabeleça o conceito descrito acima. Para alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$ e $a_w > 0,85$) *Clostridium botulinum* é o organismo esporulado patogênico termorresistente de mais alto risco à saúde do consumidor; logo sua completa destruição é o requerimento mínimo da esterilização por calor. Porém, existem outros microrganismos esporulados termorresistentes que não apresentam risco direto ao consumidor, mais sim ao alimento, já que sua presença após o processo pode deteriorar o produto durante o período de estocagem de vegetais, leite e seus derivados.

Para alimentos mais ácidos (pH 3,7 - 4,5) organismos como leveduras e fungos termorresistentes são os alvos do processo de preservação por calor. A título de ilustração, para polpa de tomate (pH 4,3), contaminada com *B. coagulans*, um PUNE de 10^{-6} , indicado para termófilos em produtos estocados à temperatura ambiente, seria o requerido para obter um produto final comercialmente estéril. Já para alimentos ácidos (pH < 3,7) a inativação de enzimas é a principal razão do processamento, e as condições de aquecimento são mais tênues. (Fellows, 1988 ; Pflug, 1990)

4 – Técnicas de Validação Biológica de Processos Térmicos Contínuos para Alimentos Fluídos

Muitas diferentes técnicas de validação de processos assépticos foram testadas no passado. Basicamente, podem ser citadas desde a inoculação direta de esporos livres de bactérias no produto antes do tratamento térmico, até a inoculação de esporos bacterianos fixados em partículas carregadas ao longo do processo térmico (Ronner, 1990).

A primeira técnica é a de menor interesse pois apresenta baixa sensibilidade em relação ao inóculo já que, somente uma pequena porção do total inoculado é recuperada após o processo térmico; mas torna-se indispensável em termos comparativos com outras técnicas. Já a segunda técnica merece mais atenção devido à dinâmica de movimento das partículas durante o sistema de aquecimento-retenção-resfriamento do processo asséptico, muito complexo, enquanto calor penetrante nos alimentos particulados.

Esporos bacterianos imobilizados podem ser usados de várias maneiras para estimar os efeitos letais do processo asséptico. Pode-se inocular pequenas esferas de vidro com a suspensão de esporos bacterianos aderida, depois de fixar as mesmas no centro da partícula do alimento para que ambos sejam transportados ao longo do processo contínuo. Este método recupera todos os esporos mas não denota o verdadeiro valor **D** já que os esporos não estão em contato como o produto em seu ambiente natural (Herson e Shore, 1981).

Uma terceira técnica desenvolvida para validação biológica, parte de alimentos particulados inoculados com esporos bacterianos.

Esta consiste em aprisionar ou imobilizar os esporos num suporte de gel. Vale acrescentar que há grande variedade de materiais de suporte viáveis aplicados, atualmente, no campo da biotecnologia.

Como exemplo, cita-se o uso de esferas, produzidas a partir de alginato de sódio, inoculadas com os esporos. Estas esferas são de fácil manipulação em laboratório e, os esporos contidos nelas apresentam longa vida útil produzindo resultados significativos, além de não causar choques nem traumas às células do microrganismo durante a formação do gel. No entanto, na prática, verifica-se certa instabilidade na estrutura da parede (Ronner, 1990).

As partículas de alginato são recuperadas depois de cada processo, sendo dissolvidas em citrato de cálcio e, a enumeração dos esporos sobreviventes é feita por contagem em placa. Desde que os esporos estejam bem distribuídos no alimento de interesse, e não somente no centro, medidas de processo com este tipo de partícula denotam um valor de esterilização integral. Estudos preliminares avaliam as propriedades

físicas das partículas a fim de assegurar que suas características sejam similares às usadas no produto submetido ao tratamento térmico (Gaze, 1989). Num outro estudo realizado por Gaze et al (1990) o principal critério considerado durante a elaboração da técnica foi assegurar que a mesma pudesse ser adaptada a outros processos e alimentos com diferentes composições. Os requerimentos básicos da técnica incluíram : a capacidade de utilização de diferentes microrganismos indicadores, dependendo da temperatura a ser testada; a disponibilidade dos dados na caracterização da resistência térmica destes microrganismos quando aquecidos no produto, e, finalmente, a escolha do procedimento de recuperação que assegure um número máximo de sobreviventes após cada processo .

4.1 – Inoculação Direta de Esporos Livres no Produto Antes do Aquecimento

Para validação, um protocolo de pelo menos 5 processos são testados, mediante a teoria de embalagens inoculadas (NCA, 1968), sendo que os menos rigorosos devem estar contaminados e os mais rigorosos estéreis. Para tanto, há necessidade do inóculo, na ordem de 10^4 ou 10^5 , ser igualmente distribuído no alimento. Após a inoculação, o alimento é processado e após o ciclo de aquecimento/resfriamento, envasado em cerca de 20 a 100 embalagens. Os recipientes são incubados, por longos períodos que permitam a germinação de esporos injuriados, com observação posterior da presença ou ausência de sobreviventes. Isto pode ser visto por alterações na estrutura física da embalagem (ruptura de solda ou estufamento), bem como, por alterações químicas no produto (acidez, cor, flavour ou textura) e por evidência microbiológica de colônias de microrganismos deteriorantes. Vale acrescentar que esta técnica tem por objetivo, observar a presença ou ausência de crescimento microbiano (método de ponto final), fato que determina a validade do processo aplicado. (Pflug, 1980b)

A taxa de fluxo deve ser constante para que toda as partículas da amostra recebam o mesmo tratamento térmico durante o tempo de residência no tubo de retenção. Vale acrescentar que a sensibilidade em relação ao esforço de inoculação é baixa; somente uma pequena proporção do nível de inoculação total é recuperada após o processo de aquecimento (Marcy, 1997).

4.2 – Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados em Alginato de Sódio no Alimento Antes do Tratamento Térmico

Esta técnica utiliza os métodos de contagem de redução para inoculação: após o processo as esferas são recuperadas, os sobreviventes contados e a letalidade integrada é calculada. Comparativamente, não há necessidade de embalar o produto processado e, portanto, os resultados são obtidos em um tempo mais curto.

Um número limitado de esferas do esporo de interesse são inoculados como o mesmo nível de microrganismos, sendo as esferas processadas no sistema sob uma série de temperaturas apropriadas, enquanto a média de fluxo e duração da retenção são mantidas constantes. Após coleta, onde as esferas de esporos devem manter sua integridade física através do sistema, é requerido um método para distinguir e separar as esferas de esporos inoculadas com o produto; sendo que a técnica laboriosa e a coleta difícil. (Marcy, 1997)

5 – Biondicadores

O objetivo de qualquer processo de esterilização é destruir microrganismos, especialmente esporos com estruturas celulares de resistência. A medida mais exata para determinar a eficiência de qualquer método de esterilização é o efeito letal.

Assim, os constituintes mais importantes para monitorar processos que expressem este efeito são os microrganismos.

A monitoração de processos de esterilização pode ser feita através do uso de esporos de microrganismos de interesse, com características conhecidas e com resistência térmica devidamente determinada. A utilização de tais estruturas celulares, como monitores biológicos, fundamenta-se no fato de serem capazes de responder à pequenas variações das condições de processo. Quando um número pré-determinado de esporos é submetido, em função do tempo, a determinado agente esterilizante, a morte destes ocorrerá de forma previsível. Mas, dependendo da severidade do tratamento haverá, após o ciclo de esterilização, uma certa porcentagem proporcional de esporos remanescentes que denotará uma medida razoável da eficiência do mesmo. (Pflug, 1990)

Os primeiros esforços direcionados à validação biológica relacionam-se com o estudo de embalagens inoculadas, onde amostras do produto em questão são inoculadas com altas concentrações de esporos termorresistentes e incubadas, após o processamento, para que seja possível relacionar a fração do produto deteriorado com o número de esporos sobreviventes ao processo. A partir do primeiros trabalhos de Yawer (1978), a utilização desta técnica, juntamente com o método de redução de contagem, ampliou as informações fornecidas nestes ensaios, chegando a uma medida biológica da severidade do processo aplicado.

Alguns autores, validando biologicamente processos assépticos, têm utilizado sistemas de indicadores biológicos que consistem em imobilizar um número conhecido de esporos de microrganismos termorresistentes em partículas de alimentos ou em simulações de partículas que, após serem submetidas a um

tratamento térmico juntamente com o produto, são recuperadas para que os possíveis sobreviventes sejam contados. Nos estudos de Brown et al (1984) , Segner et al (1989) , Gaze e Brown (1989) e de Gaze et al (1990) foram feitas comparações entre os valores de esterilização determinados biologicamente e os valores de esterilização determinados pelos métodos matemáticos que consideram o tempo de residência das partículas.

Existe uma grande variedade de materiais, tamanhos e formas de carregadores de partículas. A maioria é constituída de materiais sólidos como papel de filtro, vidro, grãos do solo, de areia ou de sílica, folhas de plástico ou de alumínio e fios de algodão. Mas também podem ser de materiais semi-sólidos, como gomas a base de pasta de alginato de sódio ou misturas de alimento/alginato, por exemplo.

5.1 – O alginato

As gomas podem ser definidas como qualquer polissacarídeo solúvel em água, com capacidade, em solução, de incrementar a viscosidade e/ou de formar géis. É extraído de vegetais terrestres ou marinhos, bem como, de microrganismos. Gomas vegetais de uso generalizado são as galactomanas das sementes de guar e locuste, os exudados como a goma arábica e a tragacagante, e as das algas como as carragenas e os alginatos. Todas muito utilizadas no processamento de alimentos por realizarem, no mínimo, três funções : emulsificantes, estabilizantes e espessantes. Além disso, algumas apresentam propriedades gelificantes e encorpadoras, podendo atuar também como agentes de suspensão aumentando a capacidade para a dispersão de gases em sólidos ou líquidos. As indústrias de processamento de alimentos aproveitam as propriedades físicas das gomas, especialmente a viscosidade e a estrutura coloidal. (Pasquel, 1999)

Os alginatos, a goma guar e a goma carragena são extratos de algas vermelhas e marrons, que, em conjunto, são conhecidas como *seaweeds*. Os alginatos são descritos como compostos que englobam uma variedade de produtos constituídos pelos ácidos D-manurônico e L-gulurônico; e que são extraídos de algas marrons conhecidas como *Phaeophyceae*, sendo que as mais importantes na produção comercial dos alginatos constitui *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*, encontradas no mundo inteiro. Nem todos os alginatos gelificam, porém, são bem conhecidos por sua capacidade de produzir géis irreversíveis em água fria, na presença de íons cálcio e/ou íons alumínio, sendo novamente solúveis em soluções alcalinas. Esta propriedade diferencia os alginatos das gomas derivadas de algas vermelhas.

Muitos alginatos são usados, frequentemente, como espessantes, estabilizantes de emulsões, gelificantes e inibidores da sinérese. (Pasquel, 1999)

O alginato comercial é um sal, frequentemente um sal de sódio, que gera soluções muito viscosas. É obtido a partir do ácido purônico linear, denominado ácido algínico que, em solução com pH que deve ser baixo com ou sem adição de íons cálcio, é empregado na preparação de géis macios que não derretem. O ácido algínico é composto de duas unidades monoméricas do ácido β -D-manupiranosilurônico e do ácido α -L-gulopiranosilurônico. Estes dois monômeros ocorrem em regiões homogêneas e em regiões mistas. Segmentos contendo somente unidades de D-manuronopiranosil referem-se ao bloco M e, aqueles contendo somente unidades L-guluronopiranosil, denotam diferentes blocos G com conformações de cadeias distintas. Regiões do bloco M são planas (similar a conformação da celulose) com direcionamento equatorial. Já as regiões do bloco G apresentam conformação pregueada, resultante do direcionamento axial.

Diferentes porcentagens de diferentes segmentos de blocos, denotam diferentes propriedades aos alginatos, como os do bloco G que produzem géis de maior força. (BeMiller et al,1993)

Os alginatos possuem sais de cálcio que são insolúveis. Esta insolubilidade resulta da reação entre os íons cálcio e as regiões do bloco G das cadeias. Os orifícios formados entre as cadeias do bloco G são cavidades que aprisionam os íons cálcio. O resultado é a formação de uma zona chamada de “eggbox” (devido a aparência similar de uma caixa de ovos). A força deste gel depende da quantidade de blocos G no alginato usado, bem como, da concentração dos íons cálcio presentes.

Já os alginatos de propileno glicol são formados pela reação de ácido algínico e óxido de propileno, produzindo um éster com 50 a 58% de grupos carboxílicos. São muito estáveis e pouco sensíveis à baixo pH e à cátions polivalentes, incluindo os íons cálcio e as proteínas. Devido a esta tolerância aos íons cálcio, este tipo de alginato pode ser usado em associação a produtos lácteos. O grupo hidrofóbico do propileno glicol denota uma molécula com baixa atividade interfacial, ou seja, com propriedades espumantes, emulsificantes e estabilizantes.

Alginatos de propileno glicol são utilizados quando é necessário obter estabilidade em ácido e nenhuma reação de interação com íons cálcio ou ainda, quando é necessário expressar a propriedade de superfície ativa. Assim, sua principal aplicação está em sobremesas e saladas de frutas, além de produtos lácteos. Nas sobremesas de baixas calorias apresentam-se associados à goma xantana. (BeMiller et al,1993)

A formação dos géis de alginato com alimento é obtida por resfriamento (temperatura de refrigeração) que envolve a dissolução de sais de cálcio, uma solução ácida solúvel e um sequestrante; em água quente, para permitir a dissolução dos componentes no momento que antecede o resfriamento. Géis produzidos desta maneira são muito mais estáveis.

Géis de alginato são razoavelmente estáveis ao calor apresentando pouca ou nenhuma sinérese. Géis associados à frutas podem ser usados em recheios resistindo a tratamentos de pasteurização e cozimento.

Os géis de alginato não são termoreversíveis e podem ser usados como géis em sobremesas que não necessitem de refrigeração. (BeMiller et al,1993)

5.2 – Considerações para Escolha do Bioindicador

Os indicadores biológicos empregados para avaliar o efeito microbiológico de um processo de esterilização devem ser preparados de modo a apresentar uma situação idêntica à real verificada em plantas de produção em série. A resistência do bioindicador é função da resistência térmica do microrganismo utilizado como alvo, da intensidade do agente esterilizante e da resistência mecânica à penetração do agente esterilizante oferecida pelo carregador. (Myers & Chrai, 1980)

Dentre as características que viabilizam o uso de esporos como indicadores de processos de esterilização cita-se:

⇒ Estabilidade - esporos são mais estáveis do que células vegetativas, o que proporciona manutenção das propriedades do organismo durante a propagação da cultura, bem como, durante a estocagem.

⇒ Resistência - esporos apresentam alta resistência à ação de agentes físicos e químicos devido à sua estrutura de capa e à sua multicamada de core, que é seletiva. Vale acrescentar que o teor de pontes dissulfeto e concentração de íons cálcio e de ácido dipicolínico (DPA) são diretamente proporcionais a sua resistência ao calor. (Myers & Chrai, 1980 ; Graham, 1986 ; Pflug, 1990)

⇒ Habilidade de responder às variações do ambiente - resposta quantitativa à temperatura, pH do substrato, disponibilidade de água e presença de substâncias químicas no ambiente. Facilidade de manuseio e produção de cultura

A resistência aos agentes esterilizantes, dos esporos comumente utilizados na elaboração de bioindicadores deve, obrigatoriamente, ser maior do que a resistência dos organismos contaminantes do produto a ser esterilizado, quer sejam células vegetativas ou esporos. Esta resistência excedente significa que os organismos indicadores reagem de forma mais lenta ao agente letal do que a carga contaminante.

Isto representa, portanto, o fator de segurança do indicador, uma vez que, quando o mesmo demonstrar que o processo de esterilização foi eficiente, é perfeitamente razoável assumir que uma carga igual ou maior de células vegetativas foi exterminada. (Pflug et al, 1980a ; Pflug e Odlaug, 1986 ; Kotilainen e Gantz, 1987)

Em geral esporos do gênero *Bacillus* são empregados como microrganismos indicadores para monitorar procedimentos de esterilização segundo Spicher (1988) .

Usp (1995) utilizou *B. stearothermophilus*, para esterilização com calor úmido e com formaldeído; *B. subtilis* var *niger* para esterilização com calor seco e com óxido de etileno e *B. pumilus* para radiação.

Já Pflug e Odlaug (1986) relatam também o uso de *B. subtilis* (ATCC 5230) e *B. coagulans* para esterilização com calor úmido e *B. subtilis* (ATCC 5230) e *B. stearothermophilus* para calor seco.

5.3 – Métodos de Contagem dos Sobreviventes a partir dos Bioindicadores

Ao utilizar-se esporos do microrganismo de interesse, assume-se que sua cinética de destruição seja conhecida e reproduzível. Para tanto, existem dois métodos para analisar a fração sobrevivente :

⇒ O método de *enumeração direta dos sobreviventes*.

⇒ O método de *sobrevivência e morte (análise da fração negativa ou da morte total)*

Na *enumeração direta dos sobreviventes*, avalia-se o número de esporos remanescentes do processo através da contagem de colônias, por diluição direta e plaqueamento em subcultura adequada. Este resultado está relacionado com a população inicial de microrganismos nos bioindicadores e, por isso, o número de reduções decimais pode ser calculado. Através desta curva, que é semi logarítmica para número de sobreviventes X tempo de processo, obtém-se o padrão de morte estudado sob condições constantes. (Pflug e Smith, 1977 ; Pflug, 1990)

Já pelo segundo método, conhecido como *análise quantal* ou *análise da fração negativa*, segundo Pflug (1990), as replicatas dos bioindicadores são submetidas ao processo desejado, incubadas e analisadas em termos de resultados positivos e negativos para crescimento dos sobreviventes. Há três possibilidades : todas as replicatas são positivas, todas negativas ou algumas positivas e outras negativas, fato que gera resultado dúbio, e por isso, deve ser analisado em comparação com processos padrão.

Na *análise da morte total*, as replicatas dos bioindicadores são igualmente submetidas ao processo térmico desejado, sendo posteriormente incubadas no binômio $t \times T$ de interesse. O resultado é negativo para o crescimento, indicando a eficiência do processo, porém não informa quanto acima do mínimo necessário está o processo aplicado, ou seja, a resposta deste tipo de análise é somente qualitativa e não quantitativa. Vale acrescentar que este método pode ser adaptado ao método de análise segundo Spearman-Kärber, já que é o mais indicado para determinação do valor **D** em indicadores biológicos utilizados em validação de processos térmicos. É importante salientar que ambos só podem ser aplicados para microrganismos que apresentem a cinética de destruição linear ! (Pflug et al, 1990).

A *figura 1* demonstra as áreas de medida que se estendem para cada método, de acordo com o número de sobreviventes, por unidade (ml ou g), após exposição ao processo de esterilização. A *enumeração direta dos sobreviventes* permite contar até 1 sobrevivente por unidade esterilizada. Já a faixa de medida para o método de *fração negativa* se estende de 5 até 0,01 sobreviventes por unidade e, abaixo deste valor, sobreviventes entre 0,01 e 0,001 serão determinados somente a partir do método de *análise de morte total*. (Pflug, 1990)

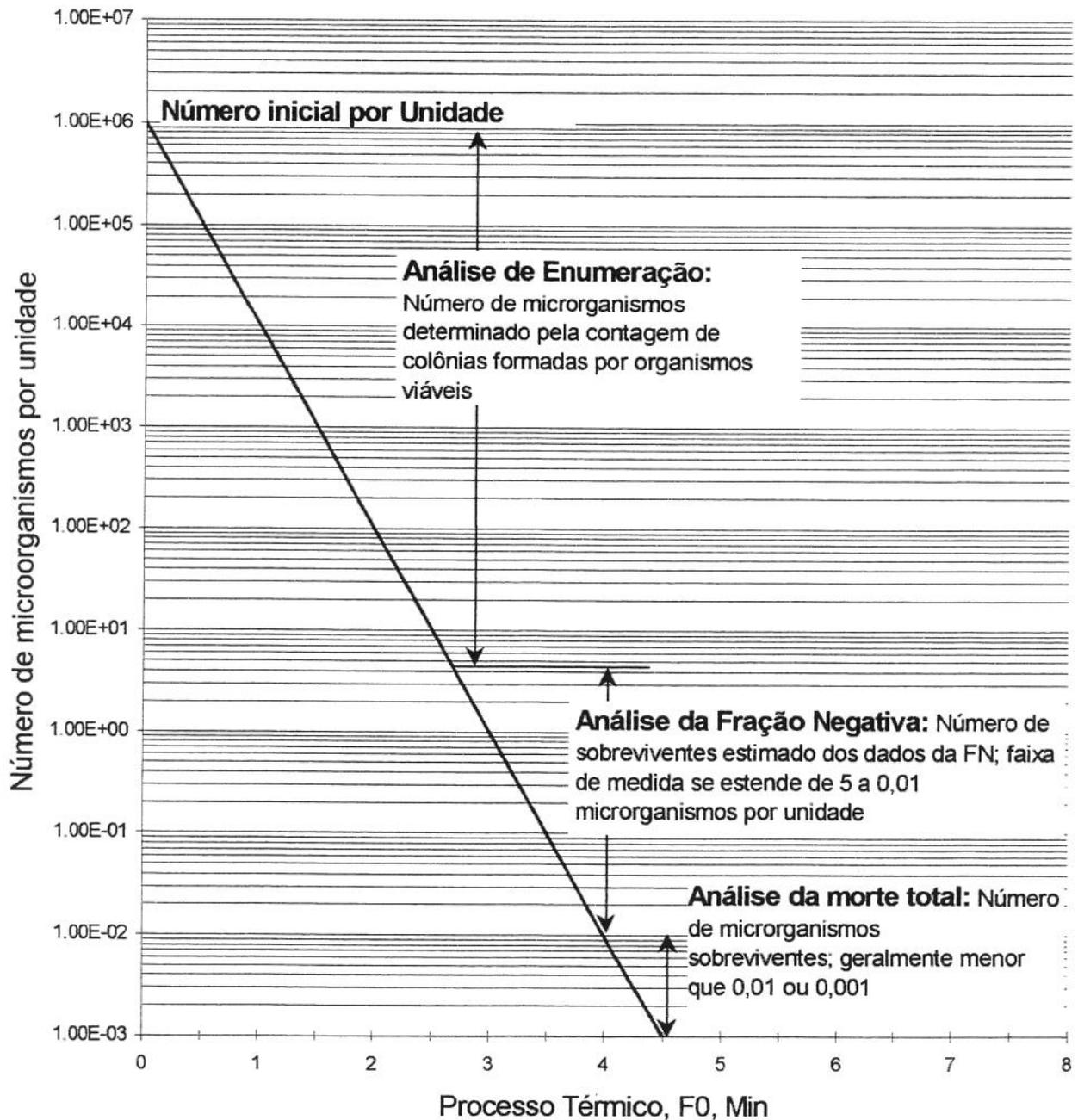


Figura 1 – Áreas de medida biológica em função do número de sobreviventes ao processo por unidade. (Fonte: Pflug, 1990)

6 – Opções para Seleção do Microrganismo Teste

Dependendo da aplicação, esporulados são preferidos como alvos nos ensaios de validação biológica de processos térmicos. Eles podem ser organismos deteriorantes mesofílicos ou termofílicos.

O nível de inoculação comumente usado é: $10^4 - 10^5$ esporos/esfera. De preferência, o microrganismo deve ter uma identidade única e ser de fácil detecção. Os parâmetros cinéticos D e Z devem ser determinados nas esferas com o microrganismo.

Para incubação após processo é importante manter as condições aeróbicas e anaeróbicas que existem na embalagem (Gaze et al, 1990 ; Marcy, 1997).

A *tabela 1* exemplifica microrganismos, associados a produtos, utilizados como bioindicadores

Tabela 1 – Microrganismos, associados a alimentos, utilizados como bioindicadores

<i>B. stearothermophilus</i>	Ervilha/alginato ; purê de rim/alginato ; Batata/alginato
<i>Cl. Sporogenes</i> PA3679	Purê de carne/alginato ; Frango/alginato
<i>Cl. Butyricum</i>	Pêssego/alginato
<i>Zigosaccharomyces bailii</i>	Pêssego /alginato
<i>Neosartorya fischeri</i> *	Polpa de tomate/alginato
<i>B. coagulans</i> CCT2467 *	Polpa de tomate/alginato

*selecionados para a presente pesquisa.

7 – Aplicação de Bioindicadores em Processamento de Alimentos

A aplicação industrial dos bioindicadores centra-se no fornecimento de dados para o cálculo do valor de esterilização aplicado ao produto, bem como, na verificação da eficiência de um processo que assegure a esterilidade comercial ou a aplicação de processo mínimo.

Em 1972, Hunter et al (citado por Brown et al, 1984 e por Dignan et al, 1989) descreveram um método de imobilização de suspensões de esporos de *Bacillus stearothermophilus* como bioindicadores para processos térmicos em sistemas de fluxo contínuo para alimentos particulados. Partículas de alimentos foram simuladas preparando-se esferas de metilmetacrilato (perspex) embebidas na suspensão de esporos. As dificuldades apresentadas por esta técnica relacionaram-se com o fato do valor **Z**, dos esporos neste sistema, ser da ordem de 61°C, o que é muito mais alto do que o valor padrão utilizado como base para o cálculo dos processos térmicos ($Z=10^{\circ}\text{C}$), e, que neste plástico, os esporos ficariam sujeitos à destruição por calor seco. Desta maneira, a taxa de morte se tornou função do teor de umidade do plástico utilizado no processo.

Na tentativa de produzir simulações de partículas com umidade semelhante à das partículas de alimento, em 1977, Dallyn et al (citado por Brown et al, 1984 e por Dignan et al, 1989) imobilizaram suspensões de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em alginato de sódio, preparando esferas de 1,6 a 2,2 cm de diâmetro, empregadas na validação biológica de processos contínuos de aquecimento-retenção-resfriamento.

Em 1979, esferas com 3,0 cm de diâmetro também foram utilizadas por Bean et al, (citado por Brown et al, 1984 e por Gaze et al, 1990) na avaliação do efeito letal de processos térmicos realizados em trocadores de calor de superfície raspada, operando na faixa de 138 a 142°C.

Posteriormente, a mesma técnica foi aprimorada e aplicada por Brown et al (1984). Suspensões de esporos de *Clostridium sporogenes* (PA 3679) e de *B. stearothermophilus* foram imobilizadas em cubos de 0,8 a 2,4 cm³ formados por misturas de alginato de sódio e purês de batata, de ervilhas ou ainda de carne. Para o primeiro microrganismo, cada cubo continha 10⁶ esporos e para o segundo, 10⁷ esporos. Os cubos foram aquecidos em câmara estática de aquecimento com vapor, na faixa de 120 a 150°C. Uma vez recuperados os sobreviventes, o valor de esterilização integrado F_s obtido foi comparado com valores F_s físicos calculados teoricamente. Conclusivamente, os valores F_s biológicos obtidos a partir dos cubos feitos com *B. stearothermophilus* apresentaram maior diferença em relação aos valores F_s físicos do que os F_s biológicos obtidos a partir dos cubos feitos com *Clostridium sporogenes*. As menores diferenças entre F_s físicos e F_s biológicos, foram observadas a partir da utilização de partículas de purê de carne/alginato, para ambos os microrganismos indicadores.

Richardson & Gaze (1986) e Nesaratnam & Gaze (1987), citados por Gaze et al (1990) utilizaram células vegetativas de *Zygosaccharomyces bailli* imobilizadas em cubos e esferas de pêssego/alginato. Os bioindicadores assim preparados foram submetidos às temperaturas de 60°C e 65°C em sistema de recirculação de fluxo. Após o processo, as partículas foram recuperadas e os sobreviventes foram devidamente contabilizados pelo método de contagem direta.

A letalidade do processo global foi avaliada considerando-se a cinética de destruição térmica dos microrganismos indicadores nas partículas, sendo que os valores de esterilização biológicos foram comparados com os valores de esterilização físicos calculados teoricamente. Como resultado, observaram que os valores F_s experimentais, obtidos a partir dos indicadores biológicos, foram semelhantes aos valores F_s físicos.

Em 1988, Gaze et al (citado por Gaze et al, 1990) realizaram experimentos em trocadores de calor de superfície raspada, entre temperaturas de 80 a 100°C, utilizando partículas de pêssego/alginato contendo suspensões de esporos de *Clostridium butyricum*. Nestes estudos, os valores F_s , de cada grupo de dados, apresentaram resultados próximos dos valores de esterilização calculados teoricamente.

Em outro estudo, Gaze et al (1990) determinaram a letalidade dos processos térmicos aplicados à esferas de purê de batata/alginato, purê de ervilhas/alginato e purê de rim/alginato, processadas em trocadores de calor de superfície raspada, entre temperaturas de 115 a 130°C. As esferas tinham diâmetro de 3,0 e 5,0 mm e o microrganismo indicador foi o *Bacillus stearothermophilus* (FS 210 e FS 223) inoculado na ordem de 10^7 esporos/esfera. Os resultados demonstraram que o uso do alginato de sódio, na produção das esferas, permite que o molde das mesmas tenha tamanhos e formatos variados. Mas, a taxa até 20% de recuperação das esferas inoculadas denotou que houve perda de esporos durante o processamento.

Devido à retenção excedente das esferas no sistema de trocadores de calor, não foi possível fazer comparações conclusivas entre os valores de esterilização biológicos e físicos. De qualquer maneira, relatou-se que o menor desvio padrão (0,92), dos

valores F_s , foi obtido a partir dos indicadores submetidos ao processo de 125°C, utilizando esferas de purê de batata/alginato.

No estudo descrito acima, a suspensão de esporos do microrganismo indicador foi homogeneizada no carregador, com intuito de formar as partículas. Assim sendo, caracterizou-se a inoculação indireta, que denota o resultado da medida do processo de esterilização integrado e não um resultado baseado no ponto geométrico ou no ponto mais frio da partícula. Uma das dificuldades deste método, segundo Dignan et al (1989), é que o número de partículas inoculadas em cada processo deve estar em torno de cem, uma vez que as mesmas sofrem danos ao longo do fluxo pelos trocadores de calor, e em alguns casos, perdendo-se esporos na linha de processo, poucas partículas intactas podem ser recuperadas.

Um outro método de inoculação indireta, porém com uma abordagem diferente, foi tentado por Herson e Shore (1981). Bulbos de vidro de 5,0 mm de diâmetro foram confeccionados a partir de tubos capilares inflados que, recebendo uma suspensão de esporos viáveis de *Bacillus stearothermophilus* da ordem de 10^6 / ml de solução de citrato tamponada, foram inseridos no centro de um cubo de cenoura, através de um orifício feito com uma broca esterilizada. Após a inserção dos bulbos, uma rolha preparada, à base do alimento utilizado, foi encaixada no orifício que, posteriormente, foi selado com resina "epoxi". As partículas correram o processo em trocador de calor "duplo cone" com sistema tipo Dole e, identificadas por envoltório de gaze, foram recuperadas para contagem de sobreviventes. Os resultados, quando comparados com os dados físicos de processo, foram satisfatórios em termos dos valores de F_0 biológicos.

Vale dizer que outros tipos de vegetais também podem ser utilizados, desde que possuam firmeza para corte em forma de cubo.

O modelo de Herson e Shore (1981), apresenta algumas vantagens consideradas necessárias para escolha do método, segundo Dignan et al (1989) :

⇒ A localização dos esporos nas partículas é determinada ;

⇒ A contagem dos esporos sobreviventes é viável e reflete a eficiência do processo já que todos os bulbos são recuperados ;

⇒ A suspensão utilizada para a preparação do bioindicador fixa-se no centro geométrico da partícula ;

⇒ A calibração do microrganismo indicador não é restrita ao produto utilizado.

Em 1989, Segner et al validaram biologicamente o processo asséptico de carne de peru com molho, em trocador de calor de superfície raspada. Para isto utilizaram cubos de carne de peru de 12,7mm, inoculados com suspensão de esporos de *C. sporogenes* (PA 3679). Com uma agulha , fios de linha de algodão inoculados com a suspensão de esporos foram posicionados no centro geométrico dos cubos. Um nó nas extremidades dos fios impedia que estes deslocassem no interior da partícula, durante o processamento, possibilitando a medida do efeito letal do calor no centro da partícula. Terminado o processo, os fio foram retirados das partículas para que os sobreviventes e a letalidade fossem determinados. Os valores F_0 biológicos foram comparados com os F_0 calculados a partir de simulações computadorizadas de transferência de calor para alimentos particulados. Os resultados muito próximos demonstraram a similaridade dos métodos.

Em 1990, Ronner trabalhou com um bioindicador elaborado a partir de um gel modificado de poliacrilamida, com 90% de água. Esferas transparentes de 8mm de diâmetro médio foram feitas utilizando-se *B. stearothermophilus* na ordem de 10^3 e 10^6 . As esferas foram introduzidas no sistema asséptico de esterilização a $125^\circ\text{C}/1\text{min}$ e $130^\circ\text{C}/2\text{min}$, com um produto básico. Após o processo, as esferas foram assepticamente separadas e colocadas em caldo nutriente contendo bromotimol, um indicador de pH, para observação de crescimento de possíveis sobreviventes, após 1 a 5 dias de incubação. A mudança da cor azul para amarelo, indicou o binômio de esterilização $125^\circ\text{C}/1\text{min}$ insuficiente para eliminar os sobreviventes, a partir das duas concentrações dos esporos. Conclusivamente, a técnica de bioindicadores validou um processo microbiologicamente seguro, como também forneceu informações sobre as características do fluxo no tubo de retenção. Além disso, a possibilidade de calcular valores D e Z, a partir dos bioindicadores, gera dados para o desenvolvimento de modelos mais sensíveis, que serão de grande valia na otimização de processos assépticos que preservem as características sensoriais e nutricionais do produto.

Em 1994, Cacace et al desenvolveram um procedimento matemático para determinar a letalidade em sistemas de esterilização contínua utilizando bioindicadores. A validação biológica do modelo foi conduzida pela inoculação de células de *S. cerevisiae* em cubos de batata, fluindo em planta piloto com seção de aquecimento-retenção tubular. Os valores experimentais da letalidade foram comparados com os valores teóricos obtidos a partir de um programa de computador que predizia a distribuição de temperatura dentro dos cubos, bem como a letalidade, usando equações diferenciais finitas. Os resultados foram muito próximos já que, no gráfico $\log N_0/N$ preditivo *versus* $\log N_0/N$ experimental obteve-se uma reta com inclinação de 45° , denotando a similaridade dos métodos.

8 – A Unidade de Processamento Contínuo Asséptico *Microthermics* UHT-HTST Lab-25-DH

A aplicação das técnicas de validação biológica requer a utilização de uma unidade de processamento desenhada para conseguir injetar esporos imobilizados antes do aquecimento do produto, bem como, coletá-los intactos após o resfriamento.

O modelo UHT/HTST Lab-25-DH é um sistema de processamento combinado HTST ("high temperature in short time") e UHT ("ultra high temperature") que processa produtos fluidos até temperaturas de 146 °C e pressões de até 350 psig, desenhado para ser muito flexível e que pode ser utilizado com uma gama grande de produtos e condições de processos. O sistema apresenta as seguintes características:

⇒ Dois aquecedores tubulares para o produto. O primeiro (pré-aquecedor) usa água quente para aquecer o produto antes do mesmo entrar no segundo aquecedor (aquecedor final) ou ser desviado para o homogeneizador.

⇒ A temperatura do produto, que sai do pré-aquecedor é controlada pelo ajuste da pressão de vapor usada para regenerar a água quente, bem como, pelo ajuste da quantidade de água quente que passa pelo pré aquecedor. O aquecedor final usa vapor para aquecer o produto indiretamente.

⇒ Um homogeneizador que pode ser colocado no fluxo do produto entre o pré-aquecedor e o aquecedor final

- ⇒ Diversos tubos de retenção que permitem a utilização de diversos tempos de retenção. Tempos de retenção podem ser obtidos a partir de diferentes combinações dos tubos existentes ou pelo controle de velocidade da bomba.
- ⇒ O produto pode ser resfriado dentro do sistema e a temperatura do produto frio é controlada pela variação do suprimento de meio de resfriamento (água). O resfriador neste sistema foi desenhado para permitir um resfriamento brando. Esta é uma etapa de resfriamento onde produtos de enchimento a quente são processados acima da sua temperatura e pressão de enchimento para inativar microrganismos, e então resfriados levemente até sua temperatura de enchimento a quente antes de sair do sistema à pressão atmosférica.
- ⇒ O sistema é equipado com uma válvula de contrapressão, após todos os aquecedores e resfriadores, que controla o produto e previne ebulição do mesmo durante o processo. Tanto a pressão do produto na saída da bomba como imediatamente antes da válvula de contrapressão são indicados no visor digital.
- ⇒ Temperaturas do produto e dos utilitários (vapor e água) são mostradas em visor digital. A temperatura desejada é mostrada selecionando-se o canal adequado. Canais de termopares e suas localizações no sistema estão no fluxograma que se encontra no segmento de materiais e métodos.
- ⇒ O equipamento possui um injetor e um coletor de esporos. O injetor está localizado antes do pré-aquecedor após a bomba, para que os esporos sejam rapidamente expostos à ação do calor, e o coletor após o resfriador. O coletor possui um filtro, em cuja malha de 0,045 polegadas (1,143mm), as esferas de esporos são capturadas. (Microthermics, 1999)

9 – Esterilização e Limpeza CIP da Unidade Asséptica

A esterilização e a limpeza da unidade de processamento asséptico deve ser minuciosa para assegurar que todas as porções do equipamento, que têm contato direto com o produto, estejam totalmente estéreis no momento do processamento. A esterilização deve ser feita antes de cada processo e a limpeza depois.

Para esterilização, o procedimento básico constitui-se em circular água na linha promovendo aquecimento do sistema à 121°C, sendo que o ponto mais extremo do sistema, ou seja, o ponto do enchimento asséptico, deve atingir esta temperatura, que deve ser mantida por 15min para que se efetive a esterilidade da unidade asséptica. (Microthermics, 1999)

Todos os equipamentos envolvidos no processamento de alimentos, após o turno de produção contínua, devem ser limpos e sanitizados, internamente, segundo o procedimento de limpeza asséptica CIP (Cleaning In Place). Isto significa que os agentes de limpeza e a água devem circular ao longo das bombas e de todos os segmentos do equipamento, que estão em contato direto com o produto. A vantagem deste tipo de limpeza centra-se no fato de que não é necessário desmontar ramos da linha de produção para sanitizá-los.

Os programas efetivos de limpeza e sanitização de plantas de processamento de alimentos requerem a seleção precisa dos detergentes e sanitizantes corretos para um tratamento eficiente. O objetivo dos mesmos segue o preceito de uma limpeza correta, resultando na morte das bactérias, com segurança para os operadores e para os consumidores do produto final.

A limpeza correta das superfícies é essencial para remover todas as partículas que funcionam como meio de propagação de bactérias. Para Forwalter (1980), a limpeza eficiente dos equipamento representa 90% de todo o trabalho de sanitização, enquanto que a aplicação dos sanitizantes permanece em 10%.

Segundo o mesmo autor, a seleção do detergente baseia-se na composição do equipamento a ser limpo, nas partículas e resíduos envolvidos, e no método de aplicação. Para equipamentos que entrem em contato direto com o alimento, o detergente eficiente é aquele que contém agentes de superfície ativa disponíveis para propiciar rápida lavagem e penetração, bem como, para emulsificar as gorduras e óleos. Os agentes sequestrantes também são importantes já que apresentam excelente desempenho em grande variedade de condições da água utilizada. Sob este aspecto, é necessário manter um pH adequado para que a solução de limpeza seja ativa e eficiente; por isso o detergente deve conter agentes tamponantes.

Algumas vezes, a viscosidade e a aderência de partículas de produtos gera a necessidade de uma limpeza ácida. A seleção deste tipo de produto é importante para evitar que resíduos do alimento em questão provoquem corrosão nos metais sensíveis ou mesmo no aço inoxidável dos equipamentos. Assim, recomenda-se produtos que contenham ácido fosfórico ou sulfato ácido, além de agentes com superfície ativa.

Dependendo do tipo de processo e , do tipo de produto, recomenda-se um detergente mais adequado. Produtos à base de soda cáustica são usados para remover sólidos cozidos ou volumes excessivos de qualquer partícula. Compostos clorados, por sua vez, removem gorduras e proteínas sem formação de filme residual.

Já os produtos ácidos, são usados para clarear equipamentos já que neutralizam resíduos alcalinos e/ou removem depósitos minerais.

Para equipamento e sistemas fechados como silos, evaporadores, pasteurizadores, tanques e linhas contínuas de processo, Forwalter (1980) recomenda como procedimento de limpeza a circulação de compostos alcalinos e depois de ácidos através de bombas, sprays e/ou tanques CIP.

Para seleção adequada do sanitizante, deve-se considerar os 4 principais grupos e seus respectivos méritos, para então, decidir qual o melhor. Estes grupos são classificados em função de seus principais ingredientes. São eles :

1) compostos clorados ; 2) compostos iodados ; 3) compostos com amônia quaternária e 4) germicidas surfactantes a base de ácido aniônico.

Na classificação de Forwalter (1980), os sanitizantes clorados são os mais usados no mercado já que apresentam excelente poder germicida frente à ampla gama de bactérias e esporos, se há alta temperatura com tempo de contato prolongado. Para produtos à base de mistura, são relativamente não tóxicos à concentração de uso, sem cor, não provocam manchas residuais, são de fácil preparo, aplicação e remoção, apresentando baixo custo de aquisição. Entretanto, possuem pequeno prazo de validade, odor característico, exercendo efeito adverso na pele e somente sendo efetivos se em concentrações de 200ppm de cloro ativo.

Os produtos à base de iodo constituem uma combinação deste elemento com agentes solubilizantes que liberam o iodo, desde que diluídos em água. Estes sanitizantes possuem rápida ação bactericida frente a grande variedade de microrganismos Gram

positivos e negativos, mas não a esporos. Na concentração de uso, são relativamente não tóxicos, não são corrosivos, não irritam as mucosas e são estáveis com alto poder de penetração. Apresentam extensa vida de prateleira e não requerem água potável, se a concentração de uso não exceder 25ppm de iodo disponível. No entanto, provoca manchas, a temperatura de aplicação deve ser inferior a 48°C para que o composto ativo não evapore, apresenta baixa atividade a pH maior ou igual a 7, e seu custo de aquisição é alto.

Já os produtos à base de amônia quaternária são igualmente efetivos frente a muitas bactérias Gram positivas. Na concentração de uso apresentam boa penetração, não possuem odor característico, cor e toxicidade. São estáveis quando aquecidos a diferentes temperaturas, não sendo requerida água potável para o enxágue, se a concentração de uso não exceder 200ppm de ingredientes ativos, além de apresentarem extensa vida de prateleira. No entanto, são incompatíveis com detergentes comuns, pouco efetivos frente a esporos, coliformes e microrganismos Gram negativos; além disso, formam filme indesejável na superfície tratada e possuem alto custo de aquisição.

Os germicidas surfactantes à base de ácido aniônico são combinações de ácidos orgânicos e inorgânicos com agentes de superfície ativa. O surfactante é geralmente um alcali sulfonado, e o ácido utilizado é o fosfórico. A acidez deste tipo de germicida é eficiente na remoção e controle da formação de incrustações de produtos a base de leite, ovos, bem como, as cervejas; mas não destrói organismos esporulados. Apresenta excelente ação bactericida sendo estável a altas temperaturas, não denota odor característico, não é corrosivo, não provoca manchas, não é tóxico e tem extenso prazo de validade. Mas, somente é comercialmente

efetivo a pH ácido inferior a 3,0. Vale acrescentar que corrói metais e aço inoxidável. A concentração requerida está em torno de 100ppm de amônia ativa.

As precauções de segurança são necessárias para alcançar os objetivos de sanitização. Para Forwalter (1980), a regra mais importante centra-se em nunca misturar compostos concentrados de amônia quaternária com compostos altamente clorados, já que esta mistura libera muito calor e denota risco de explosões e incêndios provocando danos nos equipamentos e possíveis lesões nos operadores. Por isso, todos os participantes da sanitização em plantas de processamento de alimentos devem estar equipados com luvas, botas, óculos de proteção e aventais de borracha.

10 – O Valor de Esterilização

O processamento térmico é usado para preservação dos alimentos e o efeito letal sobre os microrganismos patogênicos e deteriorantes é obtido pela combinação das variáveis temperatura e tempo (Stumbo, 1973). O efeito desta associação é geralmente expresso em termos do valor de esterilização requerido, ou seja, o valor F. A unidade referência da letalidade, definida como F_0 , é comumente utilizada para representar o efeito do processo de esterilização baseado na temperatura de referência de 121°C e no valor Z de 10°C. Para sistemas térmicos com mudança de temperatura, F_0 é dado por :

$$F_0 = \int_0^t 10^{[T_{\text{processo}} - T_{\text{ref}} / Z]} dt \quad (7)$$

Técnicas para validar a equação 7 foram desenvolvidas por Ball, em 1928, por Cheftel e Thomas, em 1963, e até por Pflug, em 1988a. Mas limitações nos procedimentos geraram pesquisas que sugerissem outros métodos para determinação prática dos processos térmicos.

Dentre as pesquisas, em 1982, Swartzel obteve sucesso quando desenvolveu o Método de Ponto Equivalente (EPM) baseado na cinética de Arrhenius. O método foi usado para caracterizar sistemas térmicos que, à primeira impressão, pareciam ser independentes dos parâmetros cinéticos de qualquer constituinte de interesse. Foi demonstrado que qualquer sistema térmico poderia ser representado por um ponto equivalente definido em termos de tempo equivalente (t_e) e da temperatura equivalente (T_e).

O conceito EPM tornou possível determinar o impacto do tratamento térmico em diferentes constituintes sem referência direta aos dados originais de temperatura. Isto representou uma vantagem sobre o método tradicional que era limitado pela simples análise do constituinte de interesse.

10.1 – Considerações sobre o Método do Ponto Equivalente

A determinação do EPM envolve o cálculo das relações de reduções térmicas (valor G) usando uma série de valores de energia de ativação (E_a) e dados de temperatura e tempo. Para cada par $G-E_a$ várias temperaturas e tempos podem ser gerados. Quando a plotagem dos pontos no gráfico $\log t$ versus T é feita para cada par $G-E_a$, as curvas características tendem a interceptar-se em um único ponto. (Swartzel, 1982)

A existência de um simples ponto de intersecção compreende uma suposição de que o ponto equivalente independe da energia de ativação. Foi observado que um ponto perfeito de intersecção não é sempre obtido. Sadeghi et al (1986) atribuíram o problema à possíveis erros nos termopares, bem como, limitações computacionais.

Segundo Farkas et al (1999), estudos publicados posteriormente demonstraram notáveis aperfeiçoamentos na determinação do EPM : Nunes et al. (1993) e Nunes (1993) introduziram uma reparametrização para o EPM mostrando que, em todos os casos houve incremento na precisão do EPM computacional.

Para determinação de um ponto de intersecção equivalente é necessário um mínimo de 2 pares de valores G-E_a . À título de ilustração, segue o desenvolvimento das equações que permitem a obtenção do binômio equivalente para um processo de interesse :

A equação 8 representa a inativação de esporos mediante reação de primeira ordem :

$$dN / dt = - kN \quad (8)$$

que pode ser rearranjada como :

$$\ln (N_0 / N) = \int_0^t k dt \quad (9)$$

A taxa de reação k está relacionada com a temperatura proveniente da equação de Arrhenius :

$$k = A \exp (-E_a / RT) \quad (10)$$

Substituindo a equação 10 em 9 e isolando A :

$$\ln (N_0 / N) / A = \int_0^t \exp [-(E_a / RT(t))] dt \quad (11)$$

Swartzel (1982), definiu o primeiro termo da equação 11 como a relação de redução térmica (G). Para qualquer processo que não seja isotérmico, o impacto total do processo de interesse pode ser dado pela expressão que associa a equação 11 ao binômio t X T equivalente :

$$G = \int_0^t \exp [-(E_a / RT_e)] dt \quad (12)$$

Linearizando a equação 12 é possível obter:

$$\ln G_1 = \ln t_e - E_a / RT_{e1} \quad (13)$$

$$\ln G_2 = \ln t_e - E_a / RT_{e2} \quad (14)$$

A resolução simultânea das equações 13 e 14 gera T_e e t_e :

$$T_e = (E_{a2} - E_{a1}) / R \ln (G_1 / G_2) \quad (15)$$

$$t_e = G_1 \exp (E_{a1} / RT_e) \quad (16)$$

ou :

$$t_e = G_1 \exp ((E_{a1} \ln (G_1 / G_2)) / (E_{a2} - E_{a1})) \quad (17)$$

Quando as equações 15 e 17 são aplicadas para vários pares $G-E_a$, os resultados mostram que os valores de T_e e t_e diferem ligeiramente. Consequentemente isto resulta em múltiplos pontos de intersecção que devem ser aproximados para que um único valor que represente o binômio equivalente. (Farkas, 1999)

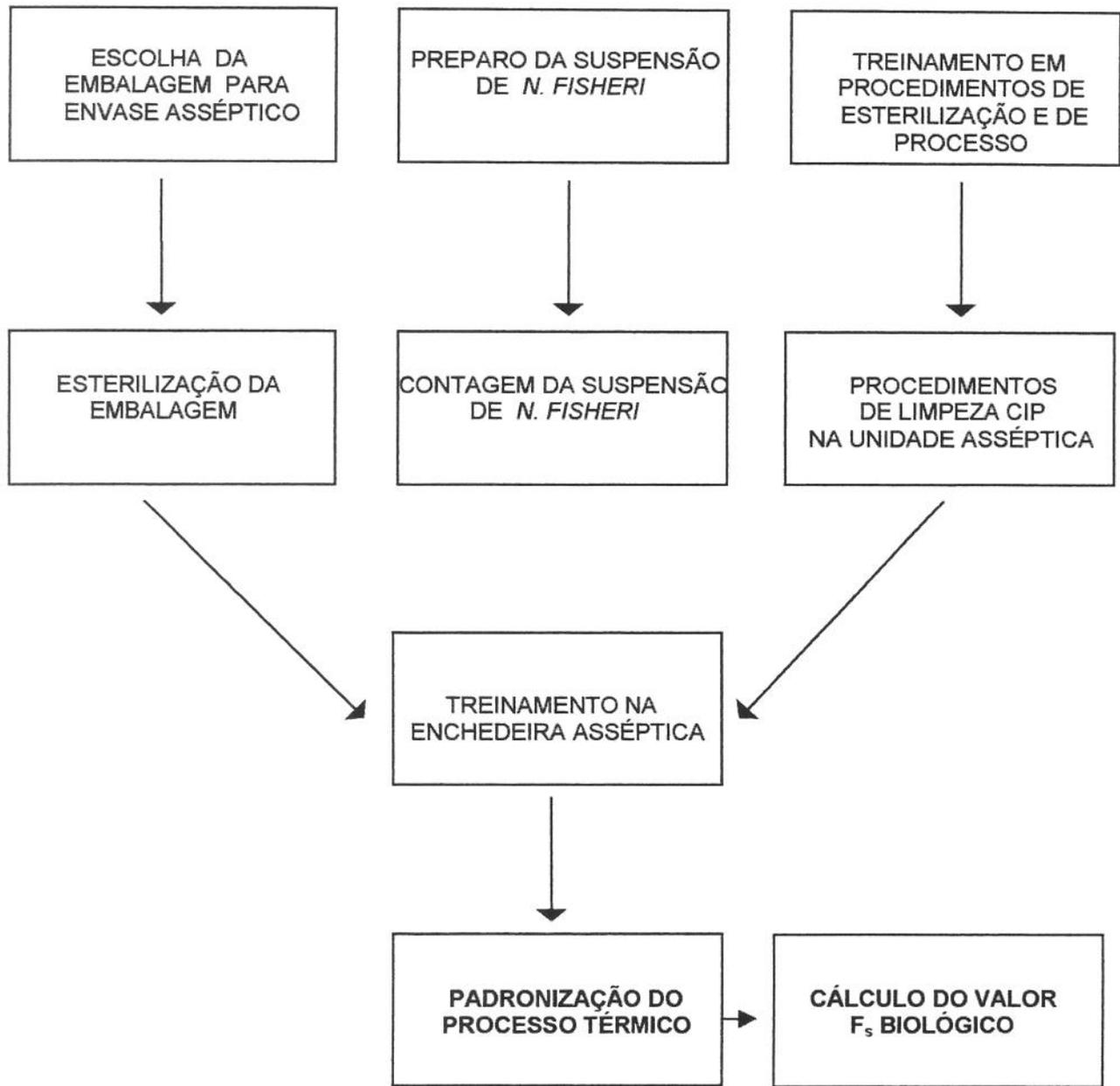
Estes procedimentos são feitos em softwares computacionais a partir da entrada dos dados de tempo, temperatura e características do constituinte de interesse.

Vale acrescentar que, processos equivalentes também podem ser parametrizados a partir da velocidade máxima desenvolvida no sistema de esterilização, taxa de fluxo, e dimensões da unidade de processamento comercial e laboratorial, para que o tempo de residência do tubo de retenção do sistema equivalente seja o mesmo aplicado no processo real. (Toledo, 1991)

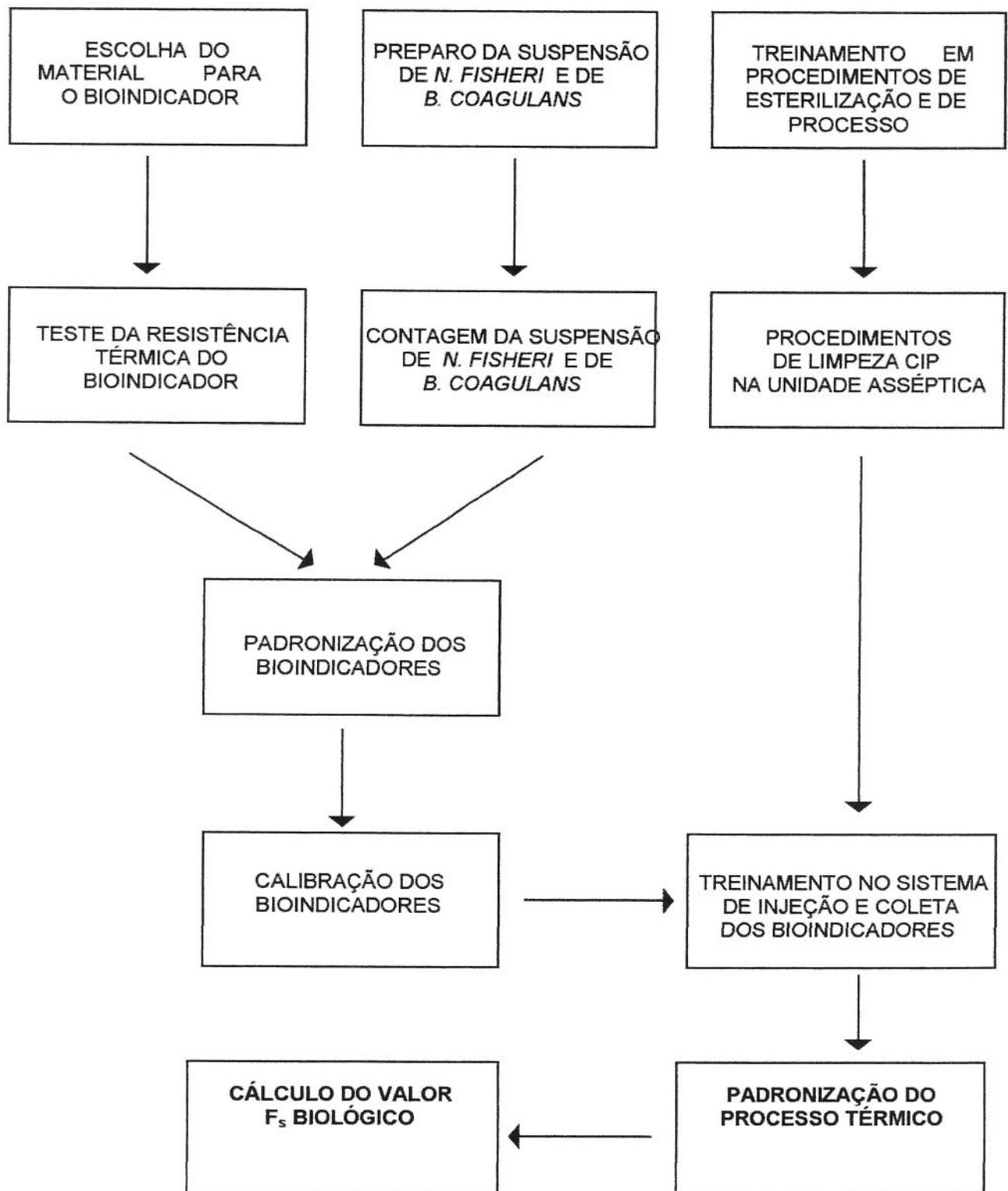
MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Fluxograma do Trabalho Prático

FASE LABORATORIAL – INOCULAÇÃO DIRETA



FASE LABORATORIAL – INOCULAÇÃO INDIRETA



2 – A Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi a polpa de tomate 8°BRIX a pH 4,3, com densidade 1,03g/ml e viscosidade 1,0Pa.s, envasada em embalagem cartonada multicamadas e produzida durante a safra e a entressafra de 1999/2000. Este produto foi recebido de uma indústria processadora de derivados de tomate do estado de São Paulo .

3 – As Culturas

A cepa do fungo *Neosartorya fischeri* foi isolada, no Laboratório de Termobacteriologia, em 1998, por Baglioni. Este microrganismo foi considerado o mais termorresistente (100°C/25min) dentre 50 linhagens analisadas a partir de uma indústria processadora de derivados de tomate, situada em Goiás. Seu código para identificação é I16L4PAB (isolado nº16 do lote 4 proveniente da água bruta da linha de processo).

Já a bactéria, é uma cepa de *Bacillus coagulans* proveniente da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, mantida ativa, no Laboratório de Termobacteriologia desde 1997. Seu código para identificação é CCT 2467.

4 – A Embalagem

Para evitar a possível contaminação pós processo, advinda da embalagem cartonada que apresentou microfuros e permeabilidade média de 0,031ml de oxigênio/caixa. dia.ambiente, optou-se pela utilização de garrafas de vidro de 220ml, já que as mesmas apresentaram permeabilidade média de 0,0052 ml de oxigênio / garrafa. dia. ambiente, valor aceitável e inferior ao verificado na embalagem cartonada original.

5 – Os Sanitizantes

Para limpeza e sanitização da unidade asséptica foram utilizados os seguintes compostos, sendo que as respectivas atividades esporicidas, foram testadas para os microrganismos, bem como, para os processos aplicados:

⇒ <i>Desinfetante alcalino</i>	Mikro Chlor (dicloro de sódio)
<i>Fornecedor</i>	ECOLAB
<i>Função</i>	Ação desinfetante
<i>Concentração usual</i>	3,1g / l de água
⇒ <i>Desinfetante ácido</i>	Elsolve 97 (ácido sulfâmico)
<i>Fornecedor</i>	ECOLAB
<i>Função</i>	Ação detergente
<i>Concentração usual</i>	1,3g / l de água
⇒ <i>Desinfetante ácido</i>	P ₃ Oxônia (ácido peracético)
<i>Fornecedor</i>	ECOLAB
<i>Função</i>	Ação germicida/esporicida
<i>Concentração usual</i>	1,5g / l de água

6 – A Desaeração da Polpa de Tomate 8°BRIX

Foi necessário desaerar o volume de polpa de tomate a ser processado já que este produto incorpora muito ar durante o processo/envase. Isto gerou, na unidade asséptica *Microthermics* de escala laboratorial, elevados níveis de pressão que dificultaram a manutenção do regime constante de vazão, pressão e temperatura.

Assim, antes de todos os processos aplicados nesta pesquisa, a amostra foi desaerada em Multiprocessador Stephan IGE-Brasil, disponível na Faculdade de Engenharia de Alimentos, sob o seguinte procedimento :

1. Montar o sistema de pás do equipamento;
2. Ligar o processador;
3. Abrir a válvula de entrada de água;
4. Fechar a válvula de entrada de vapor no tacho;
5. Purgar o condensado proveniente das tubulações de vapor nos três pontos de dreno;
6. Abrir as válvulas da linha de vapor, regulando a última em $0,5 \text{ kgf/cm}^2$;
7. Inundar o tacho com água;
8. Abrir a válvula de entrada de vapor no tacho;
9. Permitir que o vapor aqueça a água até 90°C para higienizá-lo;
10. Quando atingir 90°C , fechar a válvula de entrada de vapor no tacho;
11. Descartar a água quente;
12. Repetir os procedimentos dos itens 7, 8, 9, 10 e 11;
13. Verter a polpa de tomate previamente aquecida a 45°C preenchendo metade do volume total do tacho;
14. Fechar a tampa do tacho;
15. Fechar a válvula de escape do vácuo;
16. Ligar a bomba de vácuo;
17. Desaerar por 8min;
18. Desligar a bomba de vácuo;
19. Abrir a válvula de escape do vapor;
20. Abrir a tampa do tacho;
21. Remover o volume desaerado;
22. Repetir os procedimentos dos itens 13 a 21 conforme o volume a ser desaerado;

23. Enxaguar o equipamento;
24. Remover as pás;
25. Repetir os procedimentos dos itens 6, 7, 8, 9, 10 e 11 até a água sair limpa;
26. Fechar todas as válvulas de entrada de vapor;
27. Desligar o equipamento.

7 – Metodologia para Produção, Coleta dos Esporos e Ativação Térmica de *Neosartorya fischeri* e de *Bacillus coagulans*

7.1 – Produção e Coleta dos Esporos

A cepa do fungo *Neosartorya fischeri* selecionada foi inoculada em 60 garrafas de Roux contendo 200ml de Ágar Extrato de Malte (MEA), sendo estas garrafas incubadas à 30°C por três meses, pois para este fungo foi demonstrado que o tempo de incubação, durante a esporulação, acaba afetando sua resistência térmica e influenciando diretamente seu desenvolvimento (Tournas & Traxler, 1994).

Para coleta dos ascosporos, 25ml de água destilada foram transferidas para cada garrafa e a superfície do fungo raspada levemente com o auxílio de uma bagueta estéril. A suspensão resultante foi filtrada em gaze estéril para remover fragmentos de hifas, sendo submetida à 3 centrifugações de 10000 rpm/15min/5°C (com lavagens sucessivas) para separar esporos de células viáveis/hifas. Posteriormente, foi necessário colocar a suspensão em ultrasom a 0-4°C com incrementos de 2min até a obtenção de ascosporos livres (mediante verificação microscópica). A suspensão assim tratada ficou estocada sob refrigeração à temperatura de 4°C em frasco com pérolas de vidro, até uso posterior. (Baglioni, 1998)

Para *Bacillus coagulans* o procedimento foi o mesmo, no entanto, a cepa foi inoculada em 60 garrafas de Roux contendo 200ml de meio de subcultura NA acrescidos de 5ppm de Mn^{++} para conferir maior resistência aos esporos. As garrafas foram incubadas a 37°C por um mês, pois esta cepa apresentou maior contagem quando incubada nesta temperatura, por este tempo.

Para coleta dos esporos de *Bacillus coagulans* repetiu-se o procedimento adotado para o fungo, sendo que após 3 centrifugações a suspensão foi estocada sob refrigeração à temperatura de 4°C em frasco com pérolas de vidro, até uso posterior. Não foi necessário colocar a suspensão em ultrassom.

7.2 – Ensaio de Ativação Ótima dos Esporos

Para determinação das condições ótimas de ativação dos ascosporos de *Neosartorya fischeri* foi utilizada a temperatura de 85°C. O tempo ótimo de **20min**, à 85°C, em polpa de tomate, foi aplicado por Baglioni (1998) já que, utilizando este binômio encontrou, para mesma cepa utilizada neste experimento, a maior taxa de recuperação dos ascosporos submetidos ao choque térmico.

Para determinação das condições ótimas de ativação dos esporos de *Bacillus coagulans* utilizou-se o binômio de **88°C/5min** já que, neste recuperou a maior porcentagem de sobreviventes segundo a metodologia de Pflug (1990) para este microrganismo.

7.3 – Contagem da Suspensão de *Neosartorya fischeri* e de *Bacillus coagulans*

Após preparo da suspensão de *Neosartorya fischeri*, foi necessário determinar a concentração da mesma, em termos de UFC/ml. Para tanto pipetou-se 1ml da suspensão agitada em 9ml de polpa de tomate 8°BRIX estéril. A mistura recebeu choque térmico ótimo de ativação à **85°C/20min** em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de precisão). Decorrido o tempo de atraso térmico do tubo, de 12min, mais o tempo de choque, o tubo foi resfriado em banho de gelo e a partir dele, foram feitas diluições decimais sucessivas e plaqueamento em profundidade, em duplicata, no meio de subcultura adequado MEA. As placas assim tratadas, foram incubadas invertidas à $30^{\circ}\text{C}/7$ dias. A contagem das placas foi feita diariamente até o final do período de incubação e o resultado determinou a população do fungo por unidade de volume.

A concentração da suspensão de *Bacillus coagulans* também foi determinada. Transferiu-se 1ml da suspensão inicial em 9ml de polpa de tomate 8°BRIX estéril. A mistura também recebeu choque térmico de ativação, mas seguindo o binômio ótimo de **88°C/5min**, em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de precisão). Decorrido o tempo de atraso térmico do tubo, de 12min, mais o tempo de choque, o tubo foi resfriado em banho de gelo e dele transferiu-se 1ml para tubos com 9ml de água peptonada 0,1% a fim de fazer diluições decimais sucessivas e plaqueamento em profundidade, em duplicata, no meio de subcultura adequado DTA. As placas assim tratadas foram incubadas invertidas à $37^{\circ}\text{C}/2$ dias. A contagem das placas foi feita diariamente até o final do período de incubação e o resultado determinou a população da bactéria por unidade de volume.

8 – Avaliação Esporicida do Mikro Chlor e do P₃ Oxônia

8.1 – Avaliação do Mikro Chlor

Foi testada a concentração de 150ppm de Mikro Chlor, recomendada pelo fabricante, frente à ascosporos livres ativados de *Neosartorya fischeri* em polpa de tomate, através do procedimento descrito abaixo :

No primeiro tubo, pipetou-se 0,5ml da suspensão de ascosporos livres de *Neosartorya fischeri* em 4,5ml da polpa de tomate, e no segundo preparou-se 4,5ml da solução de Mikro Chlor a 150ppm.

O primeiro tubo recebeu choque térmico de ativação em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de precisão) seguindo o binômio ótimo de **85°C/20min** definido por Baglioni (1998) para o fungo. Após este tratamento, o mesmo foi resfriado em banho de gelo.

Posteriormente pipetou-se 1ml do primeiro tubo para fazer diluições sucessivas e plaqueamento, em duplicata, no meio de subcultura adequado MEA, incubando as placas invertidas à 30°C por 7 dias. A partir do mesmo, transferiu-se 0,5ml para o tubo que continha o Mikro Chlor mantendo 10min de contato. A partir deste último tubo transferiu-se 1ml para um outro com 1ml de neutralizante (0,7ml de tiosulfato de sódio 0,1N + 0,3ml de água destilada estéril) mantendo 2min de contato. Feito isso, transferiu-se 1ml da solução final para fazer diluições sucessivas e plaqueamento, em duplicata, em MEA, incubando as placas invertidas à 30°C por 7 dias. Os resultados foram lidos, observando a população inicial e final para calcular a redução decimal obtida. (INCQS, 1985)

8.2 – Avaliação do P₃ Oxônia

Foram testadas as concentrações de 0,25% (baseado na porcentagem de 13,5% de ácido peracético na solução P₃ Oxônia) e 0,3% (baseado no produto) frente à esporos de *Neosartorya fischeri*.

Pipetou-se 0,5ml da suspensão de *N. fischeri* em 4,5ml de polpa de tomate, para que ambos recebessem choque de ativação em banho termostático (Polystat® com ± 0,1°C de precisão) seguindo o mesmo binômio de Baglioni (1998). Feito isso, transferiu-se 0,5ml da mistura ativada para 4,5ml da solução de ácido peracético na concentração a ser testada. Após 10min de contato, transferiu-se três alçadas desta solução para um tubo contendo caldo glicosado 2%. O tubo foi incubado à 30°C por 7 dias. O possível crescimento foi observado por turbidez. (INCQS, 1985)

9 – Validação do Processo Térmico Utilizando Suspensão de Ascosporos Livres de *Neosartorya fischeri*

Foram testados processos térmicos, na unidade asséptica, variando entre 105°C e 126°C, sendo que, nesta faixa encontram-se os processos aplicados industrialmente. O tempo de retenção aplicado foi de 30seg para 105°C, 109°C, 115°C e 121°C, sendo que para 126°C utilizou-se o tempo de retenção de 60seg. A verredura dos dados de temperatura foi feita a cada 10seg, no registrador da unidade asséptica. A taxa de fluxo foi de 1 l/min similar à equivalente nas indústrias processadoras.

Foram aproximados processos UHT, pelo Método de Ponto Equivalente (Miles & Swartzel, 1995 a), considerando-se os tipos e dimensões dos trocadores de calor, taxa de fluxo e velocidade de escoamento do produto.

9.1 – Parâmetros de Destruição Térmica Utilizados

Mediante dados de Baglioni (1998), o valor $D_{94^{\circ}\text{C}}$ obtido, para ascosporos de *Neosartorya fischeri* com três meses de incubação e provenientes da safra de tomate de 1996, foi estimado em **4,59 min** com $Z=11,6^{\circ}\text{C}$. Estes dados foram considerados para extrapolar e encontrar $D_{121^{\circ}\text{C}}$ de **1,29s** para o cálculo do F_s a 121°C experimental, bem como, para encontrar os valores D para as temperaturas aplicadas nos processos de validação.

9.2 – Cálculo do Inóculo

Para calcular o volume da suspensão de *Neosartorya fischeri*, por garrafa (60ml), necessário para de obter a probabilidade de 20% de contaminação, ou seja, 20 garrafas contaminadas em 100 garrafas envasadas, aplicou-se os dados de Baglioni (1998) e os dados de processo às seguintes fórmulas :

Dados :

- $D_{94^{\circ}\text{C}} = 4,59\text{min}$
- $Z = 11,6^{\circ}\text{C}$
- $N = 0,2$ (20%) UFC/garrafa
- $T_2 = 94^{\circ}\text{C}$
- $t = 30$ seg ou 60 seg (dependendo do processo aplicado)

Equação da Curva TDT : $\log D_2 - \log D_1 = -1/Z (T_2 - T_1)$ (18)

Aplicando o valor conhecido de $D_{94^{\circ}\text{C}}$ em D_2 , o valor de $Z=11,6^{\circ}\text{C}$ e de $T_2=94^{\circ}\text{C}$ na equação 18, foi possível calcular o valor de D_1 à temperatura T_1 de interesse, para os diversos processos que seriam aplicados.

Com o valor de D_1 , o valor de N e de t , determinou-se o valor de N_0 , usando a equação 19 :

$$\text{Equação da Curva de Sobreviventes : } \log N - \log N_0 = -t / D_1 \quad (19)$$

Conhecendo a população necessária N_0 , por garrafa, e o volume de produto processado na temperatura de interesse, foi possível calcular a concentração total de microrganismos que deveriam ser inoculados na polpa de tomate e, por consequência o volume de suspensão adicionado assepticamente.

9.3 – Inoculação Direta dos Ascosporos de *Neosartorya fischeri*

Foram inoculados ascosporos livres, em suspensão, de *Neosartorya fischeri*, no volume como determinado acima, na polpa de tomate desaerada, seguido de agitação com bagueta de vidro estéril, a fim de promover a homogeneização do inóculo.

Decorrido o processo térmico, a polpa de tomate foi envasada em 100 garrafas de vidro (220ml) esterilizadas à 121°C por 15min e seladas assepticamente com tampas tipo coroa, sanitizadas com P₃ Oxônia 0,3% p/v, por 10min de contato; na probabilidade de obter 20% de contaminação, ou seja 20 garrafas contaminadas em 100 garrafas incubadas. Para processos onde este índice foi inviável para uma população inicial compatível, devido a alta temperatura (121°C e 126°C) que causa maior destruição, aplicou-se o inóculo seguindo o padrão da maior contaminação comercial verificada em planta de processamento, ou seja, 9 UFC / 100ml de amostra .

Um volume processado, de 60ml de polpa de tomate 8°BRIX, por garrafa, foi envasado em câmara de fluxo laminar, devidamente sanitizada com P₃ Oxônia 0,3% p/v, por 10min de contato. As 100 garrafas foram incubadas inclinadas, já que desta maneira tornou-se possível observar o possível crescimento do bolor sobrevivente, sem abrir a embalagem, obtendo a maior superfície de contato, durante a incubação à 30°C, bem como, excluiu a possibilidade de contaminação pós-processo. Cabe ressaltar que, na garrafa, além dos 60ml de polpa processada, existem mais 160ml de espaço livre com 33,6ml de oxigênio disponíveis para permitir o desenvolvimento do fungo. Durante o período de incubação, as garrafas foram verificadas semanalmente e, após os 30 dias, descartadas.

10 – Validação da Esterilização de Polpa de Tomate Utilizando Esporos Imobilizados de *N. fischeri* e de *B. coagulans* em Alginato de Sódio

Semelhante à inoculação direta, também foram testados processos térmicos variando entre 105°C e 126°C, onde o tempo de retenção aplicado também foi de 30seg para 105°C, 109°C, 115°C, 121°C e 124°C. Além destes, foi testado um processo à 126°C com 60seg de retenção, somente com ascospores imobilizados de *Neosartorya fischeri*, bem como, outro a 126°C, sem os tubos de retenção, para que se verificasse somente o efeito da letalidade nos aquecedores e resfriadores. A varredura dos dados de temperatura foi feita a cada 10seg, no registrador da unidade asséptica. A taxa de fluxo também foi de 1 l/min similar às equivalentes nas indústrias processadoras.

Foram aproximados processos UHT, pelo Método de Ponto Equivalente (Miles & Swartzel, 1995 a), considerando-se os tipos e dimensões dos trocadores de calor, taxa de fluxo e velocidade de escoamento do produto.

10.1 – Parâmetros de Destruição Térmica Utilizados para Ascosporos Imobilizados de *Neosartorya fischeri*

O método de análise por *enumeração direta dos sobreviventes* foi utilizado já que a curva de morte do *Neosartorya fischeri* apresenta "ombro", ou seja, não segue a cinética de primeira ordem; fato que inviabilizou a análise quantal.

Para o ensaio de termorresistência dos ascosporos imobilizados de *Neosartorya fischeri*, foram testadas as temperaturas de 100°C, 105°C, 107°C e 109°C aplicando os seguintes tempos programados de aquecimento :

para 100°C : 52seg, 104seg, 155seg, 207seg e 258seg ;

para 105°C : 23seg, 46seg, 69seg, 92seg e 115seg ;

para 107°C : 18seg, 35seg, 52seg, 69seg e 86seg ;

para 109°C : 13seg, 27seg, 40seg, 53seg e 67seg.

O método do tubo TDT selado foi utilizado para avaliar o parâmetro **D**, segundo Stumbo (1973) : os tubos estéreis, em duplicata para cada tempo de choque térmico, foram preenchidos, assepticamente, com 1,8ml de polpa de tomate 8°BRIX estéril e inoculados com 0,2ml da mistura do bioindicador preparado, seguido de homogeneização. Posteriormente, os tubos foram selados assepticamente, com maçarico, e colocados em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^\circ\text{C}$ de precisão), ajustado à temperatura de aquecimento.

O tempo de subida, até a temperatura de interesse, foi determinado previamente, utilizando um termopar flexível (tipo T) para monitorar a temperatura no tubo TDT devidamente preenchido. Após cada tempo de aquecimento aplicado, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo sendo higienizados com P₃ oxônia a 0,3% p/v.

Após o procedimento descrito acima, os tubos foram abertos assepticamente, em câmara de fluxo, e através de diluições decimais sucessivas fez-se um plaqueamento em profundidade, em duplicata, no meio de subcultura MEA. As placas foram incubadas à 30°C e a leitura do número de colônias formadas foi feita diariamente até o sétimo dia de incubação. A contagem foi expressa em UFC/ml. Sabendo o número de sobreviventes e o tempo respectivo de aquecimento, foram construídas curvas de morte térmica, aplicando o método de linearização de Alderton e Snell (1970) para determinação de **D** (1/K) e **Z**.

10.2 – Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica Utilizados para Esporos Imobilizados de Bacillus coagulans

Para determinação do parâmetro **D** e **Z**, para *Bacillus coagulans*, foi utilizado o método de análise quantal de Spearman-Kärber, já que este microrganismo apresenta cinética de primeira ordem e este método é o mais indicado para determinação do valor D de esporos imobilizados em bioindicadores.

A região quantal foi determinada para que o primeiro, ou o menor tempo de aquecimento denotasse todas as replicatas positivas para o crescimento e, para que o último ou o maior tempo apresentasse todas as replicatas negativas (Pflug, 1990).

Sob este enfoque, após a determinação da região quantal, 6 tempos de aquecimento foram definidos para cada uma das 4 temperaturas utilizadas :

para 100°C : 120seg, 240seg, 360seg, 480seg, 600seg e 720seg;

para 105°C : 36seg, 72seg, 108seg, 144seg, 180seg e 216seg;

para 107°C : 24seg, 48seg, 72seg, 96seg, 120seg e 144seg;

para 109°C : 15seg, 30seg, 45seg, 60seg, 75seg e 90seg;

Após a determinação dos binômios T x t, foi aplicada a mesma metodologia do tubo TDT descrita para o fungo. Entretanto, foram aquecidos 6 tubos por tempo, sendo que, após os choques térmicos e abertura dos mesmos, foi transferido 1ml da mistura para 9 ml do meio de subcultura DTB; incubando o material a 37°C por 2 dias. A leitura do crescimento positivo ou negativo, observada pela mudança de cor do meio, foi feita diariamente até o final da incubação. Sabendo o resultado do crescimento, aplicou-se os dados nas seguintes fórmulas :

$$U_{SK} = \sum_{i=1}^{k-1} (U_{i+1} + U_i / 2) \cdot (r_{i+1} / n_{i+1} - r_i / n_i) \quad (20)$$

onde :

U_{SK} = tempo de aquecimento estimado em minutos

U_i = tempo i de aquecimento em minutos

r_i = número de replicatas estéreis à U_i

n_i = número total de replicatas aquecidas a U_i

k = primeiro tempo onde todas as replicatas estão estéreis

Após determinação de U_{SK} , o valor D_T foi obtido segundo Holdcomb & Pflug (1978):

$$D_T = U_{SK} / \log N_0 + 0,2507 \quad (21)$$

onde :

D_T = valor **D** em minutos

U_{SK} = tempo de aquecimento estimado em minutos

N_0 = população inicial em UFC/ml

De posse do valor **D** a diferentes temperaturas, pôde-se obter o valor **Z** através do gráfico **log D versus T**.

10.3 – Preparo dos Bioindicadores

Para este tipo de validação foram preparadas esferas a fim de conter 10^4 ou 10^5 ascosporos de *Neosartorya fischeri*, bem como, esporos de *Bacillus coagulans*, separadamente.

A técnica utilizada baseou-se num método desenvolvido por Gaze et al (1990) que utiliza alginato de sódio em solução tampão como veículo para imobilizar os esporos. O alginato MANUCOL DM (ISP Alginates Inc.), pesado em 0,16g, previamente aquecido em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^\circ\text{C}$ de precisão) à $95^\circ\text{C}/30\text{min}$ com 2,75ml de solução tampão Butterfield (0,6ml/500ml H_2O), pH 7 e mantido à 30°C foi adicionado à 4,125g de polpa de tomate 8°BRIX filtrada em

funil e gaze, igualmente estéreis, sendo a mistura agitada para adicionar 1ml da suspensão de esporos de interesse. Em seguida acrescentou-se 0,5g de carvão ativado para colorir as esferas, diferenciando-as do tomate.

Posteriormente a mistura foi distribuída em seringa estéril de 10ml com agulha de ponta cortada (24G 1/4) e o líquido então gotejado em 200ml de solução cloreto de cálcio 4% p/v estéril. No momento do contato entre a mistura e a solução de cloreto ocorreu a formação do gel sob forma de esferas variando entre 2 e 3mm de diâmetro. Terminado este procedimento, as esferas em solução ficaram em repouso por 24hrs à 12°C para que se verificasse a troca do sódio das mesmas pelo cálcio da solução, conferindo resistência à parede delas. Depois, todo o conteúdo foi lavado com água destilada estéril em funil e gaze estéreis a fim de ser estocado umidecido à 3°C.

Para determinação da concentração de esporos/esfera, tanto do fungo quanto da bactéria, manteve-se o procedimento desenvolvido por Gaze et al (1990) : dez esferas por vez, num total de 50, foram dissolvidas em 10ml de citrato de sódio 5% estéril, em um agitador durante 10 minutos. Após a dissolução total das 10 esferas pipetou-se 1ml da solução para realizar a contagem da população, por diluições decimais sucessivas e plaqueamento em profundidade, em duplicata, no meio MEA para o fungo e DTA para a bactéria. O mesmo procedimento foi aplicado para as outras 40 esferas de cada microrganismo.

10.4 – Inoculação e Recuperação dos Bioindicadores

Cem esferas estocadas foram transferidas assepticamente para o injetor de esporos, com polpa de tomate, previamente esterilizado, sendo inoculadas junto com 10 litros

do produto desaerado processado na unidade asséptica. Após 10min de processo, o coletor de esporos continha de 80 a 90% das esferas inoculadas.

As esferas de esporos, uma vez processadas na unidade asséptica, foram assepticamente retiradas do coletor de esporos e, em capela de fluxo laminar, 10 esferas por vez, num total de 50, foram dissolvidas em 10ml de citrato de sódio 5% p/v estéril, em um agitador durante 10 minutos. Após a dissolução das mesmas, procedeu-se a determinação da concentração de esporos sobreviventes por esfera, como descrito no item 10.3.

O valor integrado de esterilização F_p da partícula foi calculado pela fórmula de Brown et al (1984), e o processo validado quando $F_s = F_p$, sendo que, a comparação do valor de esterilização F_s com o valor de F_s e de F_0 calculado “on line” foi feita utilizando o software *Microthermics*.

11 – Operação da Unidade Asséptica Microthermics UHT-HTST Lab 25-DH

11.1 – O Fluxograma da Unidade Asséptica

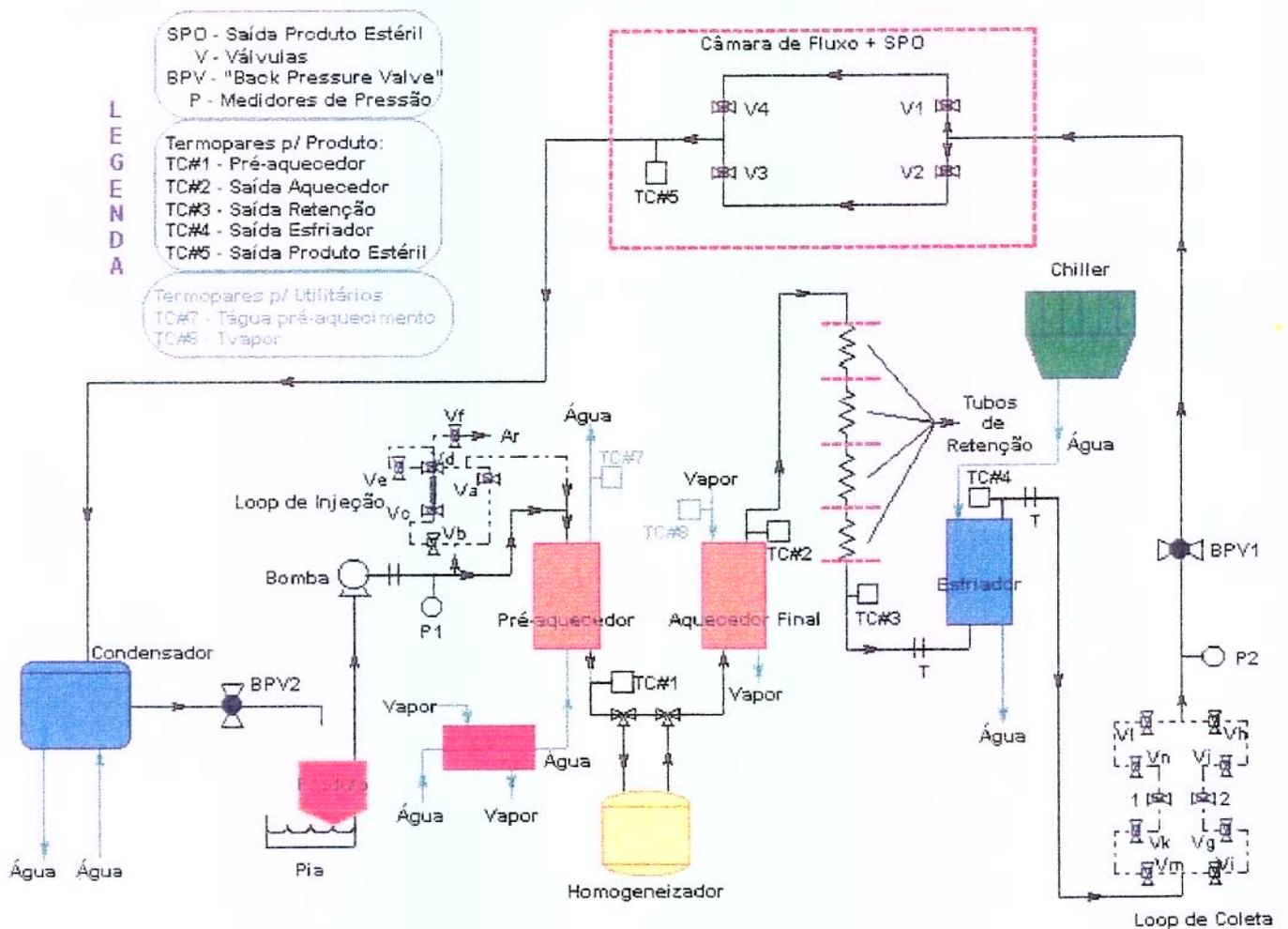


Figura 2 – O fluxograma da unidade asséptica (Fonte: Microthermics, 1999)

11.2 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV com 3 Tubos de Retenção

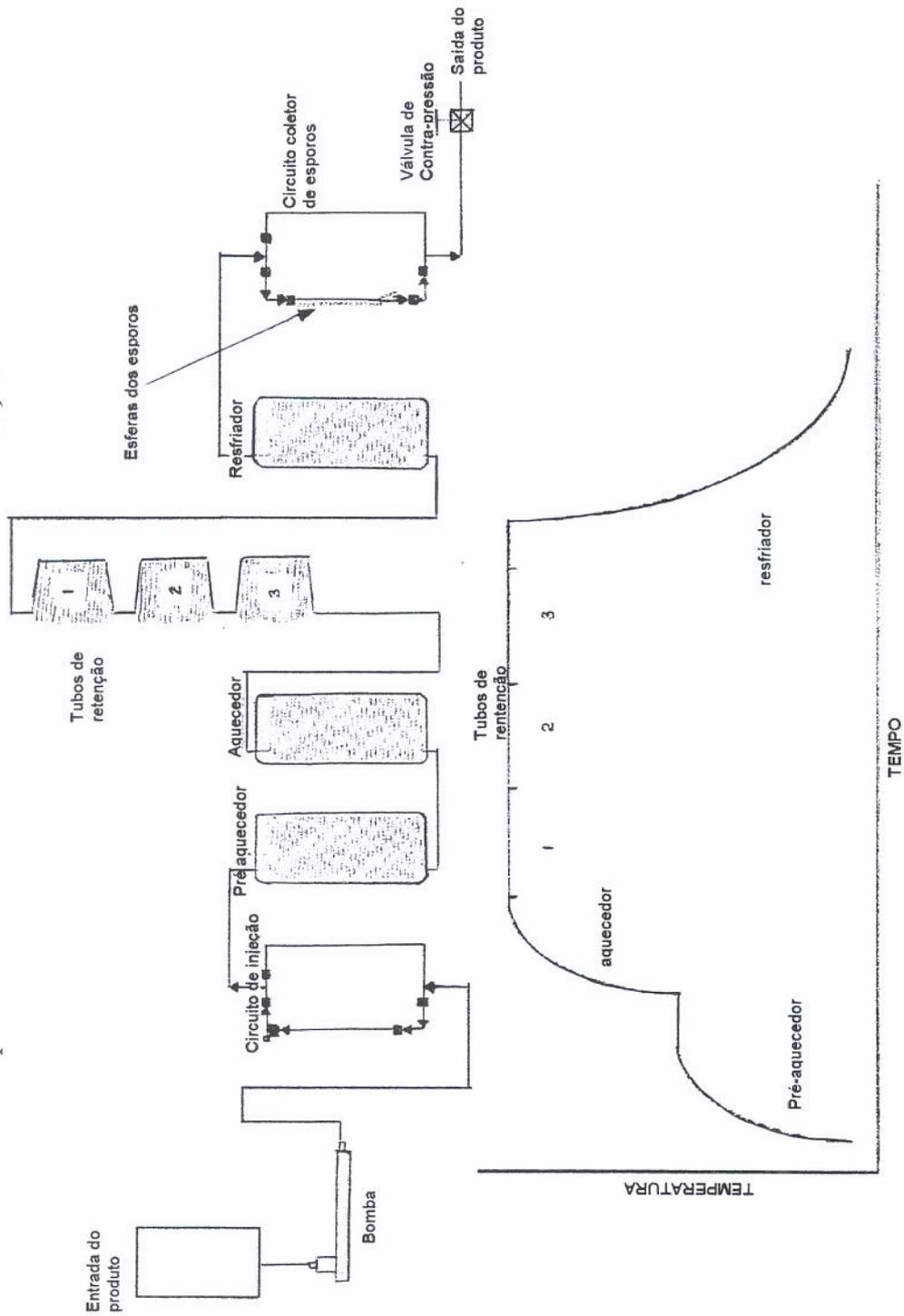


Figura 3 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV com 3 Tubos de Retenção (Fonte: Microthermics, 1999)

11.3 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV Somente com Aquecedores e Resfriadores

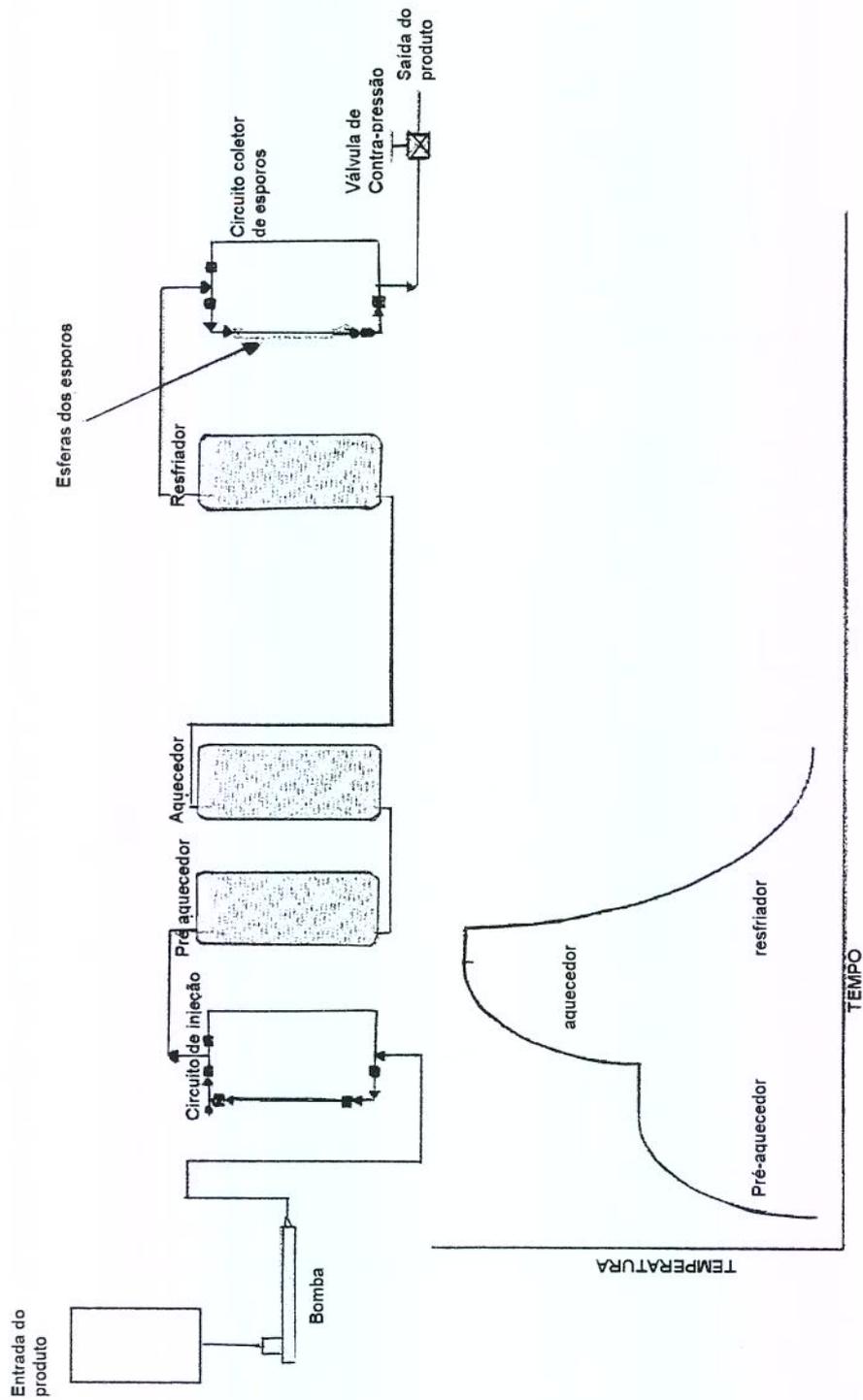


Figura 4 – O Sistema Completo UHT/HTSTLab-25 HV Somente com Aquecedores e Resfriadores (Fonte: Microthermics, 1999)

11.4 – A Esterilização da Unidade Asséptica

Antes do processo ser aplicado à polpa de tomate 8°BRIX, a unidade estava totalmente estéril, para que não houvesse acúmulo de carga microbiana, fato que poderia gerar um processo insuficiente para obtenção de um produto livre de contaminantes.

O procedimento envolveu a esterilização à 121°C por 15min no ponto mais externo da unidade, que compreende a área de enchimento asséptico. A vazão da água de alimentação foi de 2 l/min segundo o Manual Microthermics (1999). Para tanto procedeu-se da seguinte maneira :

1. Verificar a configuração do sistema para os tubos de retenção;
2. Ligar a chave de força principal;
3. Verificar o funcionamento dos termopares:

Canal 1 - Temperatura do pré-aquecedor (TC#1)

Canal 2 - Temperatura do aquecedor (TC#2)

Canal 3 - Temperatura de saída do tubo de retenção (TC#3)

Canal 4 - Temperatura de saída do resfriador (TC#4)

Canal 5 - Temperatura de saída do produto estéril (TC#5)

Canal 7 - Temperatura de água de pré-aquecedor (TC#7)

Canal 8 - Temperatura do vapor no aquecedor (TC#8)

Canal 17 - Pressão na saída da bomba

Canal 18 - Pressão na saída do resfriador

Canal 20 - Velocidade da bomba de produto

4. Abrir a linha de água potável;
5. Abrir a entrada de água de resfriamento 1 e seu retorno;

6. Conectar as mangueiras de alimentação no recipiente com água;
7. Abrir as válvulas de alimentação da água de alimentação;
8. Abrir totalmente a válvula principal de contrapressão do produto BPV1;
9. Abrir totalmente a válvula secundária de contrapressão do produto BPV2;
- 10. Abrir qualquer válvula que estiver obstruindo o caminho do fluxo de água;**
11. Ligar a bomba de produto;
12. Elevar a taxa de fluxo da água para 3 l/min e esperar pelo menos 3 min para eliminar o ar da linha;
13. Diminuir a taxa de fluxo da água para 2 l/min (taxa programada para esterilização);
14. Ajustar a válvula de contrapressão secundária para 5,0 psi;
15. Abrir a linha de resfriamento 2 e seu retorno e abrir totalmente a válvula de controle do fluxo do condensador;
16. Colocar as válvulas amarelas de enchimento e circulação da água do pré-aquecedor na posição enchimento ("filling") e ligar a bomba de circulação;
17. Abrir completamente por 1 min e depois fechar até o nível desejado a válvula de controle de fluxo de água quente que permite que o enchimento do pré-aquecedor;
18. Mudar a posição das válvulas amarelas de enchimento e circulação para a posição circulando ("running");
19. Fechar totalmente a válvula de controle do fluxo de água fria;
20. Assegurar-se de que a saída de condensado do sistema esteja aberta;
21. Drenar a linha de suprimento de vapor para eliminar o condensado;
22. Abrir a linha de suprimento de vapor ; permitindo que o mesmo entre no sistema;
23. Ajustar o pré-aquecedor até 75-80°C e controlar temperatura desejada com a válvula de água quente;
24. Ajustar o aquecedor final; permitindo que o aquecimento seja suficiente para que o ponto frio do sistema atinja 121°C; observar que a válvula de entrada de vapor

deve ficar aberta 45° para permitir que o vapor alimente o pré-aquecedor e o aquecedor;

25. Quando o termopar #5 atingir a temperatura de esterilização (121°C) manter o sistema operando por 15 minutos;

26. Após 15 min de esterilização contínua alterar a direção do fluxo nos loops de injeção e coleta e no sistema de enchimento asséptico para esterilizar estes pontos; operar o sistema por mais 15 min;

26. Após a esterilização completa abrir a válvula de controle do fluxo de água fria;

27. Após 1 min ligar o resfriador para estabelecer o fluxo de água de resfriamento;

28. Fechar a válvula de controle do fluxo do condensador;

29. Assumir o controle da contrapressão com a válvula principal e liberar a pressão da válvula secundária.

Após a esterilização foi necessário sanitizar a linha de entrada com solução de hipoclorito de sódio 150ppm pois o sistema possui uma linha de alimentação anterior ao pré-aquecedor e esta região não participou do processo de esterilização. Assim segue o procedimento desta sanitização:

1. Abrir completamente a válvula de contrapressão principal;

2. Diminuir a taxa de fluxo do produto para 0,6 l/min;

3. Colocar a mangueira de alimentação na solução de hipoclorito de sódio e circular esta solução pelo sistema por 5 minutos. Repetir a operação para o outro lado do sistema.

Após este procedimento a unidade encontrou-se apta para processar a polpa de tomate. Para tanto as condições de operação foram adequadas ao tratamento térmico de interesse.

11.5 – O Processamento com Inoculação Direta de Esporos

1. Pipetar o inóculo, no volume necessário para obter 20% de contaminação, na polpa de tomate 8°BRIX previamente desaerada;
2. Mudar a vazão para 1,0 l/min conforme equivalência do processo;
3. Inserir as mangueiras de alimentação no recipiente contendo o produto;
4. Ajustar as temperaturas de processo com as válvulas de vapor;
5. Programar o intervalo de enchimento dos envases do lado esquerdo do circuito de enchimento; (Ver Apêndice)
6. Ligar o circulador de ar da câmara de fluxo laminar;
7. Abrir o circuito de enchimento do lado esquerdo para envasar o produto em 100 garrafas estéreis;
8. Uma vez estabilizado o sistema coletar os dados de temperatura dos termopares para produto (termopar 1 a 5) durante todo o envase asséptico;
9. Terminado o envase, fechar o circuito de enchimento e limpar a câmara de fluxo laminar;
10. Transferir as mangueiras de alimentação do produto para água a fim de exaurir a polpa do sistema para iniciar o procedimento de limpeza CIP;

11.6 – O Processamento com Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados

1. Transferir, assepticamente, 100 esferas, embebidas em polpa de tomate, para o injetor de esporos imobilizados;
2. Mudar a vazão para 1,0 l/min conforme equivalência do processo;
3. Inserir as mangueiras de alimentação no recipiente contendo o produto sem inóculo direto;
4. Ajustar as temperaturas de processo com as válvulas de vapor;

5. Inundar o sistema com o produto a ser processado alternando o fluxo do sistema;
6. Fechar as válvulas que direcionam o fluxo para o injetor de esporos e abrir o segmento alternativo;
7. Abrir as válvulas que direcionam o fluxo para o coletor de esporos e fechar o segmento alternativo;
8. Remover a conexão instalando o injetor;
9. Uma vez estabilizado o sistema abrir o injetor de esporos para que as esferas sejam processadas juntamente com o produto;
10. Durante todo o processo com as esferas circulando no sistema, coletar os dados de temperatura dos termopares para produto (termopar 1 a 5);
11. Terminado o processo (10 min), fechar o circuito que direciona o fluxo para o injetor e para o coletor e abrir o segmento alternativo;
12. Transferir as mangueiras de alimentação do produto para água a fim de exaurir a polpa do sistema para iniciar o procedimento de limpeza CIP;
13. Iniciar a remoção asséptica das esferas do coletor para análise dos sobreviventes, em capela de fluxo laminar;

11.7 – A Limpeza CIP

1. Após redirecionar o fluxo e inundar a unidade com água de alimentação, fechar a válvula de suprimento de vapor e as válvulas de regulação do vapor para os aquecedores;
2. Abrir completamente a válvula de contrapressão principal;
3. Aumentar a taxa de fluxo do produto para 2,0 l/min. Quanto mais alto o fluxo com contrapressão adequada, mais eficiente a remoção de resíduos;
4. Manter a água circulando pelo sistema por 10 minutos em cada lado do sistema;
5. Quando a temperatura atingir a ambiente, desligar o resfriador;

6. Colocar as mangueiras na solução alcalina (Mikro Chlor) circulando esta solução pelo sistema por 7 minutos. Repetir a operação para o outro lado do sistema;
7. Colocar novamente as mangueiras na água de alimentação para enxaguar o sistema por 10 min em cada lado do sistema;
8. Colocar as mangueiras na solução ácida (Elsolve 97) circulando esta solução pelo sistema por 7 minutos de cada lado do sistema;
9. Repetir o procedimento 7;
10. Colocar as mangueiras na solução de ácido peracético (P3 Oxônia) circulando esta solução pelo sistema por 10 minutos de cada lado do sistema;
11. Repetir o procedimento 7.

11.8 - Desligando o Equipamento

1. Reduzir lentamente a taxa de fluxo da bomba de produto até 0,5 l/min;
2. Desligar a bomba de circulação;
3. Reduzir a taxa de fluxo da bomba de produto até 0,25 l/min;
4. Desligar a bomba de produto;
5. Reduzir a pressão do produto;
6. Desligar a força elétrica;
7. Fechar a válvula de entrada de água no sistema.

12 – Cálculo do Valor F_s e F_0

Para calcular o valor de F_s biológico aplicou-se $F_s = \gamma \cdot D_{121^\circ C}$ (onde $\gamma = \log N - \log N_0$)

A partir de uma planilha de cálculo, denominada “spreadsheet”, fornecida pelo fabricante *Microthermics*, foi possível calcular os seguintes valores de F “on line”:

- ⇒ **F_S Integrado a 121°C “on line”** : Valor de esterilização integrado para o processo. Tempo requerido para inativar determinada população de microrganismos à temperatura de referência constante (121°C), obtido para todo o processo térmico, com base no valor **Z** do microrganismo de interesse, utilizando a velocidade média desenvolvida no sistema. **(min)**
- ⇒ **F₀ Integrado para Processo “on line”** : Valor de esterilização integrado para o processo. Tempo requerido para inativar determinada população de microrganismos à temperatura de referência constante (121°C), para todo o processo térmico, com base no valor **Z=10°C**, de *Clostridium botulinum*, utilizando a velocidade média desenvolvida no sistema. **(min)**
- ⇒ **F₀ Integrado para Retenção “on line”** : Valor de esterilização integrado para retenção. Tempo requerido para inativar determinada população de microrganismos à temperatura de referência constante (121°C), somente para a porção da retenção, com base no valor **Z=10°C**, de *Clostridium botulinum*, utilizando a velocidade máxima desenvolvida na porção da retenção para que o tratamento térmico seja efetivo para a partícula mais rápida do fluido. **(min)**

Assim, seguiu-se o procedimento abaixo, como descrito no manual da planilha :

1. **Na tabela 1** : nomear e datar a planilha, determinar o tempo de retenção utilizado, o regime de escoamento e a temperatura ambiente verificada, bem como, definir os parâmetros de inativação (T_{ref} e **Z**) para o cálculo de **F₀** e **F_S**;
2. **Na tabela 2 e 3** : conferir os termopares que estão sendo utilizados e definir se a leitura é manual ou automática;
3. **Na tabela 4** : entrar com a taxa de fluxo utilizada e com os valores mínimos de temperatura verificados em cada ponto de leitura, ao longo do processo térmico;

4. Na **tabela 5** : conferir todos os dados de entrada;
5. Na **tabela 6** : observar o resumo da planilha e os valores de F_s e de F_0 ;

13 – A Velocidade do Fluido na Unidade Asséptica

Segundo Toledo (1991), a distribuição de velocidade das partículas de um fluido, em regime laminar, ao longo de uma tubulação pode ser expressa por :

$$V_{\text{media}} = Q / A \quad (22)$$

Para a partícula mais rápida do mesmo fluido, a velocidade é dada por :

$$V_{\text{max}} = 2 (V_{\text{media}}) \quad (23)$$

Já o tempo de residência das partículas do fluido, na porção da retenção, é dado por :

$$t = L / V_{\text{max}} \quad (24)$$

onde :

V_{max} = velocidade máxima em m/s

V_{media} = velocidade média em m/s

Q = vazão em m³/s

A = área da seção circular em m² = $\pi (\phi_{\text{interno}})^2 / 4$

L = comprimento da tubulação em m

Aplicando os dados característicos da polpa de tomate e das dimensões da unidade asséptica *Microthermics* foi possível determinar V_{media} , V_{max} e o tempo de residência da partícula mais rápida do sistema, a fim de aplicar condições equivalentes àquela observadas comercialmente. Assim segue que :

<i>Dados da polpa de tomate</i>	ρ	1,03 g/ml
	n	0,5
	k	7,9 Pa.s ⁿ
<i>Dados da unidade asséptica</i>	L	11,5824 m
	ϕ_{interno}	$7,239 \times 10^{-3}$ m
	Q	1 l/min

Portanto :

$$Q = 1 \text{ l/min} = 1,67 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$$

$$A = \pi (7,239 \times 10^{-3} \text{ m})^2 / 4 = 4,11 \times 10^{-5} \text{ m}^2$$

$$V_{\text{media}} = (1,67 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}) / (4,11 \times 10^{-5} \text{ m}^2) = 0,406 \text{ m/s}$$

Para aplicar a fórmula 23, o regime de escoamento deveria ser laminar, portanto foi necessário calcular o número de Reynolds (até 2100 caracteriza regime laminar) para a polpa de tomate, que é um fluido não newtoniano. (Toledo, 1991)

$$\text{Re} = 8 \times \rho \times (V_{\text{media}})^{2-n} \times (\phi_{\text{interno}}/2)^n / [k \times (3n + 1/n)]^n \quad (25)$$

Assim, como $\text{Re} = 7,25$, caracterizou-se o regime laminar e, portanto a velocidade máxima foi definida como o dobro da média, ou seja, 0,81m/s. Sob este enfoque, o tempo de residência, para partícula mais rápida, desenhado para os processos foi de:

$$t = L / V_{\text{max}} = 11,5824 \text{ m} / 0,81 \text{ m/s} \quad \rightarrow \quad t = 14,2 \text{ seg}$$

Conhecendo o tempo de residência que deveria ser aplicado à partícula mais rápida da polpa de tomate, desenhou-se o processo sob este valor; no entanto, para que isto se verificasse fisicamente no trocador de calor, durante o tratamento térmico na unidade asséptica *Microthermics*, o tubo de retenção foi configurado em função da velocidade média, ou seja:

$$t = L / V_{\text{media}} = 11,5824 \text{ m} / 0,406\text{m/s} \rightarrow t = 28,5 \text{ seg}$$

Assim, para que a partícula mais rápida recebesse os 15 seg de tratamento térmico, para garantir que a mínima letalidade possível gerasse um processo microbiologicamente seguro, o tubo de retenção foi montado para conferir 30 seg de tempo de residência. Em função deste raciocínio, os processos equivalentes desta pesquisa foram padronizados em 30seg de retenção, para as temperaturas programadas.

Vale acrescentar que no processo a 126°C, para o fungo, foi aplicado o tempo de residência de 60seg para testar a margem de segurança utilizada em processos comerciais, subestimando o microrganismo; bem como para comparar o binômio 126°C/60seg com o processo a 126°C sem retenção, para analisar a letalidade proveniente do efeito dos aquecedores e resfriadores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – Metodologia para Produção, Coleta dos Esporos e Ativação Térmica de *Neosartorya fischeri* e de *Bacillus coagulans*

As *tabelas 2* e *3* apresentam os resultados da contagem das suspensões de *Neosartorya fischeri*, em MEA e de *Bacillus coagulans*, em DTA, respectivamente.

1.1 – Contagem da Suspensão de Ascosporos de *Neosartorya fischeri*

Tabela 2 - Contagem da população média da suspensão de ascosporos de N.fischeri

DILUIÇÃO	PLACA 1	PLACA 2
10^{-1}	TNTC	TNTC
10^{-2}	TNTC	TNTC
10^{-3}	TNTC	TNTC
10^{-4}	TNTC	TNTC
10^{-5}	76	62
10^{-6}	10	9
10^{-7}	2	1
10^{-8}	<1	<1
10^{-9}	<1	<1

TNTC : Incontáveis

As contagens não seguem a redução decimal correta pois, ao quebrar os ascos, o número de colônias deste microrganismo é muito heterogêneo. No entanto, os resultados estão próximos da linearidade e, por isso, satisfatórios.

Assim, pela média aritmética da contagem, na maior diluição, obteve-se :

⇒ **POPULAÇÃO MÉDIA : $1,5 \times 10^7$ UFC/ml**

1.2 – Contagem da Suspensão de Esporos de *Bacillus coagulans* CCT 2467

Tabela 3 - Contagem da população média da suspensão de esporos de *B. coagulans*

DILUIÇÃO	PLACA 1	PLACA 2
10^{-1}	TNTC	TNTC
10^{-2}	TNTC	TNTC
10^{-3}	TNTC	TNTC
10^{-4}	39	75
10^{-5}	2	7
10^{-6}	<1	<1
10^{-7}	<1	<1
10^{-8}	<1	<1
10^{-9}	<1	<1

TNTC : Incontáveis

As contagens seguem a redução decimal correta pois, cada esporo deste microrganismo, gera uma colônia.

Assim, pela média aritmética da contagem, na maior diluição, obteve-se :

⇒ **POPULAÇÃO MÉDIA : $4,5 \times 10^5$ UFC/ml**

2 – Avaliação da Ação Esporicida do Mikro Chlor e do P₃ Oxônia

2.1 – Avaliação do Mikro Chlor a 150ppm

Foi testada a atividade esporicida do MikroChlor 150ppm contra ascosporos ativados de *N. fischeri*, que receberam choque térmico de ativação a 85°C/ 20min.

A concentração testada foi selecionada em função da recomendação da ECOLAB (fabricante do produto).

Tabela 4 - Caracterização da avaliação do Mikro Chlor

Composição básica	composto orgânico clorado
Concentração inicial de esporos de fungos	2×10^5 esporos/ml
Meio de cultura	caldo glicosado 2%
Neutralizador	0,7ml tiosulfato de sódio 0,1N
Tempo de contato	7 min
Concentração final de esporos de fungos	$1,05 \times 10^4$ esporos/ml

⇒ A ação de Mikrochlor foi de 1,28 reduções decimais, a partir da contaminação inicial. Se, eventualmente, a concentração de bolores na linha for maior ou igual a 10^2 UFC, este produto não elimina a respectiva população. Portanto, para limpeza CIP da unidade asséptica *Microthermics*, ficou evidente a necessidade de se utilizar um agente esporicida mais forte. O agente selecionado foi o P₃ Oxônia, cuja avaliação segue abaixo.

2.2 – Avaliação do P₃ Oxônia

Foi testada a atividade esporicida do P₃ Oxônia contra ascosporos de *N. fischeri*.

Tabela 5 - Caracterização da avaliação do P₃ Oxônia

Composição básica	ácido peracético (>13,5%)	
	peróxido de hidrogênio (>15,7%)	
Concentração inicial de esporos de fungos	2×10^5 esporos/ml	
Meio de cultura	caldo glicosado 2%	
Concentração testada	0,25% (peracético)	0,3% (p/v)
Tempo de contato	10 min	10min
Concentração final de esporos de fungos	<1 esporo/ml	<1 esporo/ml

⇒ A ação do P₃ Oxônia foi superior a 5 reduções decimais a partir da contaminação inicial. O sanitizante foi considerado apto para ser utilizado à 0,3% p/v, na limpeza CIP da unidade asséptica *Microthermics*.

Também foi adotada sua aplicação na higienização da câmara de fluxo laminar, seladora e tampas, bem como, na superfície da unidade asséptica *Microthermics*.

3 – Inoculação Direta de Ascosporos Livres de *Neosartorya fischeri*

3.1 – Cálculo do Inóculo

O cálculo considerou a probabilidade de 20% de contaminação, o inóculo inicial por garrafa (60ml), bem como, os dados de Baglioni, 1998. Assim segue que :

$$\begin{aligned}
 D_{94^{\circ}\text{C}} &= 4,59\text{min} \\
 Z &= 11,6^{\circ}\text{C} \\
 N &= 0,2 \text{ (20\%)} \text{ UFC/garrafa} \\
 T_2 &= 94^{\circ}\text{C} \\
 t &= 30 \text{ seg ou } 60 \text{ seg (dependendo do processo aplicado)}
 \end{aligned}$$

Aplicando os dados acima nas equações 7 e 8, obteve-se o valor do inóculo N_0 para cada tratamento térmico testado, como pode ser visto na *tabela 6* :

Tabela 6 - Cálculo do volume de inóculo para metodologia de inoculação direta

DADOS	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	126°C 60seg
Densidade da Polpa (g/ml)	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03
Volume de Polpa para o Processo (ml)	18.446	18.446	18.446	18.446	18.446
Valor D* (min)	0,52	0,23	0,07	0,021	0,008
Inóculo Inicial (UFC/60 ml)	1,83	27,8	$2,2 \times 10^6$	5,4	5,4
Concentração da Suspensão Inicial (UFC/ml)	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
Volume de Suspensão (ml)	0,22	3,23	42,8	0,6	0,6

* calculado a partir de Baglioni, 1998

OBS: para 121°C e 126°C considerou-se a contaminação pré-processo de 9UFC/100ml, verificada em planta de produção de polpa de tomate, por Baglioni,1998; pois a concentração da população N_0 foi inviável (ordem de 10^{80}) para 20% de contaminação; fato que não foi verificado para os 3 primeiros ensaios.

3.2 – Esterilização da Unidade Asséptica Microthermics para Inoculação Direta

Tabela 7 - Condições mínimas dos processos de esterilização da unidade asséptica para metodologia de inoculação direta

T MÍNIMAS (°C)	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	126°C 30seg
T	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5
Alimentação					
T	64,8	71,3	69,4	71,0	69,8
Pré Aquecedor					
T	129,8	130,5	130,1	129,1	130,2
Aquecedor					
T	128,6	129,2	128,9	127,3	128,7
Tubo Retenção					
T	125,1	125,3	125,3	124,0	125,1
Resfriador					
T	121,1	121,3	121,2	121,0	121,3
SPO					

A história térmica mínima de esterilização da linha da unidade asséptica antes de cada processo de esterilização da polpa de tomate, segundo metodologia de inoculação direta de ascosporos de *N. fischeri* demonstra que a perda de carga ao longo do fluxo gera a necessidade de programar o equipamento, no aquecedor, à 130°C , para que no ponto mais frio do sistema (SPO), seja verificada a temperatura recomendada de 121°C. É importante observar que, como não há entrada de água de resfriamento no sistema, durante a esterilização, o ponto de leitura das temperaturas do resfriador permanece na faixa de 125°C.

As condições demonstradas são as mínimas e não as médias, para que o processo seja desenhado de forma que a mínima condição necessária para um processo microbiologicamente seguro, seja verificada. Consideração válida, também, para todos os processos de inoculação indireta com *N. fischeri* e com *B. coagulans*.

3.3 – Os Processos de Inoculação Direta de Ascosporos Livres de *N. fischeri*

⇒ Condições :

Tabela 8 - Condições de processamento da polpa de tomate para inoculação direta

Média do fluxo	1 l/min
Esporos	<i>N. fischeri</i> ($D_{94^{\circ}\text{C}} = 4,59\text{min}$ e $Z = 11,6^{\circ}\text{C}$)
Produto	Polpa de tomate 8°BRIX e pH4,3
Desaeração	8min à T ambiente
Tubo de Retenção	Comprimento : 11,6m ; Diâmetro interno : 7,29mm

⇒ Resultado dos Processos de Inoculação Direta de *Neosartorya fischeri* :

Tabela 9 - Resultado dos processos de inoculação direta de *N. fischeri*

CONDIÇÃO DA EMBALAGEM	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	126°C 60seg
Garrafas Inoculadas¹	98*	100	100	100	100
Garrafas Estéreis após o Processo	96	100	100	100	100
Porcentagem de Contaminação de Garrafas	2,04	-	-	-	-
Garrafas Contaminadas por Fungo²	2	-	-	-	-
Garrafas Contaminadas por Bactéria	-	-	-	-	-
F_s Integrado a 121°C Biológico (min)	0,042	0,053	0,179	0,058	0,058
F_s Integrado a 121°C “on line”³ (min)	0,02	0,06	0,18	0,58	3,09
F₀ Integrado p/ Processo “on line”³ (min)	0,03	0,08	0,27	1,04	5,11
F₀ Integrado p/ Retenção “on line”⁴ (min)	0,01	0,02	0,08	0,30	1,85

* duas garrafas quebraram durante a manipulação na estufa de incubação.

1 - Incubação a 30°C / 30 dias

2 - *Neosartorya fischeri*

3 - à velocidade média de 0,406 m/s

4 - à velocidade máxima de 0,812 m/s

No tratamento a 105°C/30seg, apenas 2 garrafas apresentaram crescimento do fungo de interesse, contrariando as 20 garrafas esperadas. Isto ocorreu devido à letalidade acumulada pelo efeito dos aquecedores, que reduziu a carga microbiana inicial ao longo do tratamento térmico e, provavelmente, pelo inóculo não estar distribuído uniformemente por toda a amostra. Vale acrescentar que no intervalo de enchimento entre duas garrafas, pequena porção do volume de polpa processada é desviada para o segmento alternativo de fluxo, sendo descartada na pia da unidade asséptica, para que o operador tenha tempo de retirar a garrafa envasada com o produto processado e colocar uma outra vazia. Sob as mesmas justificativas, explica-se porque o valor de F_s biológico foi o dobro do “on line”. Caso a porcentagem de contaminação desejada tivesse sido verificada os valores se aproximariam, confirmando a equivalência dos cálculos; fato que foi verificado nos tratamentos a 109°C e 115°C.

É importante frisar que tratamentos térmicos acima de 109°C/30seg apresentaram-se eficientes na eliminação da carga de esporos de bolores termorresistentes.

O valor F_s biológico apresentou valores menores a 121°C e 126°C, quando comparado com F_s “on line”, pois a concentração viável de inóculo utilizada foi a verificada comercialmente em planta de processo, ou seja, 9UFC/100ml de amostra, que representou um nível de contaminação final maior do que 10^{-25} UFC/ml para os processos citados. Desta maneira, o número de reduções decimais necessárias para obtenção de esterilidade comercial foi menor. Assim, fica comprovado que a contaminação usual de fábrica pode ser vencida com relativa facilidade. A limitação experimental deve-se, principalmente, ao fato de não ser possível preparar suspensão de esporos com as altíssimas concentrações requeridas para realização destes ensaios, nos níveis de contaminação desejados para validação biológica da polpa de tomate processada em unidade asséptica *Microthermics*.

⇒ Mínimas Temperaturas Verificadas Durante os Processos Térmicos :

A *tabela 10* apresenta as mínimas temperaturas verificadas durante cada processo térmico aplicado para metodologia de inoculação direta de ascosporos de *N. fischeri*.

Tabela 10 – Mínimas temperaturas verificadas durante processos de inoculação direta de N. fischeri em polpa de tomate

T MÍNIMAS (°C)	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	126°C 60seg
T Alimentação	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5
T Pré Aquecedor	72,8	76,4	62,2	70,2	71,6
T Aquecedor	106,8	112,1	116,7	122,4	127,5
T Tubo Retenção	104,2	109,0	115,1	121,1	125,9
T Resfriador	23,7	23,1	23,1	19,7	24,0
T SPO	24,5	23,5	23,6	22,9	24,7

No tratamento térmico programado a 105°C/30seg, a temperatura mínima observada no tubo de retenção foi de 104,2°C, devido à perda de carga na linha de alimentação de vapor, pela caldeira. Assim sendo, o processo programado não atingiu a temperatura de retenção desejada e os resultados decorrentes devem ser considerados para o processo experimental verificado à 104,2°C/30seg. No entanto, somente uma leitura foi verificada à esta temperatura, ou seja, durante 10seg a polpa foi processada à 104,2°C. De qualquer maneira, para a validação biológica, considera-se a história térmica mínima de cada processo.

⇒ Tempo de permanência do produto em cada segmento da unidade asséptica :

A *tabela 11* apresenta os tempos de permanência calculados durante cada processo térmico aplicado para metodologia de inoculação direta de ascospores de *N. fischeri*.

Tabela 11 – Tempos de permanência calculados baseando-se na velocidade média 0.406 m/s em cada etapa do processo em unidade UHT com fluxo de 1 l/min e distância entre os pontos de medição de temperatura

Ponto da linha	Tempo de permanência (seg)	Distância entre os pontos de medição de temperatura (m)
Pré-Aquecedor	53,41	21,90
Aquecedor	33,61	13,78
Retenção de 30''	31,41	12,88
Resfriador	71,00	29,11
SPO	16,73	6,86

⇒ História Térmica Mínima dos Processos Programados :

Em cada processo programado para inoculação direta de ascospores de *N. fischeri*, observou-se o ponto de leitura de menor valor em cada termopar, a fim de que fossem construídas curvas de história térmica relativas às mínimas condições de cada tratamento . Assim, é possível determinar o processo mínimo requerido para obtenção das reduções decimais de interesse, bem como, conhecer o limite inferior de um tratamento térmico seguro e eficaz.

Seguem os gráficos relativos aos dados da *tabela 10 e 11*, onde é possível observar o aquecimento em 2 estágios, seguido de um período de retenção e de resfriamento imediato, terminando no ponto de enchimento asséptico.

É importante frisar que as leituras dos termopares foram feitas na saída dos trocadores, do tubo de retenção e dos resfriadores, em todos os processos programados, por isso a pequena variação na reta do ponto 2 (aquecedor) para o ponto 3 (tubo de retenção).

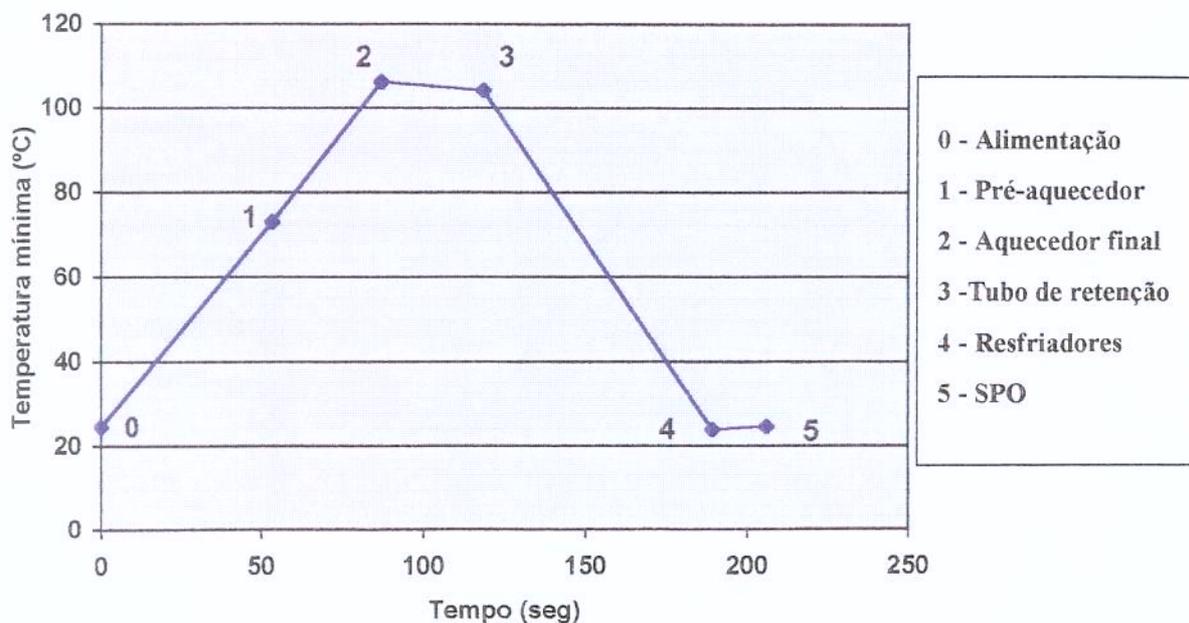
Para todos os gráficos foi assumido, à título de ilustração, uma relação linear para a temperatura, em função do tempo, entre cada ponto onde foi medida a temperatura; porém, na realidade existe uma variação de temperatura em função do tempo. Sob o enfoque desta consideração, calculou-se a faixa de variação de temperatura na porção da retenção, como pode ser observado na *tabela 12*. Desta maneira pôde-se dimensionar o grau de controle do operador sobre o sistema.

*Tabela 12 – Faixa de variação de temperatura, no tubo de retenção, verificada durante processos de inoculação direta de *N. fischeri* em polpa de tomate*

TUBO DE RETENÇÃO	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	126°C 60seg
T Mínima (°C)	104,2	109,0	115,1	121,1	125,9
T Máxima (°C)	106,3	110,4	116,3	122,1	127,1
Faixa de Variação(°C)	2,1	1,4	1,2	1,0	1,2

No menor tratamento térmico obteve-se a maior faixa de variação, ou seja, 2,1°C, que representa um valor relativamente baixo para a unidade asséptica. Em temperaturas próximas de 100°C a estabilização do equipamento é mais difícil. Conforme orientação do fabricante *Microthermics*, temperaturas de processo acima de 121°C, denotam menor faixa de variação.

a) Inoculação Direta de *N. fischeri* à 105°C por 30 segundos



b) Inoculação Direta de *N. fischeri* à 109°C por 30 segundos

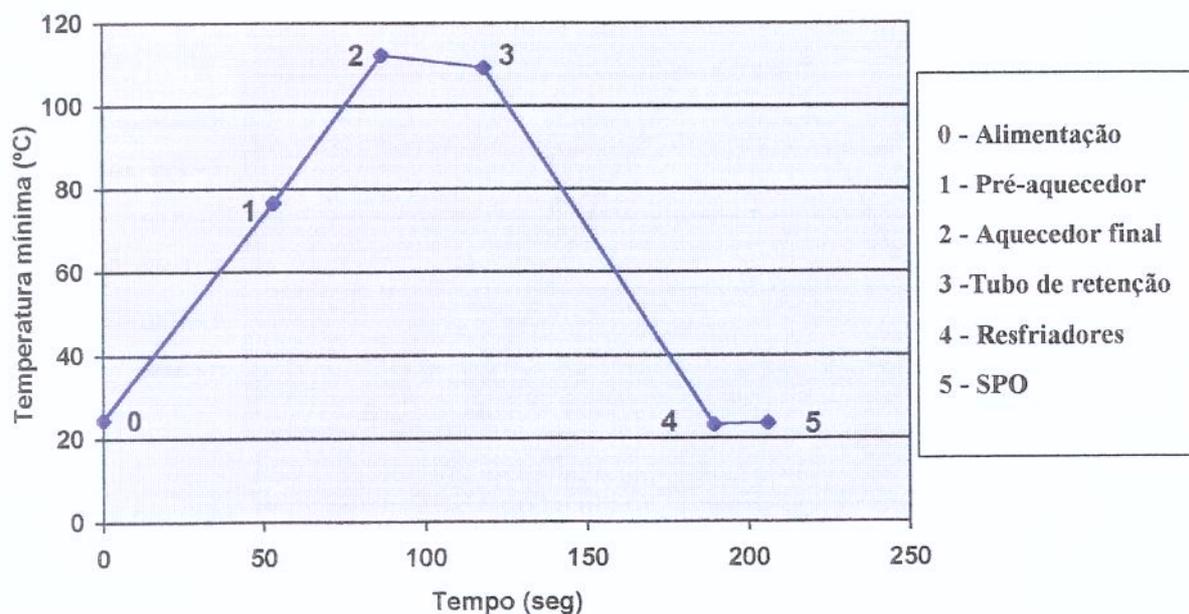
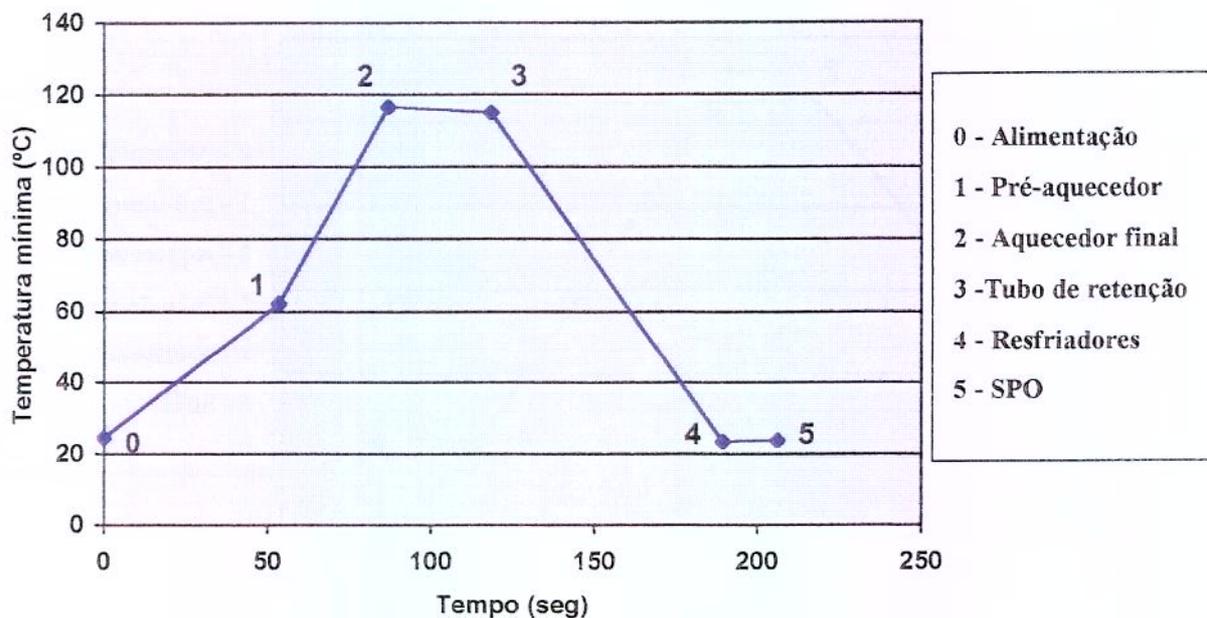


Figura 5 – História térmica mínima do processo a) 105°C/30seg e b) 109°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com suspensão de *N. fischeri*, em unidade UHT.

c) Inoculação Direta de *N. fischeri* à 115°C por 30 segundos



d) Inoculação Direta de *N. fischeri* à 121°C por 30 segundos

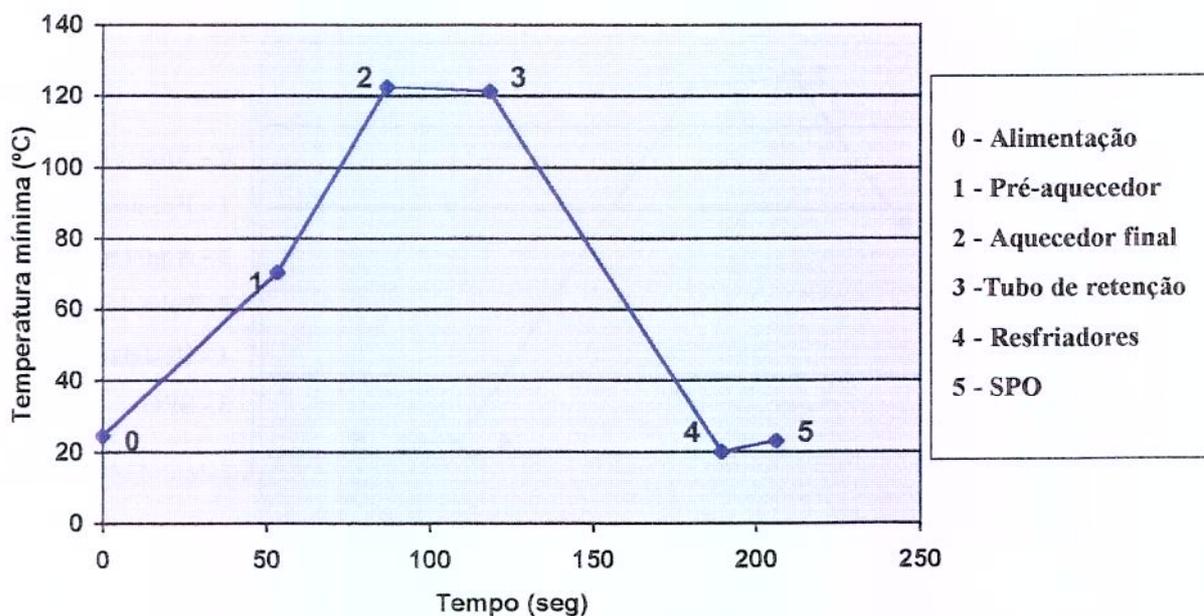


Figura 6 – História térmica mínima dos processos c) 115°C/30seg e d) 121°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com suspensão de *N. fischeri*, em unidade UHT.

e) Inoculação Direta de *N. fischeri* à 126°C por 60 segundos

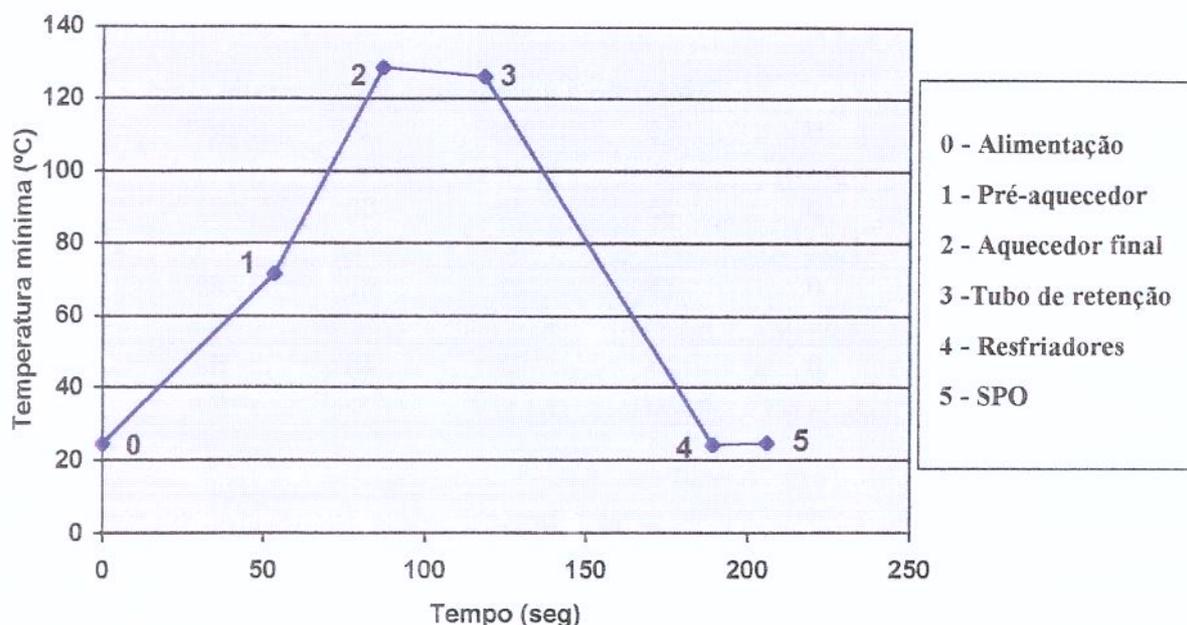


Figura 7 – História térmica mínima do processo d) 126°C/60seg para polpa de tomate, inoculada com suspensão de *N. fischeri*, em unidade UHT.

4 – Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados de *Neosartorya fischeri* e de *Bacillus coagulans* em Alginato/Tomate

4.1 – Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica para Ascósporos Imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate

Através da enumeração direta de sobreviventes, pelo método dos tubos TDT, realizou-se o ensaio de termorresistência dos esporos imobilizados do fungo em questão, mediante 4 temperaturas testadas com 5 tempos de aquecimento programados.

A *tabela 13* apresenta os resultados da contagem das colônias, após o sétimo dia de incubação, em meio de subcultura MEA, à 30°C. Assim segue que :

Tabela 13 - Resultado do ensaio de termorresistência de ascósporos imobilizados de *N. fischeri*, em alginato/tomate por enumeração direta dos sobreviventes (em UFC/ml)

Tratamento Térmico	Tempo de Aquecimento Programado (seg)					
	0	52	104	155	207	258
100°C	$1,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	<1
105°C	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^1$	<1	<1
107°C	$1,6 \times 10^6$	$8,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^1$	<1	<1
109°C	$1,6 \times 10^6$	$6,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	<1	<1

Os tempos de aquecimento programados não incluíram o atraso térmico de 2min dos tubos TDT. Os tempos programados, em segundos, foram baseados no valor **D**, à cada temperatura, dos ascósporos em suspensão, segundo Baglioni, 1998. De posse dos resultados da *tabela 13* foi possível aplicar a Linearização de Alderton e Snell, (1970) para obtenção dos valores **D** e **Z**. Assim, seguem as curvas de inativação, à cada temperatura, como pode ser visto na *figura 8* :

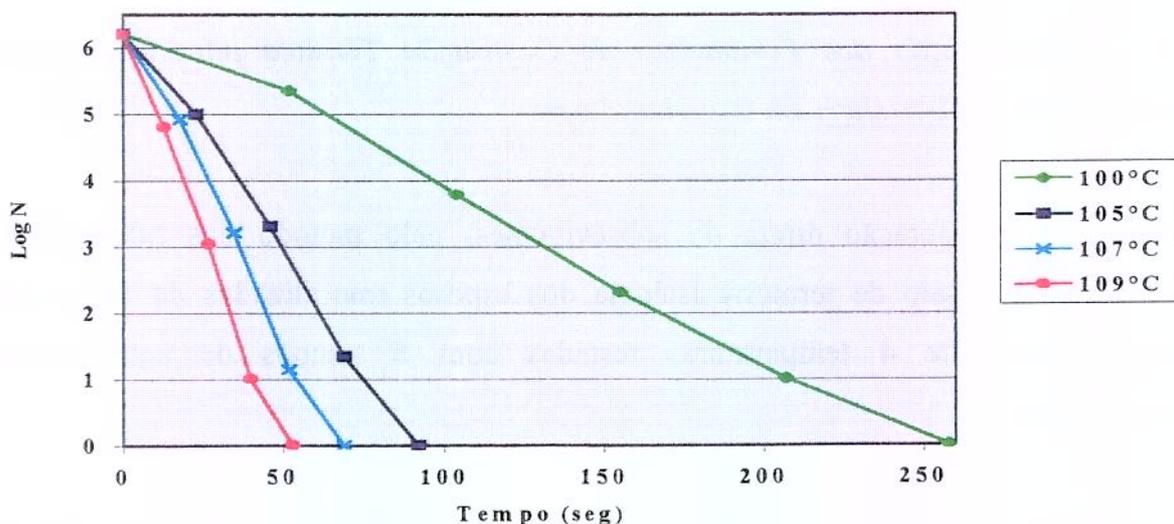


Figura 8 – Resultado do ensaio de termorresistência de ascósporos imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate

Com a curva de morte térmica à 100°C, ou seja, o menor tratamento térmico, foi possível calcular o expoente “a”, que é o inverso do coeficiente angular da curva $\log(\log N_0 - \log N)$ versus $\log t$. O valor encontrado pôde ser aplicado na linearização das demais curvas. A *figura 9* mostra a curva resultante da aplicação dos dados na determinação do valor de “a”.

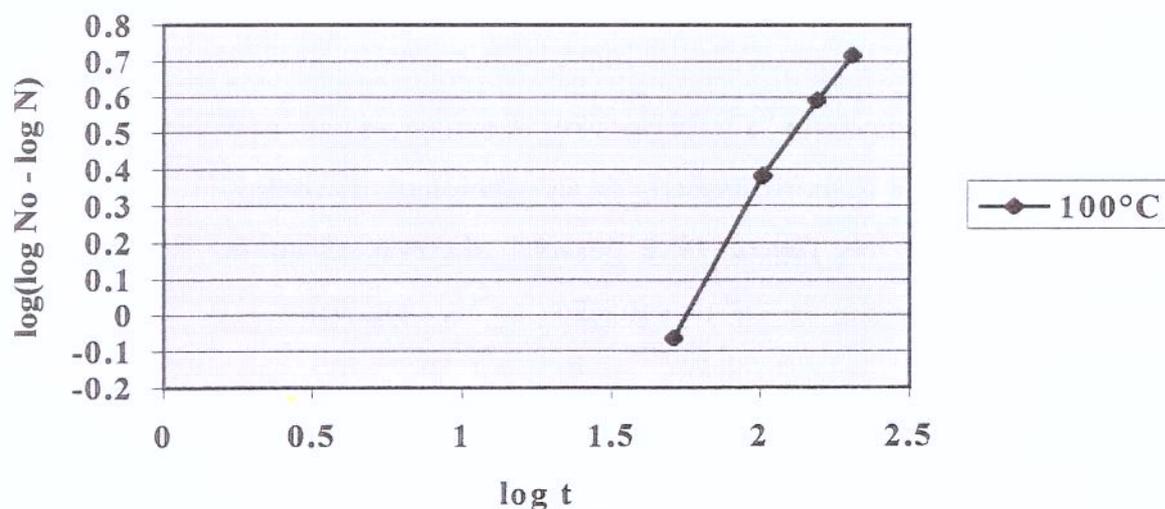


Figura 9 – Determinação do expoente “a” para o menor tratamento térmico de ascósporos imobilizados de N. fischeri em alginato/tomate

Aplicando a análise estatística de regressão de dados para *figura 9*, obteve-se o valor do coeficiente da curva pelo inverso do valor da inclinação da variável x, a fim de calcular o valor de “a”, como pode ser visto na *tabela 14* :

Tabela 14 – Análise estatística para determinação do expoente “a”

Estatística de Regressão	
R múltiplo	0,9967
R-Quadrado	0,9835
R-quadrado ajustado	0,9903
Erro padrão	0,0336

ANOVA						
	Coefficientes	Erro padrão	95% inferiores	95% superiores	inferior 95,0%	superior 95,0%
Interseção	-2,3017	0,1552	-2,9496	-1,6337	-2,9696	-1,6337
Variável X	1,3149	0,0749	0,9925	1,6374	0,9925	1,6374
Valor "a"	0,7605					

Assim, se o valor da variável X é de 1,3149 ; o valor de "a" é de 0,7605.

De posse do valor do expoente "a", foi possível linearizar as curvas de temperatura, respectivas ao ensaio de termorresistência de ascosporos imobilizados de *N. fischeri*, para obter o valor D. Na *figura 10* é possível observar as curvas linearizadas mediante aplicação do valor de "a" na equação $(\log N_0 - \log N)^a$:

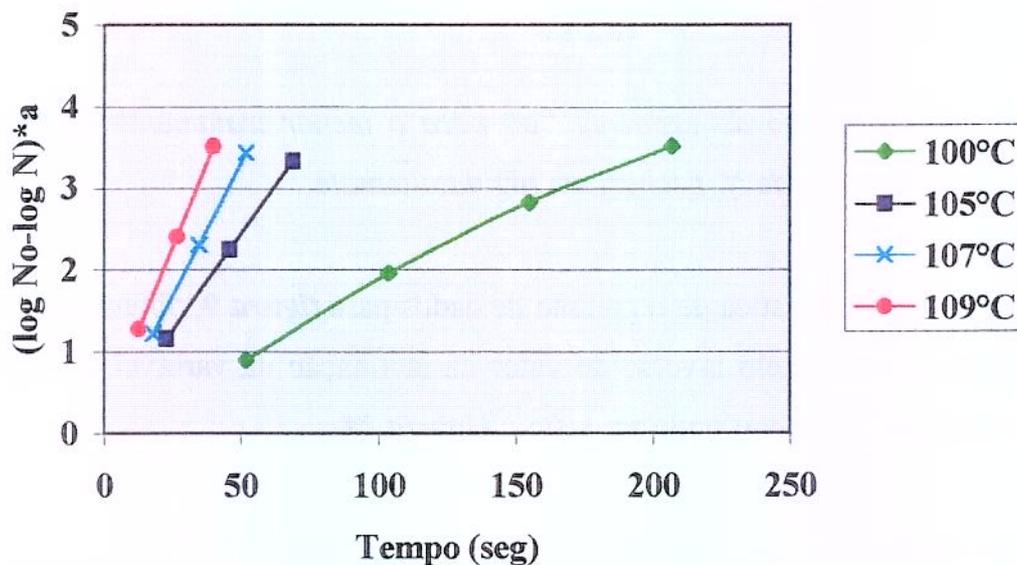


Figura 10 – Linearização das curvas de inativação térmica de ascosporos imobilizados de N. fischeri em alginato/tomate

Com as curvas linearizadas, por análise estatística de regressão dos dados, foi possível determinar o valor D à cada temperatura testada. A *tabela 15* mostra, resumidamente, os valores calculados :

Tabela 15 – Análise estatística de regressão e anova para determinação do valor D a cada temperatura testada no ensaio de termorresistência de ascospores imobilizados de N. fischeri em alginato/tomate

	Estatística de Regressão / ANOVA			
	100°C	105°C	107°C	109°C
R múltiplo	0,9953	0,9999	0,9999	0,9999
R-Quadrado	0,9907	0,9999	0,9999	0,9998
R-quadrado ajustado	0,9861	0,9999	0,9998	0,9996
Erro padrão	0,1325	0,0053	0,0134	0,0215
Interseção	0,1102	0,0716	0,0347	0,1812
Variável X (K em seg⁻¹)	0,0168	0,0472	0,0652	0,0828
D (min)	0,99	0,35	0,26	0,20

Os valores D obtidos, para ascospores imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate, foram condizentes com dados da literatura. Aragão (1989), obteve o valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ de 5,5min para esporos livres, em suco de morango (15°BRIX e pH 2,9). Já Kotzekidou, em 1997, estabeleceu a faixa de 4,4min a 6,6min para $D_{90^{\circ}\text{C}}$, em suco de tomate (16°BRIX e pH 4,2). Na presente pesquisa, o valor obtido mediante o ensaio de termorresistência foi de 6,1min à 90°C, ou seja, similar ao limite máximo obtido por Kotzekidou. Isto somente confirma que os esporos imobilizados em alginato de sódio denotam um valor D superior, ao obtido em suspensão livre, já que a malha de alginato confere proteção aos esporos quando são submetidos à tratamentos térmicos.

Com os valores D, às temperaturas testadas, pôde-se obter o valor Z através do inverso do coeficiente da curva - log K versus T. Assim, segue a *figura 11* :

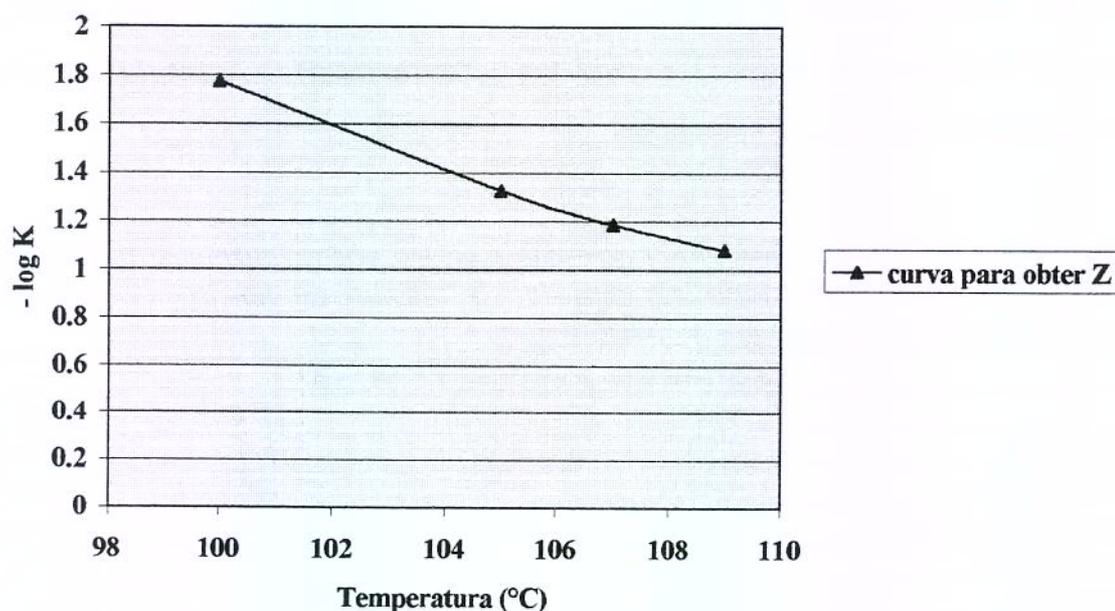


Figura 11 – Determinação do valor Z para ascospores imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate

Aplicando a análise estatística de regressão de dados para **figura 11** obtivemos o valor do coeficiente da curva mediante o valor da variável x, como pode ser visto na **tabela 16** :

Tabela 16 – Análise estatística de regressão e anova para determinação do valor Z para ascospores imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate

Estatística de Regressão						
R múltiplo						0,9942
R-Quadrado						0,9885
R-quadrado ajustado						0,9827
Erro padrão						0,0400

ANOVA						
	Coeficientes	Erro padrão	95% inferiores	95% superiores	inferior 95,0%	superior 95,0%
Interseção	9,6125	0,6310	6,8974	12,3277	6,8974	12,3277
Variável X	-0,0785	0,0059	-0,1043	-0,0527	-0,1043	-0,0527
Valor Z (°C)	12,7					

O valor Z de 12,7°C para ascósporos imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate, foi maior do que o valor Z de 11,6°C para Baglioni, 1998, com ascósporos livres em suspensão; afinal o material do bioindicador “protege” os ascósporos que necessitam de maior temperatura para ocasionar uma variação de dez vezes no valor D.

4.2 – Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica para Esporos Imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate

Aplicando a Análise Quantal de Spearman-Kärber, pelo método dos tubos TDT, realizou-se o ensaio de termorresistência de esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate, em 4 temperaturas testadas e 6 tempos de aquecimento programados.

A *tabela 17* apresenta os resultados da contagem dos tubos após o segundo dia de incubação em caldo de subcultura DTB, à 37°C. Assim segue que :

*Tabela 17 - Resultado do ensaio de termorresistência de esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate, pela análise quantal de Spearman-Kärber (tubos positivos + e tubos negativos -)*

Tratamento Térmico	Tempos de Aquecimento Programado (seg)											
	120		240		360		480		600		720	
100°C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	5	1	4	2	3	3	1	5	0	6	0	6
105°C	36		72		108		144		180		216	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	5	1	4	2	3	3	2	4	0	6	0	6
107°C	24		48		72		96		120		144	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	6	0	4	2	2	4	1	5	0	6	0	6
109°C	15		30		45		60		75		90	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	6	0	4	2	2	4	1	5	0	6	0	6

Os tempos de aquecimento programados não incluíram o atraso térmico de 2min, dos tubos TDT. Os tempos, em segundos, foram baseados no valor $D_{121^{\circ}\text{C}}$ teórico de 2 seg (Alskog, 1995) para obter a faixa da região quantal, à cada temperatura.

Aplicando os dados da *tabela 17* nas fórmulas de Spearman-Karber temos os seguintes resultados, expressos na *tabela 18* :

Tabela 18 – Determinação do valor D pelo método de Spearman – Karber para esporos imobilizados de B. coagulans, em alginato/tomate

Temperatura	U_{sk} (min)	N_0 (UFC/ml)	Valor D (min)
100°C	0,664	$4,5 \times 10^3$	1,32
105°C	1,550	$4,5 \times 10^3$	0,39
107°C	1,067	$4,5 \times 10^3$	0,27
109°C	5,167	$4,5 \times 10^3$	0,17

O valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ obtido, para esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate, foram menores que os dados da literatura, para esporos livres do mesmo microrganismo. Pirone et al (1989), encontraram o valor $D_{100^{\circ}\text{C}} = 2,88\text{min}$ para esporos livres de *B. coagulans*, em polpa de tomate pH 4,3. Já para esporos imobilizados, Gaze et al (1990), encontraram para esporos de *B. stearothermophilus* imobilizados em alginato/batata um valor de $D_{100^{\circ}\text{C}} = 3,08\text{min}$, muito maior do que o verificado para esporos de *B. coagulans* imobilizados em alginato/tomate. Tal fato justifica-se pela temperatura ótima de crescimento da cepa de *B. coagulans* ser de 37°C e não de 55°C como de costume, citando ainda sua baixa resistência térmica.

Após calcular o valor **D**, a diferentes temperaturas, para esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate, estes valores foram plotados no gráfico log D versus T. O valor Z foi obtido pelo inverso negativo do coeficiente de inclinação do gráfico que pode ser visto na *figura 12*.

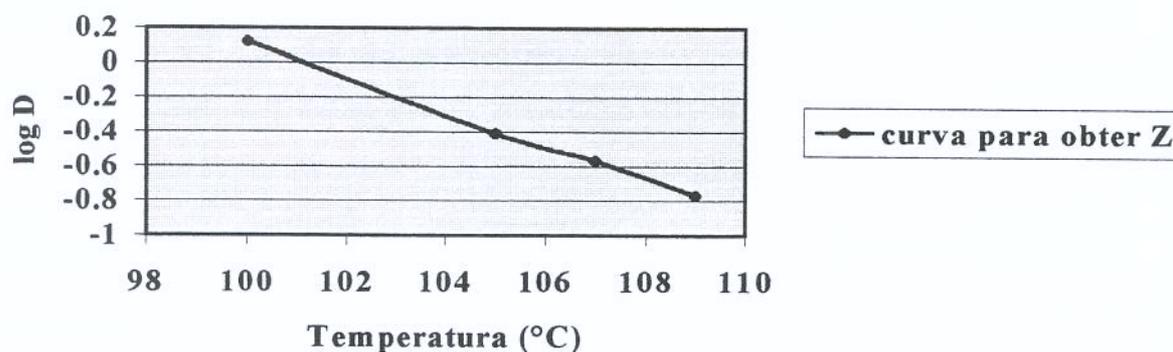


Figura 12 – Determinação do valor Z para esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate

Aplicando a análise estatística de regressão de dados para **figura 12**, foi possível obter o valor do coeficiente da curva mediante a variável x, segundo a **tabela 19** :

Tabela 19 – Análise estatística de regressão e anova para determinação do valor Z para esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate

Estatística de Regressão						
R múltiplo	0,9988					
R-Quadrado	0,9977					
R-quadrado ajustado	0,9966					
Erro padrão	0,0220					

ANOVA						
	Coeficientes	Erro padrão	95% inferiores	95% superiores	inferior 95,0%	superior 95,0%
Interseção	9,9701	0,3474	8,4751	11,4650	8,4751	11,4650
Variável X	-0,0986	0,0033	-0,1127	-0,0843	-0,1127	-0,0843
Valor Z (°C)	10,14					

O valor Z de 10,14°C encontrado para esporos de *B. coagulans* imobilizados em alginato/tomate foi maior do que o valor Z de 10°C para esporos livres em suspensão encontrado por Pirone et al (1989); sob a mesma justificativa de proteção do material do bioindicador frente aos esporos.

Após determinação dos parâmetros de destruição térmica para o fungo e a bactéria, se fez necessária a comparação dos resultados. A *tabela 20* relaciona o valor D e Z encontrado para os dois microrganismos.

*Tabela 20 – Comparação entre os parâmetros de destruição térmica para esporos de *N. fischeri* e de *B. coagulans* imobilizados em alginato/tomate*

PARÂMETRO	<i>Neosartorya fischeri</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
Valor D _{100°C} (min)	0,99	1,32
Valor D _{105°C} (min)	0,35	0,39
Valor D _{107°C} (min)	0,26	0,27
Valor D _{109°C} (min)	0,20	0,17
Valor Z (°C)	12,7	10,14

Observando os valores D_{100°C} foi possível concluir que *B. coagulans* é mais resistente que *N. fischeri*, afinal o tempo para destruição de 90% da população inicial da bactéria é maior que o tempo para destruir a mesma porção do fungo. A partir de 107°C os valores D para os dois microrganismos vão se aproximando, já que nesta porção a curva de inativação térmica do fungo apresenta uma cauda (“tail”) que pôde ser observada na *figura 8*.

Quanto ao valor de Z, observa-se que é menor para *B. coagulans* quando comparado com o valor obtido para *N. fischeri*. Isto demonstra que a bactéria possui maior dependência em relação à mudança de temperatura, para sua destruição.

Conclusivamente, é natural afirmar que esporos de *Bacillus coagulans* CCT 2467 são o alvo principal da validação do processo de esterilização para polpa de tomate em unidade UHT, quando comparado, exclusivamente, com ascospores de *Neosartorya fischeri* (3 meses de idade) isolados a partir da planta de processamento de polpa de tomate.

4.3- Padronização das Esferas de Alginato de Sódio com Suspensão de *N. fischeri*

A **tabela 21** apresenta o diâmetro e o peso médio de 20 esferas padronizadas de alginato de sódio com suspensão de ascosporos de *N. fischeri*. Em todos os processos com inoculação indireta de ascosporos imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate, as esferas apresentaram variação de ± 23 a 25% , estando na faixa recomendada por Gaze et al,1990, de 2 a 3 mm de diâmetro.

Tabela 21 – Padronização das esferas de alginato de sódio com suspensão de ascosporos de *N. fischeri*

Esfera	Diâmetro (mm)	Peso (g)
1	2,0	0,0063
2	2,0	0,0065
3	2,1	0,0070
4	2,3	0,0075
5	2,0	0,0061
6	2,5	0,0080
7	2,4	0,0078
8	2,7	0,0097
9	3,0	0,0116
10	2,9	0,0107
11	3,2	0,0134
12	2,3	0,0080
13	2,6	0,0090
14	2,5	0,0086
15	2,8	0,0094
16	3,1	0,0128
17	2,4	0,0081
18	2,9	0,0124
19	3,2	0,0138
20	2,7	0,0093
Média	2,6	0,0093

OBS : Suspensão de ascosporos de *N. fischeri* (MEA) : $1,5 \times 10^7$ esp/ml

População média das esferas de alginato de sódio com suspensão de ascosporos de *N. fischeri* (MEA) : $2,75 \times 10^4$ esp/esfera

4.4- Padronização das Esferas de Alginato de Sódio com Suspensão de *B. coagulans*

A *tabela 22* apresenta o diâmetro e o peso médio de 20 esferas padronizadas de alginato de sódio com suspensão de esporos de *B. coagulans*. Em todos os processos com inoculação indireta de esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate, as esferas apresentaram variação de $\pm 11,5$ a 12% . As esferas que apresentaram diâmetro inferior à faixa recomendada de 2 a 3 mm de diâmetro foram descartadas. Apenas esferas com diâmetro maior ou igual à 2mm foram inoculadas.

Tabela 22 – Padronização das esferas de alginato de sódio com suspensão de esporos de B. coagulans

Esfera	Diâmetro (mm)	Peso (g)
1	2,2	0,0071
2	2,4	0,0080
3	1,8	0,0061
4	1,9	0,0065
5	2,3	0,0076
6	2,4	0,0079
7	2,1	0,0067
8	2,5	0,0082
9	1,7	0,0058
10	1,9	0,0063
11	2,0	0,0064
12	2,3	0,0077
13	2,2	0,0072
14	2,4	0,0080
15	2,2	0,0069
16	1,8	0,0060
17	2,0	0,0065
18	2,1	0,0068
19	2,5	0,0083
20	2,4	0,0081
Média	2,2	0,0071

OBS : Suspensão de esporos de *B. coagulans* (DTA) $4,5 \times 10^5$ esp/ml

População média das esferas de alginato de sódio com suspensão de esporos de *B. coagulans* (DTA) $8,7 \times 10^3$ esp/esfera

Segundo Gaze et al (1990), a imobilização de esporos em esferas de alginato reduz a população inicial da suspensão livre em 2 a 3 ciclos logarítmicos. Mediante os dados das *tabelas 21 e 22* observou-se que a redução foi de, aproximadamente, 3 ciclos para o fungo e de 2 ciclos para a bactéria; ou seja, a partir de uma suspensão de ascosporos livres do fungo de 10^7 UFC/ml produziu-se esferas com 10^4 UFC/esfera e, de maneira análoga, a partir de uma suspensão de esporos livres de bactéria de 10^5 UFC/ml produziu-se esferas com 10^3 UFC/esfera. Tal fato pode ser justificado pelo pH do produto que dificulta a formação da malha de alginato necessária para aprisionar os esporos que “vazam” das esferas durante a maturação das mesmas. No entanto, após o período de maturação verificou-se que as esferas mantiveram constante o número de esporos durante até 30 dias.

4.5 – Esterilização da Unidade Asséptica Microthermics para Inoculação Indireta

Tabela 23 – Condições mínimas dos processos de esterilização da unidade asséptica para metodologia de inoculação indireta

T MÍNIMAS(°C)	ALVO	TRATAMENTO TÉRMICO						
		105°C 30 seg	109°C 30 seg	115°C 30seg	121°C 30seg	124°C 30seg	126°C 60Seg	126°C -
Alimentação	Fungo	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5
	Bactéria	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5
Pré Aquecedor	Fungo	63,5	72,6	68,9	69,9	68,8	71,8	58,8
	Bactéria	69,5	71,4	66,3	69,6	55,0	-	-
Aquecedor	Fungo	130,1	130,0	130,0	130,9	129,7	129,7	128,4
	Bactéria	130,2	130,4	130,0	130,6	128,8	-	-
Tubo Retenção	Fungo	129,0	128,5	128,8	129,4	128,8	128,1	-
	Bactéria	129,0	129,0	128,8	129,1	127,6	-	-
Resfriador	Fungo	125,2	125,1	125,0	125,5	125,2	124,6	125,6
	Bactéria	125,3	125,1	125,2	125,4	124,4	-	-
SPO	Fungo	121,0	121,0	121,0	121,6	121,4	121,0	121,2
	Bactéria	121,2	121,0	121,0	121,0	121,1	-	-

A história térmica mínima de esterilização da linha da unidade asséptica antes de cada processo de esterilização da polpa de tomate, segundo metodologia de inoculação indireta, demonstrou que a perda de carga ao longo do fluxo gerou a necessidade de programar o equipamento, no aquecedor, à 130°C, para que no ponto mais frio do sistema (SPO), fosse verificada a temperatura recomendada de 121°C. É importante observar que, como não houve entrada de água de resfriamento no sistema durante a esterilização, o ponto de leitura das temperaturas do resfriador permaneceu na faixa de 125°C, tanto para o fungo quanto para bactéria.

Para esporos imobilizados de *Bacillus coagulans* em alginato/tomate, não foram aplicados os tratamentos térmicos à 126°C/60seg, bem como, à 126°C sem tubos de retenção. O intuito disso foi a comparação dos processos à 126°C/60seg por inoculação direta e indireta para o fungo enquanto bioindicador. O último tratamento, sem retenção visou validar o processo somente considerando a letalidade acumulada pelo efeito dos aquecedores e resfriadores, afinal, com base nos resultados dos ensaios com inoculação direta foi possível observar que processos acima de 109°C/30seg seriam, teoricamente, microbiologicamente seguros.

4.6 – Os Processos de Inoculação Indireta de Ascosporos Imobilizados de *N. fischeri* em Alginato/Tomate

⇒ Condições :

Tabela 24 – Condições de processamento da polpa de tomate para inoculação indireta de ascosporos imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate

Média do fluxo	1 l/min
Esporos	<i>N. fischeri</i> ($D_{100^{\circ}\text{C}} = 0,99$ min e $Z = 12,7^{\circ}\text{C}$)
Produto	Polpa de tomate 8°BRIX e pH4,3
Desaeração	8min à T ambiente
Tubo de Retenção	Comprimento : 11,6m ; Diâmetro interno : 7,29mm

⇒ Resultado dos Processos de Inoculação Indireta de *Neosartorya fischeri* :

Tabela 25 – Resultado dos processos de inoculação indireta de ascósporos imobilizados de N. fischeri em alginato/tomate

CONDIÇÃO DAS ESFERAS	TRATAMENTO TÉRMICO						
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	124°C 30seg	126°C 60Seg	126°C -
Esferas Inoculadas	80	92	95	94	110	101	64
Esferas Recuperadas	77	71	74	48	91	88	61
% de Recuperação	96.3	77.2	77.9	51.1	82.7	87.1	95.4
Contagem de Fungos Inoculados (esporos/esfera)	2.7×10^4	2.7×10^4	2.7×10^4	2.7×10^4	2.7×10^4	2.7×10^4	2.7×10^4
Nível Total de Inoculação (esporos)	2.2×10^6	2.5×10^6	2.6×10^6	2.6×10^6	3.0×10^6	2.8×10^6	1.8×10^6
Contagem de Fungos Recuperados (esporos/esfera)	2.5×10^2	1.2×10^2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Reduções Decimais (γ)¹	2.04	2.36	> 6.42	> 6.41	> 6.48	> 6.45	> 6.24
F_s Integrado a 121°C Biológico² (min)	0,046	0,055	0,144	0,144	0,145	0,145	0,139
F_s Integrado a 121°C “on line”² (min)	0,04	0,07	0,21	0,61	1,37	3,83	-
F₀ Integrado p/ Processo “on line”² (min)	0,03	0,07	0,31	1,14	3,31	8,02	1,31
F₀ Integrado p/ Retenção ‘on line’³ (min)	0,01	0,02	0,08	0,32	0,9	2,77	-

1- $\gamma = \log N_0 - \log N$

2 - à velocidade média de 0,406 m/s

3- à velocidade máxima de 0,812 m/s

Para 105°C, o valor de F_s integrado biológico foi similar ao valor calculado “on line”. A variação de, aproximadamente, 15% foi relativa à proteção que o material do bioindicador conferiu aos ascósporos do fungo. Após 109°C, não houve mais sobreviventes e o valor de F_s biológico tornou-se impreciso, não podendo avaliar o número de reduções decimais afetivamente ocasionados pelo tratamento térmico. Assim, em processos mais severos, seria necessário trabalhar com níveis superiores

à 10^6 , para encontrar sobreviventes e determinar, adequadamente, o número de reduções decimais.

O valor de F_0 integrado para processo “on line”, à 126°C sem retenção, correspondeu ao efeito letal de subida e descida do processo no aquecimento e resfriamento, ou seja, 16,3% do valor de F_0 integrado para processo “on line”, à $126^\circ\text{C}/60\text{seg}$.

⇒ Mínimas Temperaturas Verificadas Durante os Tratamentos Térmicos Programados :

A *tabela 26* apresenta as mínimas temperaturas verificadas durante cada processo térmico aplicado para metodologia de inoculação indireta de *N. fischeri*.

Tabela 26 – Mínimas temperaturas verificadas durante processos de inoculação indireta de ascosporos imobilizados de N. fischeri em alginato/tomate

T MÍNIMAS ($^\circ\text{C}$)	TRATAMENTO TÉRMICO						
	105 $^\circ\text{C}$ 30seg	109 $^\circ\text{C}$ 30seg	115 $^\circ\text{C}$ 30seg	121 $^\circ\text{C}$ 30seg	124 $^\circ\text{C}$ 30seg	126 $^\circ\text{C}$ 30seg	126 $^\circ\text{C}$ -
T Alimentação	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5
T Pré Aquecedor	65,3	66,7	68,6	66,6	70,1	83,3	81,7
T Aquecedor	108,2	111,3	117,8	123,3	128,6	130,8	126,4
T Tubo Retenção	105,1	109,0	114,9	121,0	124,2	126,1	-
T Resfriador	18,2	18,8	19,2	23,9	20,6	21,2	23,3

⇒ Tempo de permanência do produto em cada segmento da unidade asséptica :

A *tabela 27* apresenta os tempos de permanência calculados durante cada processo térmico aplicado para metodologia de inoculação indireta de ascosporos imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate

*Tabela 27 – Tempos de permanência calculados, para inoculação de *N. fischeri*, baseando-se na velocidade média 0.406 m/s em cada etapa do processo em unidade UHT com fluxo de 1 l/min e distância entre os pontos de medição de temperatura*

Ponto da linha	Tempo de permanência (seg)	Distância entre os pontos de medição de temperatura (m)
Pré-Aquecedor	54,95	22,53
Aquecedor	33,61	13,78
Retenção de 30''	31,41	12,88
Retenção de 60''	59,66	24,46
Resfriador	71,22	29,20

⇒ História Térmica Mínima dos Processos Programados :

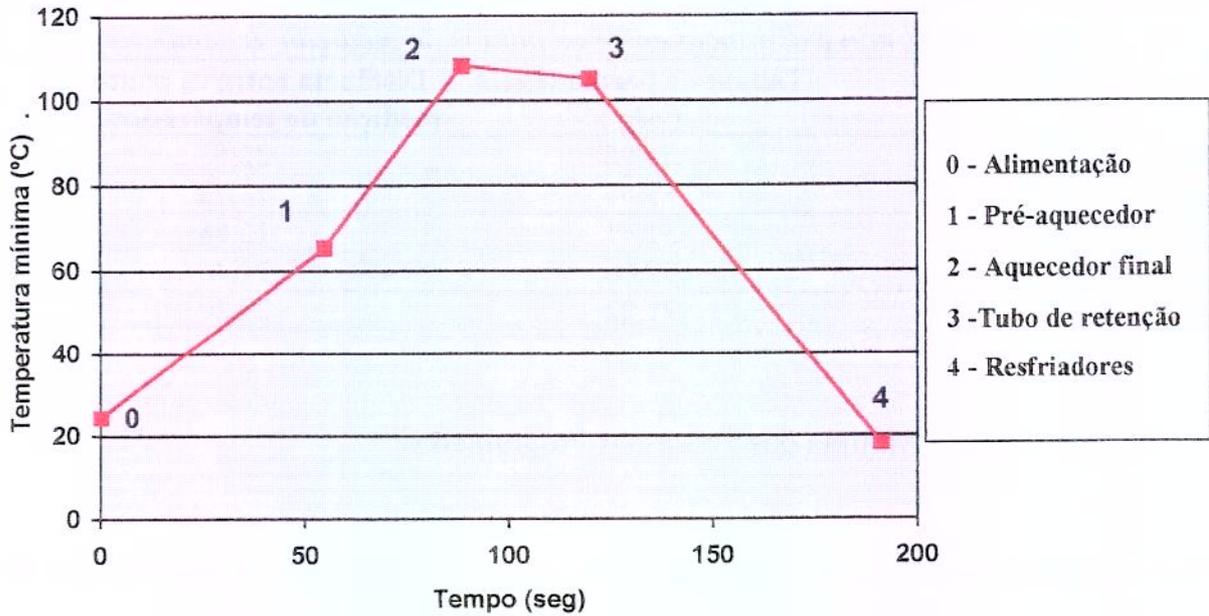
Nos processos programados para inoculação indireta de ascósporos imobilizados de *N. fischeri* em alginato/tomate, também observou-se o ponto de leitura de menor valor em cada termopar, para construir curvas de história térmica relativas às mínimas condições de cada tratamento. Assim, seguem os gráficos correspondentes aos dados da *tabelas 26 e 27*. De maneira análoga à inoculação direta, calculou-se a faixa de variação de temperatura na porção da retenção, para avaliar o grau de controle do operador sobre o sistema, como pode ser observado na *tabela 28*.

*Tabela 28 – Faixa de variação de temperatura, no tubo de retenção, verificada durante processos de inoculação indireta de *N. fischeri**

TUBO DE RETENÇÃO	TRATAMENTO TÉRMICO						
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	124°C 30seg	126°C 60seg	126°C -
T Mínima (°C)	105,1	109,0	114,9	121,0	124,2	126,1	-
T Máxima (°C)	105,9	110,3	116,4	122,1	125,1	126,8	-
Faixa de Variação (°C)	0,8	1,3	1,5	1,1	0,9	0,7	-

Para inoculação indireta, a faixa de variação geral foi menor que para a direta, pois sem enchimento asséptico a pressão do sistema ficou mais uniforme, apresentando menor influência na temperatura. De qualquer maneira, a variação foi baixa.

a) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 105°C por 30 segundos



b) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 109°C por 30 segundos

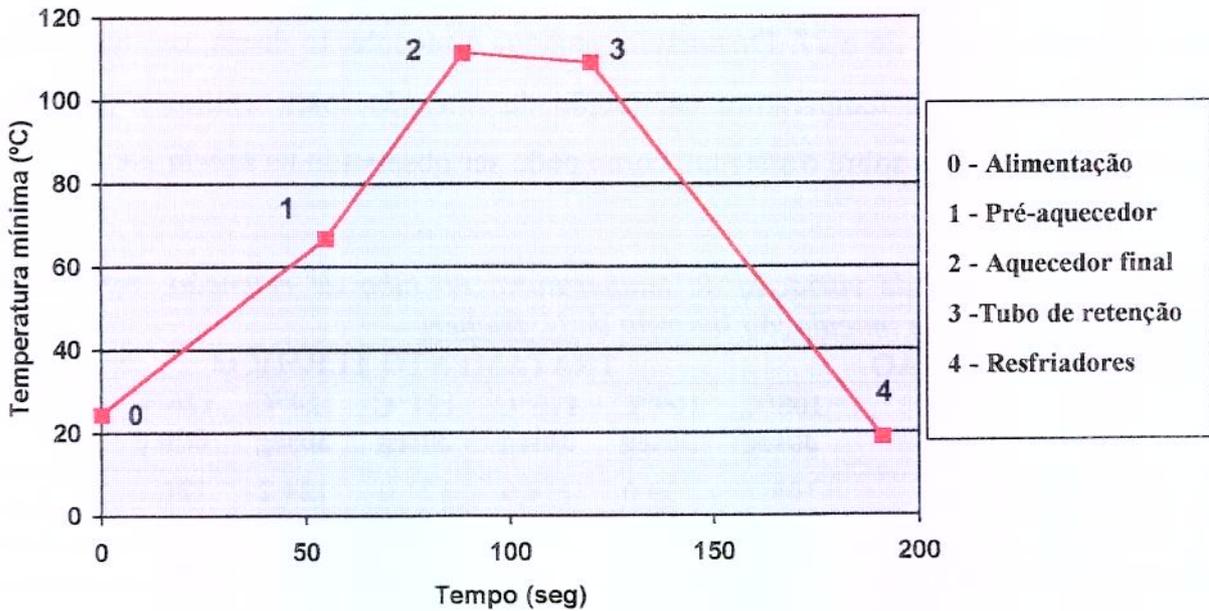
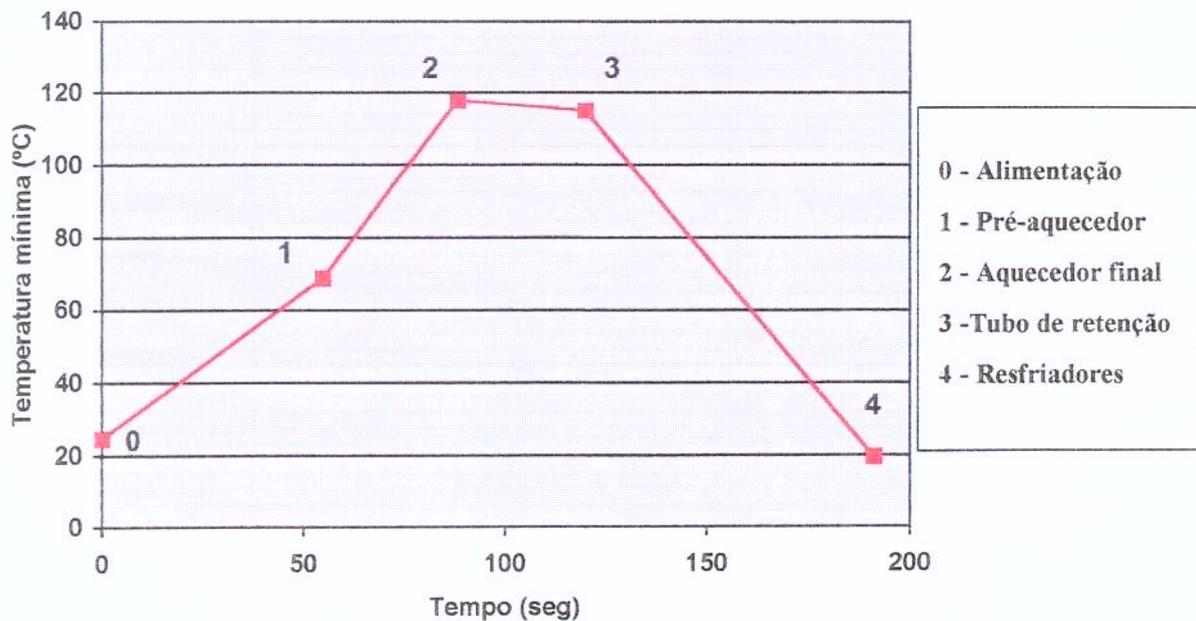


Figura 13 – História térmica mínima dos processos a) 105°C/30seg e b) 109°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com ascospores imobilizados de *N. fischeri*, em unidade UHT.

c) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 115°C por 30 segundos



d) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 121°C por 30 segundos

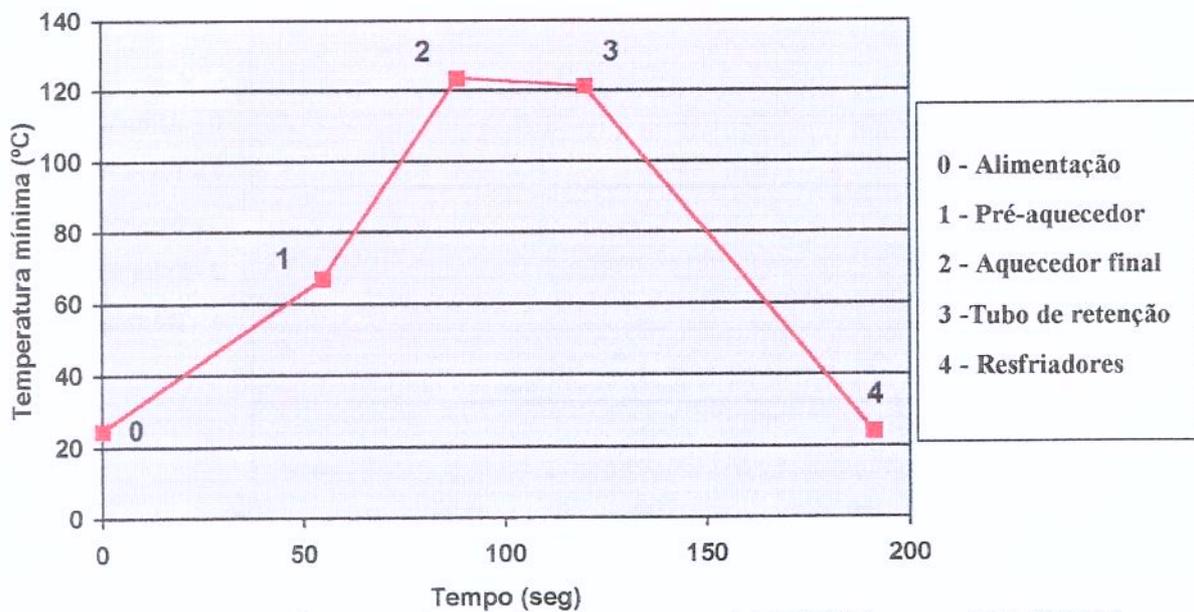
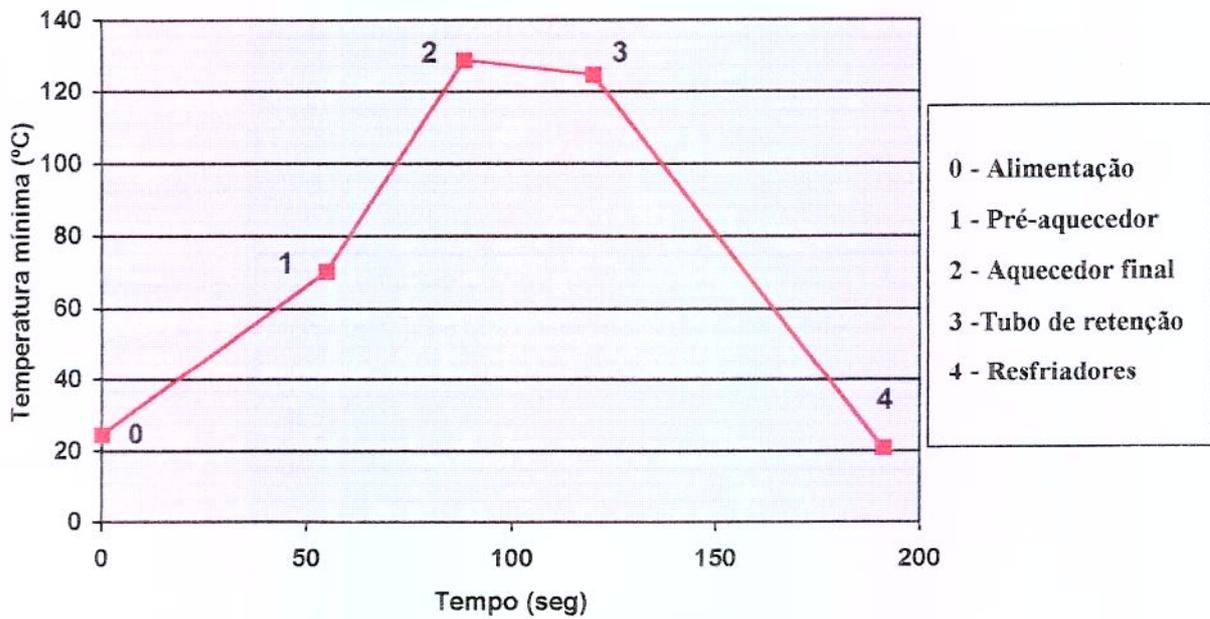


Figura 14 – História térmica mínima dos processos c) 115°C/30seg e d) 121°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com ascospóros imobilizados de *N. fischeri*, em unidade UHT.

e) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 124°C por 30 segundos



f) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 126°C por 60 segundos

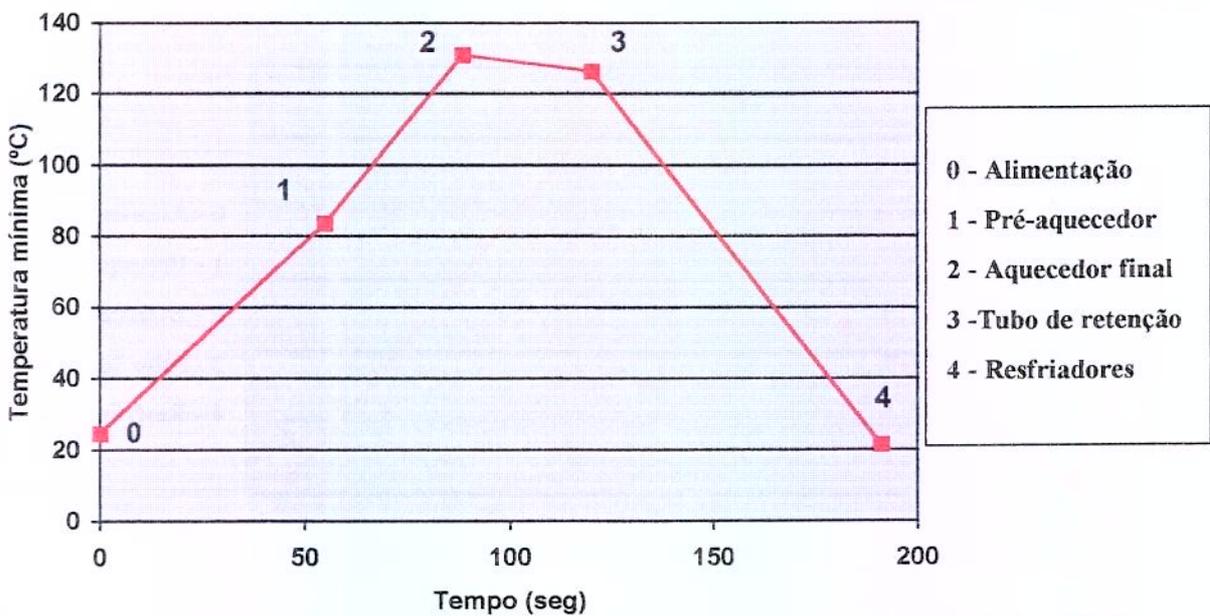


Figura 15 – História térmica mínima dos processos e) 124°C/30seg e f) 126°C/60seg para polpa de tomate, inoculada com ascósporos imobilizados de *N. fischeri*, em unidade UHT.

g) Inoculação Indireta de *N. fischeri* à 126°C sem retenção

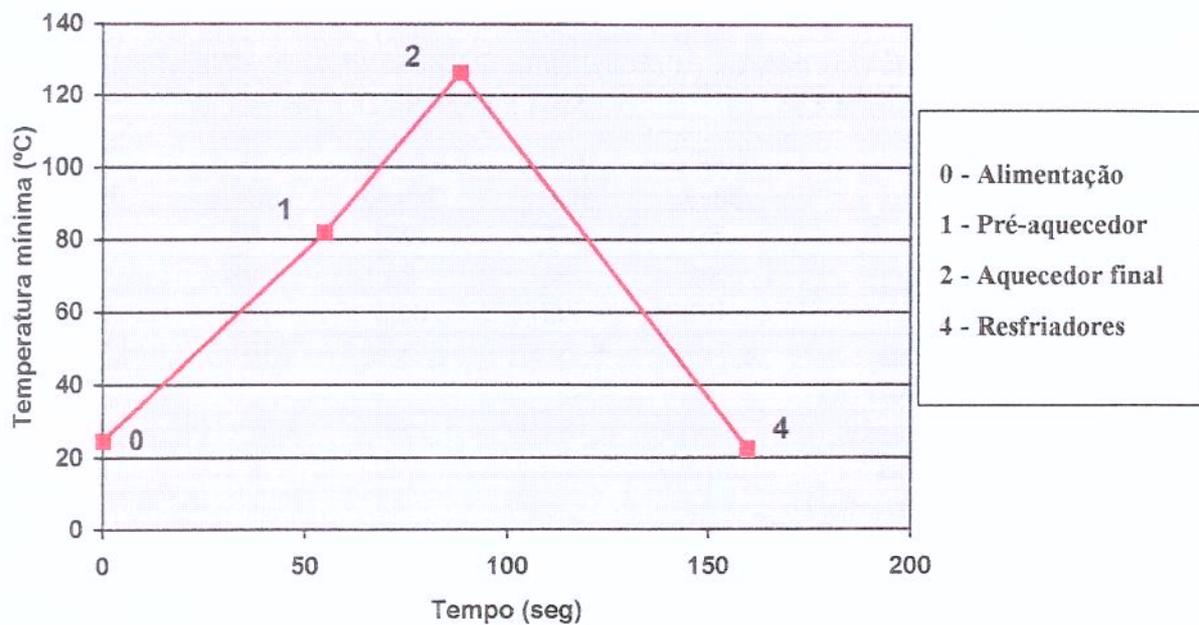


Figura 16 – História térmica mínima do processo g) 126°C sem retenção para polpa de tomate, inoculada com ascósporos imobilizados de *N. fischeri*, em unidade UHT.

4.7 – Os Processos de Inoculação Indireta de Esporos Imobilizados de *B. coagulans* em Alginato/Tomate

⇒ Condições :

Tabela 29 – Condições de processamento da polpa de tomate para inoculação indireta de *B. coagulans*

Média do fluxo	1 l/min
Esporos	<i>B. coagulans</i> ($D_{100^{\circ}\text{C}} = 1,32$ min e $Z = 10,14^{\circ}\text{C}$)
Produto	Polpa de tomate 8°BRIX e pH4,3
Desaeração	8min a T ambiente
Tubo de Retenção	Comprimento : 11,6m ; Diâmetro interno : 7,29mm

⇒ Resultado dos Processos de Inoculação Indireta de *Bacillus coagulans* :

Tabela 30 – Resultado dos processos de inoculação indireta de *B. coagulans*

CONDIÇÃO DAS ESFERAS	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	124°C 30seg
Esferas Inoculadas	84	71	96	95	85
Esferas Recuperadas	84	66	83	78	83
% de Recuperação	100	93	86,5	82,1	97,6
Contagem de Bactérias Inoculadas (esporos/esfera)	$8,7 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$
Nível Total de Inoculação	$7,31 \times 10^5$	$6,18 \times 10^5$	$8,35 \times 10^5$	$8,27 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$
Contagem de Bactérias Recuperadas (esporos/esfera)	$1,68 \times 10^2$	< 1	< 1	< 1	< 1
Reduções Decimais (γ) ¹	1,71	5,79	5,92	5,92	5,87
F _s Integrado a 121°C Biológico ² (min)	0,019	0,063	0,065	0,065	0,064
F _s a 121°C “on line” ² (min)	0,02	0,05	0,2	0,92	1,08
F ₀ Integrado p/ Processo “on line” ² (min)	0,04	0,1	0,37	1,82	1,95
F ₀ Integrado p/ Retenção “on line” ³ (min)	0,01	0,03	0,1	0,46	0,54

1 - $\gamma = \log N_0 - \log N$

2 - à velocidade média de 0,406 m/s

3 - à velocidade máxima de 0,812 m/s

Para 105°C, o valor de F_s integrado biológico foi praticamente igual ao valor F_s calculado “on line”. A variação de, aproximadamente, 5% foi relativa à aproximação dos valores. Após 109°C, não houve mais sobreviventes e o valor de F_s biológico apresentou valor muito menor, quando comparado com o “on line”, em função do nível total de inoculação estar restrito à 10³, uma concentração relativamente baixa para bioindicadores aplicados na validação de processos térmicos. Assim sendo, o valor de F_s biológico tornou-se impreciso na determinação do número efetivo de reduções decimais ocasionadas pelo tratamento térmico. Para que este problema não mais se verificasse, seria necessário trabalhar com níveis de inoculação superiores à 10⁵ a fim de encontrar sobreviventes e calcular o valor real das reduções decimais.

⇒ Mínimas Temperaturas Verificadas Durante os Tratamentos Térmicos Programados :

A *tabela 31* apresenta as mínimas temperaturas verificadas durante cada processo térmico aplicado para metodologia de inoculação indireta de esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate.

Tabela 31 – Mínimas temperaturas verificadas durante processos de inoculação indireta de B. coagulans

TEMPERATURAS MÍNIMAS (°C)	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30Seg	121°C 30seg	124°C 30seg
T Alimentação	24,5	24,5	24,5	24,5	24,5
T Pré Aquecedor	72,0	78,9	74,6	75,2	63,4
T Aquecedor	108,5	113,5	118,9	126,7	125,9
T Tubo Retenção	105,3	109,0	115,3	120,8	123,9
T Resfriador	18,7	19,2	20,9	18,6	20,5

⇒ Tempo de permanência do produto em cada segmento da unidade asséptica :

A *tabela 32* apresenta os tempos de permanência calculados durante cada processo térmico aplicado para metodologia de inoculação indireta de esporos imobilizados de *B. coagulans* em alginato/tomate.

*Tabela 32 – Tempos de permanência calculados, para inoculação de *B. coagulans*, baseando-se na velocidade média 0.406 m/s em cada etapa do processo em unidade UHT com fluxo de 1 l/min e distância entre os pontos de medição de temperatura*

Ponto da linha	Tempo de permanência (seg)	Distância entre os pontos de medição de temperatura (m)
Pré-Aquecedor	54,95	22,53
Aquecedor	33,61	13,78
Retenção de 30''	31,41	12,88
Retenção de 60''	59,66	24,46
Resfriador	71,22	29,20

⇒ História Térmica Mínima dos Processos Programados :

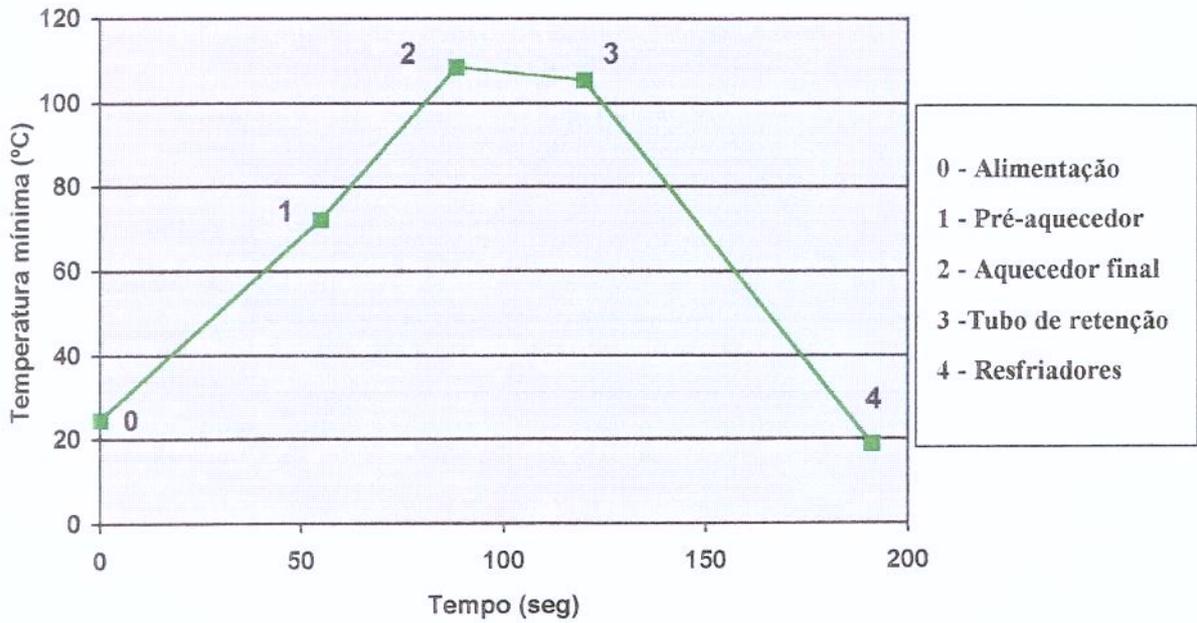
Em cada processo programado para inoculação indireta de esporos de *B. coagulans*, também observou-se o ponto de leitura de menor valor em cada termopar, para construir as curvas de história térmica relativas às mínimas condições de cada tratamento para o mesmo fim verificado nos processos anteriores. Seguem os gráficos correspondentes aos dados da *tabelas 31 e 32*, De maneira análoga à inoculação direta, calculou-se a faixa de variação de temperatura na porção da retenção, como pode ser observado na *tabela 33*, sob o mesmo enfoque dos outros processos.

*Tabela 33 – Faixa de variação de temperatura, no tubo de retenção, verificada durante processos de inoculação indireta de *B. coagulans**

TUBO DE RETENÇÃO	TRATAMENTO TÉRMICO				
	105°C 30seg	109°C 30seg	115°C 30seg	121°C 30seg	124°C 30seg
T Mínima (°C)	105,3°C	109,0°C	115,3°C	120,8°C	123,9°C
T Máxima (°C)	106,5	109,6	115,8	121,9	125,5
Faixa de Variação (°C)	1,2	0,6	0,5	1,1	1,6

Neste caso, a faixa de variação foi menor à observada na inoculação indireta de *N. fischeri* e, portanto, o controle da temperatura foi o mais efetivo dentre os processos.

a) Inoculação Indireta de *B. coagulans* à 105°C por 30 segundos



b) Inoculação Indireta de *B. coagulans* à 109°C por 30 segundos

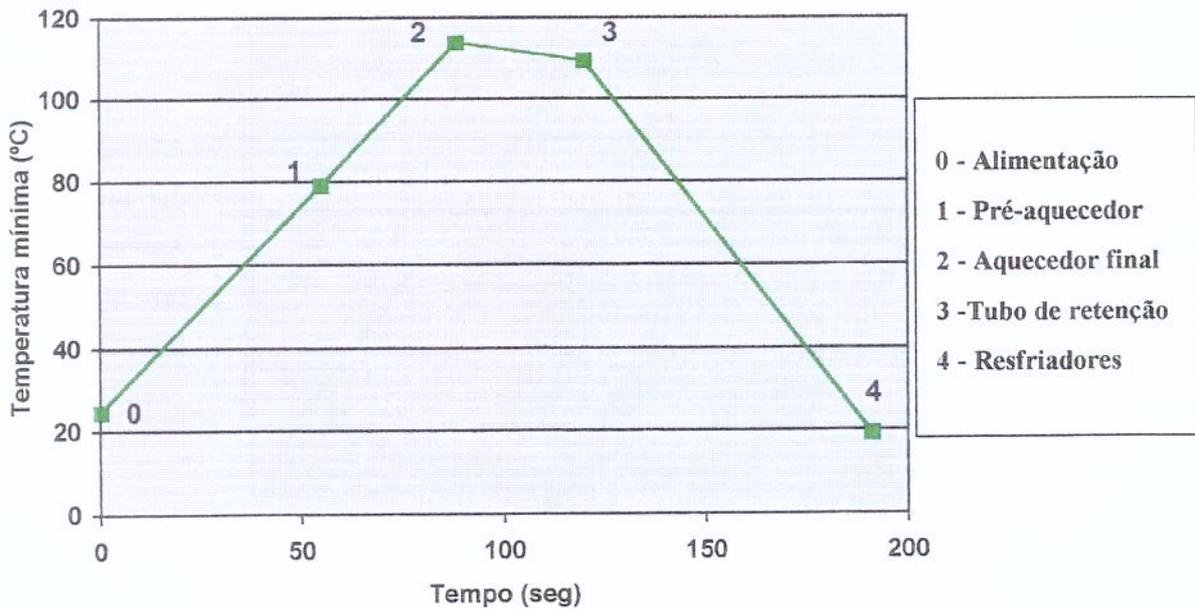
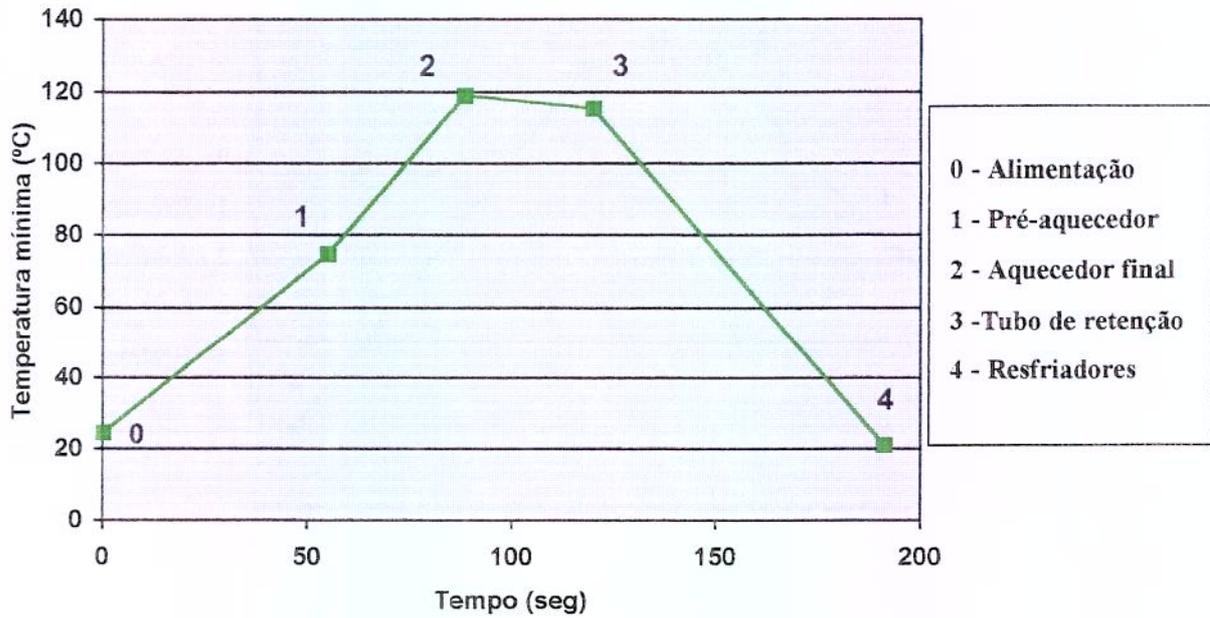
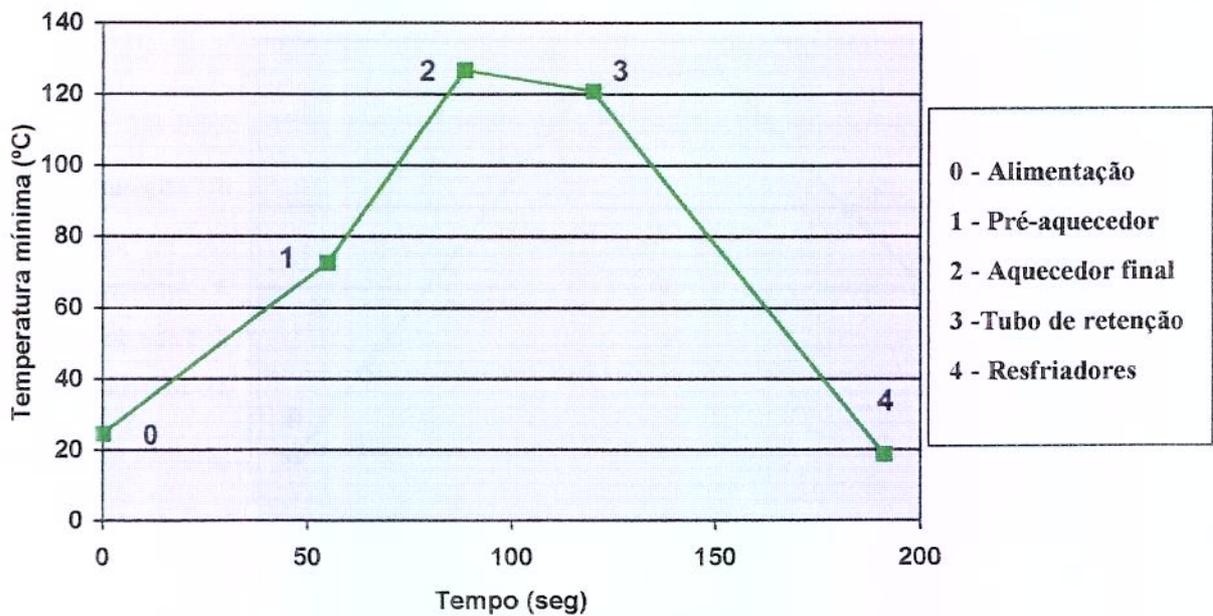


Figura 17 – História térmica mínima dos processos a) 105°C/30seg e b) 109°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com esporos imobilizados de *B. coagulans*, em unidade UHT.

c) Inoculação Indireta de *B. coagulans* à 115°C por 30 segundos



d) Inoculação Indireta de *B. coagulans* à 121°C por 30 segundos



*Figura 18 – História térmica mínima dos processos c) 115°C/30seg e d) 121°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com esporos imobilizados de *B. coagulans*, em unidade UHT.*

e) Inoculação Indireta de *B. coagulans* à 124°C por 30 segundos

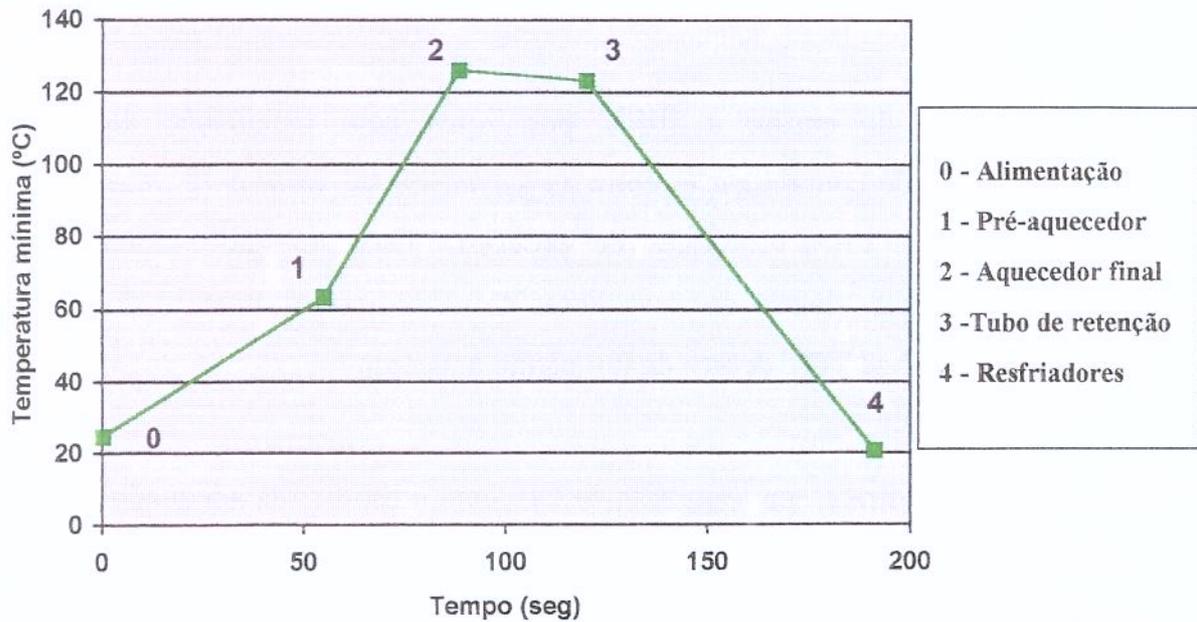


Figura 19 – História térmica mínima do processo e) 124°C/30seg para polpa de tomate, inoculada com esporos imobilizados de *B. coagulans*, em unidade UHT.

CONCLUSÕES

- ☞ Nos resultados do ensaio a 105°C por 30seg com inoculação direta, foi encontrado 2% de contaminação entre as garrafas; este valor é 10 vezes menor ao valor teórico calculado antes do processo. Esse resultado indica que a resistência do bolor dentro dos trocadores de calor possivelmente é diferente a observada em tubos TDT dentro de um banho aquecido.
- ☞ Para inoculação direta, um programa de CIP com o esporicida adequado aliado a uma desinfecção eficiente da superfície da capela de enchimento, tampas das garrafas e esterilização prévia da unidade UHT conseguiu evitar os problemas de contaminação, permitindo realizar os ensaios com ausência de contaminantes.
- ☞ É importante frisar que a inoculação direta tem a vantagem de permitir observar com facilidade o crescimento dos sobreviventes do processo térmico no alimento em questão; no entanto precisa de maiores cuidados de assepsia devido ao alto grau de manipulação no enchimento e fechamento da embalagem. Já no caso da técnica de esporos imobilizados, como a recuperação é restrita, sempre que o filtro coletor seja aberto assepticamente, não haverá problemas com contaminação.
- ☞ Foi possível reproduzir e modificar com êxito a técnica de inoculação de esporos de *N.fischeri* e *B. coagulans* imobilizados individualmente em alginato/tomate, em unidade asséptica UHT, para validar o processo de esterilização em polpa de tomate 8° BRIX processada assepticamente.

☞ Nos ensaios preliminares, a porcentagem de recuperação das esferas foi inferior a 60% , mas nos ensaios posteriores, relatados nesta pesquisa, foram observadas porcentagens de recuperação maiores que 80%, que são superiores aos dados relatados na literatura. Para conseguir esses resultados, foi necessário modificar o método de produção das esferas mediante uma cura do gel à temperatura de 12°C; desta forma, uma gelificação mais forte foi obtida para permitir que as esferas resistissem ao atrito mecânico da movimentação do fluido dentro dos trocadores de calor, saindo íntegras do coletor. Esta modificação introduzida não afetou o nível de recuperação dos esporos a partir das esferas coletadas. A perda da integridade das esferas têm sido relatada por Gaze et al (1990), que citam recuperações menores a 10 esferas em alguns experimentos; nesta pesquisa, esse defeito foi observado inicialmente em processos > 121°C.

☞ Os resultados do ensaio de validação biológica por inoculação indireta, mostraram que tratamentos térmicos $\geq 115^{\circ}\text{C}$ por 30seg não permitiram a sobrevivência de ascosporos imobilizados *N. fischeri*, mesmo com níveis de inoculação de 10^6 esporos. Já no caso de esporos imobilizados de *B. coagulans*, quando processados em unidade UHT, tratamentos térmicos $\geq 109^{\circ}\text{C}$ por 30seg, com níveis de inoculação de 10^5 , resultaram na ausência de crescimento deste bacilo.

☞ Comparando os resultados do valor integrado de esterilização F_s biológico à 121°C, para processos de inoculação indireta e direta de *N. fischeri*, à 105°C, onde houve sobreviventes, notamos que apresentaram valores muito próximos. Tal fato demonstra que as metodologias aplicadas na validação biológica possuem mesma significação na obtenção de um resultado microbiologicamente seguro e eficaz.

☞ Considerando a variabilidade da carga inicial de bolores em polpa de tomate e da resistência dos microrganismos envolvidos, aliada aos níveis de oxigênio remanescente na embalagem e, no produto em linha industrial de processamento, recomenda-se como processo térmico seguro 126° C por 60seg, para eliminação de bolores e bactérias termorresistentes, comuns à polpa de tomate 8° Brix. Este processo, validado em unidade asséptica *Microthermics* de escala laboratorial, certamente tem um fator de segurança alto, já que foi verificado que um aquecimento até 126°C, sem retenção, seguido de resfriamento, já seria suficiente para destruir os contaminantes potenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERTON, J. ; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores : heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, p.565-572, 1970.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, D.C. 1992.
3. ARAGÃO, G.M.F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango**. Campinas, 1989. 139p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
4. ALSKOG, L. Thermal treatment of tomato products. In : **Seminário Internacional da Atualização da Tecnologia do Processamento e Envase Asséptico de Produtos Derivados de Tomate**. Anais. São Paulo, 1995.
5. BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Campinas, 1998. 98p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
6. BALL, C.O. Mathematical solution of problems on thermal processing of canned foods. University of California (Berkeley). **Publications in Public Health**, 1 (2) : 15-245, 1928.

7. BAYNE, H.G. ; MICHENER, H.D. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n°3, p.449-453, 1979.
8. BERNHARDT, L.M. Enlatamento de hortaliças naturalmente ácidas. In: PASCHOALINO, J.E. (Ed.) **Processamento de hortaliças**. Campinas : Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, p.18-32, 1994.
9. BEUCHAT, L.R. ; RICE, S.L. *Byssochlamys spp.* and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25 , p.237-289, 1979.
10. BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n°6, p.1506-1510, 1986.
11. BEUCHAT, L.R. Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores.. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, p.97-105, 1988b.
12. BEUCHAT, L.R. ; PITT, J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In : Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3^aed. Washington: A.P.H.A. Cap. 17, p.251-253, 1992.
13. von BOCKELMANN, B.H. ; von BOCKELMANN, I.L.I.. Aseptic packaging of liquid food product: a literature review. **J. Agric. Food Chemistry**, v.34, pg 384-392, 1986.

14. BROWN, K.L. ; SMITH, G. The Genus *Paecilomyces bainier* and its perfect stage *Byssochlamys westling*. **Trans. Brit. Mycology Society**, 40(11) :17-89, 1957.
15. BROWN, K.L. ; AYRES, C.A.; GAZE, J.E.; Newman, M.E. Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particle. **Food Microbiology**, v.1, p.187-198, 1984.
16. CHEFTEL, H. ; THOMAS, G. Principles and methods for establishing thermal processes for canned foods. Bull, n° 4. **J. J. Carnaud et Forges de Basse-Indre**. Paris, França, 1693.
17. CACACE, D. ; PALMIERI, L. ; PIRONE, G. ; DIPOLLINA, G. Biological validation of mathematical modeling of the thermal processing of particulate foods : the influence of heat transfer coefficient determination. **Journal of Food Engineering**, 24:51-68, 1994.
18. CONNER, D.E. ; BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987 a.
19. DALLYN, H.; FALLOOM, W.C.; BEAN P.G. Method for the immobilization of bacterial spores in alginate gel. **Lab. Practice** 1, v.26, n° 10, pg 773-775, 1977.
20. DIGNAN, D.M. ; BERRY, Jr. ; PFLUG, I.J. ; GARDINE, T.D. Safety considerations in establishing aseptic processes for low-acid foods containing particulates. **Food Technology**, 43 (3) : 118-123, 1989.

21. DRAUGHON, F.A. ; CHEN, S. & MUNDT, J.O. Metabiotic association of *Fusarium*, *Alternaria* e *Rhizoctonia* with *Clostridium botulinum* in fresh tomatoes. **Journal of Food Science**, v.53, n°1, p.120-123, 1988.
22. EIROA, M.N.U. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.23, n°3/4, p.141-160, 1989.
23. ENGEL, G. ; TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.225-234, 1991.
24. ENIGL, D.C. ; KING Jr. A.D. ; TOROK, T. *Talaromyces trachyspermus* , a heat resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v.56, n°12, p.1039-1042, 1993.
25. FELLOWS, P. **Food Processing Technology : Principles and Practice**. Chichester, Ed. Ellis Horwood, 505p, 1988.
26. FERNANDES, M.S. Contaminação fúngica e a legislação vigente no Brasil e outros países. In : Seminário Internacional da Atualização da Tecnologia do Processamento e Envase Asséptico de Produtos Derivados de tomate. **Anais**. São Paulo, 1995.
27. FIGUEIREDO, M.C.L. Fabricação de Extrato de Tomate. In : YOKOYA, F. (Ed) **Microbiologia de processos e produtos alimentícios**. Campinas : Publicação FTPT, p.57-77, 1974.

28. FONSECA, H. Tecnologia de transformação – Parte C. In : MINAMI, K. & FONSECA, H. (Eds) Tomate – Produção , Pré-Processamento e Transformação. **Agroindustrial Série Extensão Agroindustrial, nº8, 1982.**
29. FRISVAD, J.C. ; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in foods and feeds : Ecology, Spoilage and Micotoxin production. In : ARORA, D. K. ; MUKERJI, K. G. ; MARTH, E. H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology – Foods and Feeds.** New York : Marcel Dekker Inc., v.3, Cap.2, p.31-68, 1991.
30. GAZE, J.E.; SPENCE, L.E.; BROWN, G.D.; HOLSWORTH, S.D. Microbiological Assessment of process lethality using food/alginate particles. Technical Memorandum. nº 580. MAFE Project nº 1341. **The Campden Food and Drink Research Association**, pg 1-66, 1990.
31. GOMEZ, M.M. ; BUSTA, F.F. ; PFLUG, I.J. Effect of the post dry heat treatment temperature on the recovery of ascospores of *Neosartorya fischeri*. **Letters Applied Microbiology**, v.8, p.59-62, 1989.
32. GRAHAM, G. Production of spores and preparation of spores suspension and monitors - in : **Eucomed Ed. Proceedings of the First Workshop in Biological Monitoring of Sterilization.** Kekerade, The Netherlands, 21-23 Apr. 140-177, 1986.
33. GUMERATO, H. **Desenvolvimento de um programa de computador para identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs.** Campinas, 1995.

- 106p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
34. HERSON, A.C. ; SHORE, D.T. Aseptic Processing of Foods Comprising Sauce and Solids. **Food Technology**, 35 (5) : 53-58, 1981.
35. HOCKING, A.D. ; PITT, J.I. I. Food spoilage fungi. II. Heat resistance fungi. **CSIRO Food Research Quarterly**, v. 44, n°4, p.73-82, 1984.
36. HOLCOMB, R.G. ; PFLUG, I.J. The Spearman-Kärber Method of Analyzing Quantal Assay Microbial Destruction Data. **Selected Papers on the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**. Environmental Sterilization Laboratory, Minneapolis, MN. 1978.
37. HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin. **Food Chemical Toxicology**, v.31. n°6, p.455-456, 1993.
38. INCQS. Técnicas para controle de qualidade. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sanitizantes domissanitários**. Manual técnico n° 04/85. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Br. 1985.
39. JESENKA, Z. SEPTIKOVA, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri* : some ecologic considerations. **Journal of Food Protection**, v.54, n°8, p.582-584, 1991.
40. KAVANAGH, J. ; LARCHET, N. ; STUART, M. Occurrence of heat resistance species of *aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963.

41. KING, A.D.; BAYNE, H.G. ; ALDERTON, G. Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssochlamys fulva* and other microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, n°3, p.596-600, 1979.
42. KING, A.D. ; HALBROOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. **Journal of Food Science**, v.52, p.1252-1254/1266, 1987.
43. KING JR., A.D. ; WHITEHAND, L.C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, v.55, n°3, p.830-832/836, 1990.
44. KOTILAINEN, H.R. ; GANTS, N.M. An evaluation of three biological indicators systems in flash sterilization. **Infection Control**, 8 (8) : 311-316, 1987.
45. KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n°2, p.410-412/437, 1997.
46. LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de sucos de produtos ácidos. **Boletim ITAL**, v.33, p.9-42, 1973.
47. MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTTI, E.; ROVERE, P.; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**, v.69, p.26-29, 1994.

48. MARCY, M.; GARTHRIGHT, W.; LARKIN, J.W. Design and Analysis. **Food Technology**, v.51, n° 10, pg 52-56, 1997.
49. MICROTHERMICS, Inc. **Manual of proceedings**. Raleigh, N.C., 1999.
50. MILES, J.J. ; SWARTZEL, K.R. Evaluation of continuous thermal process using thermocouple data and calibrating reactions. **Journal of Food Process Engineering**, v.18, p 99-113, 1995.
51. MUNDT, J.O. ; NORMAN, J.M. Metabiosis and pH of moldy fresh tomatoes. **Journal of Food Protection**, v.45, n°9, p.829-832, 1982.
52. MURREL, W.G. Microbiology of canned foods. **Research Quartely**, 45(4) :73-89, 1985.
53. MYERS, T. ; CHRAI, S. Basic principles and applications of bioindicators. **J. Parent. Drugs Ass.** 34 (3) : 235-243, 1980.
54. NACIONAL CANNERS ASSOCIATION - NCA. **Laboratory manual for food canners and processors**, vol 1. Westport, Connecticut, 1968.
55. NIELSEN, P.V. ; BEUCHAT, L.R. ; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied Enviromental Microbiology**, v.54, n°6, p.1504-1510, 1988.

56. NIELSEN, P.V. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat resistant mold, *Noesartorya fischeri*, as measured by na impedimetric method. **Journal of Food Science**, v.56, p.1735, 1991.
57. NUNES, R.V. **Nonisothermal kinetic data generation and thermal process evaluation and optimization**. Ph. D. dissertation, North Carolina State University, Raleigh, NC, 1993.
58. NUNES, R.V. ; SWARTZEL, K.R. ; OLLIS, D.F. Thermal evaluation of food processes : the role of a reference temperature. **J. of Food Eng.** 20(1): 1-15, 1993.
59. ODLAUG, T.E. ; PFLUG, I.J. *Clostridium botulinum* growth and toxin production in tomato juice containing *aspergillus gracilis*. **Applied Enviromental Microbiology**, v.37, p.496-504, 1979.
60. ODLAUG, T.E. ; CAPUTO, R.A. ; MASCOLI, C. Determination of sterilization F-values by microbiological methods. **Developments in Industrial Microbiology**, 22 : 349-355, 1981.
61. OLLIVER, M. ; SMITH, G. *Byssochlamys fulva* sp. **Journal of Botany**, 53 : 196-197 1933.
62. OLLIVER, M. ; RENDLE,T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of Society Chem. Ind**, v.53, p.166T. 1934.

63. PAISANO, M. Suco de tomate. In: YOKOYA, F. (Ed). **Microbiologia de processos e produtos alimentícios**. Campinas : Publicação FTPT, p.81-90, 1974.
64. PALANIAPAN, S. ; SIZER, C.E. Aseptic process validated for food containing particles. **Food technology**, v.51, nº 8, pg 60-68.
65. PASQUEL, A. Gomas, utilização e aspectos reológicos. **Boletim SBCTA**, 33(1), pg 86-97, jan/jun 1999.
66. PITT, J.I. ; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney : Academic Press, 413p, 1985.
67. PFLUG, I.J. ; SMITH, G. the use of biological indicators for monitoring wet heat sterilization processes. In : **Scientific Journal Series**, 9602 : 187-199. Minnesota Agricultural Experimental Station, St. Paul, Mn, 1977.
68. PFLUG, I.J. ; SMITH, G. ; HOLCOMB, R. ; BLANCHET, R. Measuring sterilizing values in containers of food using thermocouples and biological indicator units. **J. Food Protec.** 43 (2) : 119-123, 1980a.
69. PFLUG, I.J. ; JONES, A. T. ; BLANCHET, R. Performance of bacterial spores in measure the Fo-value delivered to cans of food heated in a steritort. **Jounal of Food Science**, 45 (4) : 940-945, 1980b.
70. PFLUG, I.J. ; ODLAUG, T.E. Biological indicators in the pharmaceutical and the medical device industry. **J. Parenteral Sci. & Techn.** 40 (5) : 242-248, 1986.

71. PFLUG, I.J. Text Book for an Introductory Course in the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes. 6th ed. **Environmental Sterilization Laboratory**. Minneapolis, 1990.
72. PORRETA, S. Il controllo della stabilità microbiologica dei derivati del pomodoro. In : PORRETA, S. (Ed.) **Il controllo della qualità dei derivati del pomodoro**. Parma : Srazione Sperimentale per l'industria delle conserve alimentari, p.204-212, 1992.
73. SADEGHI, F. ; HAMID-SAMIMI, M.H. ; SWARTZEL, K.R. Microcomputer program for determining the unique time-temperature associated with the equivalent point method of thermal evaluation. **J. of Food Proc. Pres.** 10:331-335, 1986.
74. SEGNER, W.P. ; RAGUSA, T.J. ; MARCUS, C.L. SOULTER, E.A Biological evaluation of a heat transfer simulation for sterilizing low-acid large particulate foods for aseptic packaging. **J. of Food Process and Preservation**, 13 : 257, 1989.
75. SPICHER, G. Biological indicators and monitoring systems for sterilization processes. **Zbt. Bacteriology Hygiene**, A 267 : 463, 1988.
76. SPLITTSTOESSER, D.F. ; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssochlamys* compared with those of a heat resistant *aspergillus*. **Journal of Food Science**, v.42, p.685-688, 1977.

77. SPLITTSTOESSER, D.F. Fungi of importance in processed fruits . In : ARORA, D.K. ; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds). **Handbook of Applied Mycology – Foods and Feeds**. New York : Marcel Dekker Inc., v.3, Cap7, p.201-219, 1991.
78. SPLITTSTOESSER, D.F. ; CHUREY, J.J. Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulphur dioxide. **Journal of Food Science**, v.56, p.876-877, 1991.
79. SPLITTSTOESSER, D.F. ; NIELSEN, P.V. ; CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.599-603, 1993.
80. SPOTTI, E. ; QUINTARALLA, S. ; MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati. **Industria Conserve**, v. 67, p.421-425, 1992.
81. STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**. 2nd ed., New York : Academic Press, 1973.
82. TOLEDO, R.T. **Fundamentals of food process engineering**. 2nd ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
83. TOURNAS, V. Heat resistantt fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v. 20, n°4, p.243-263, 1994.

84. TOURNAS, V. ; TRAXLER, R.W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v.57, n°9, p.814-816, 1994.
85. VAN DER SPUY, J.E. ; MATHEE, J.N. ; CRAFFORD, D.J.A. The heat resistance of moulds *Penicillium vermiculatum* Dangeard and *Penicillium brefeldianum* Dodge in apple juice. **Phitophylactica**, v.7, p.105-108, 1975.
86. VICINI, E. Note sulla microbiologia delle conserve alimentari acidi e dei derivati del pomodoro in particolare. **Industria Conserve**, v.59, p.22-25, 1984.
87. YATES, AR. ; FERGUSON, W.E. Observation on *Byssochlamys nivea* isolated from cucumber brine. **Canadian Journal of Botany**, v.41, p.1599-1601, 1963.
88. YAWGER, E.S. Bacteriological evaluation for thermal process design. **Food Technology**, 32 (6) : 59-62, 1978.
89. YOKOYA, F. Contagem de fungos nos produtos de tomate pelo método Howard. **Indústria de Alimentos**, v.1, n°1, p.42-46, 1976. YAWGER, E. S. Bacteriological evaluation for thermal process design. **Food Technology**, 32 (6) : 59-62, 1978.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Figuras da Unidade Asséptica *Microthermics* e do fungo *N.fischeri*



Figura 20 – Unidade Asséptica UHT mostrando em primeiro plano capela de enchimento

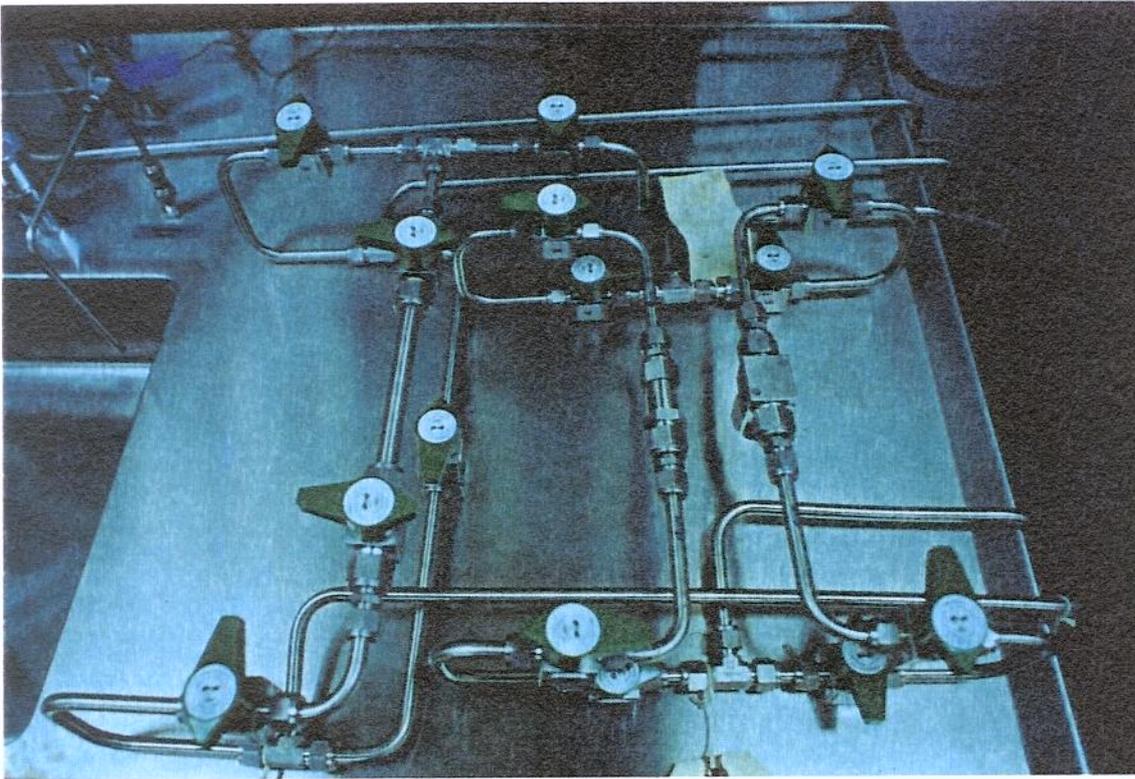


Figura 21 – Linha de injeção (esquerda) e coleta (direita) de esferas

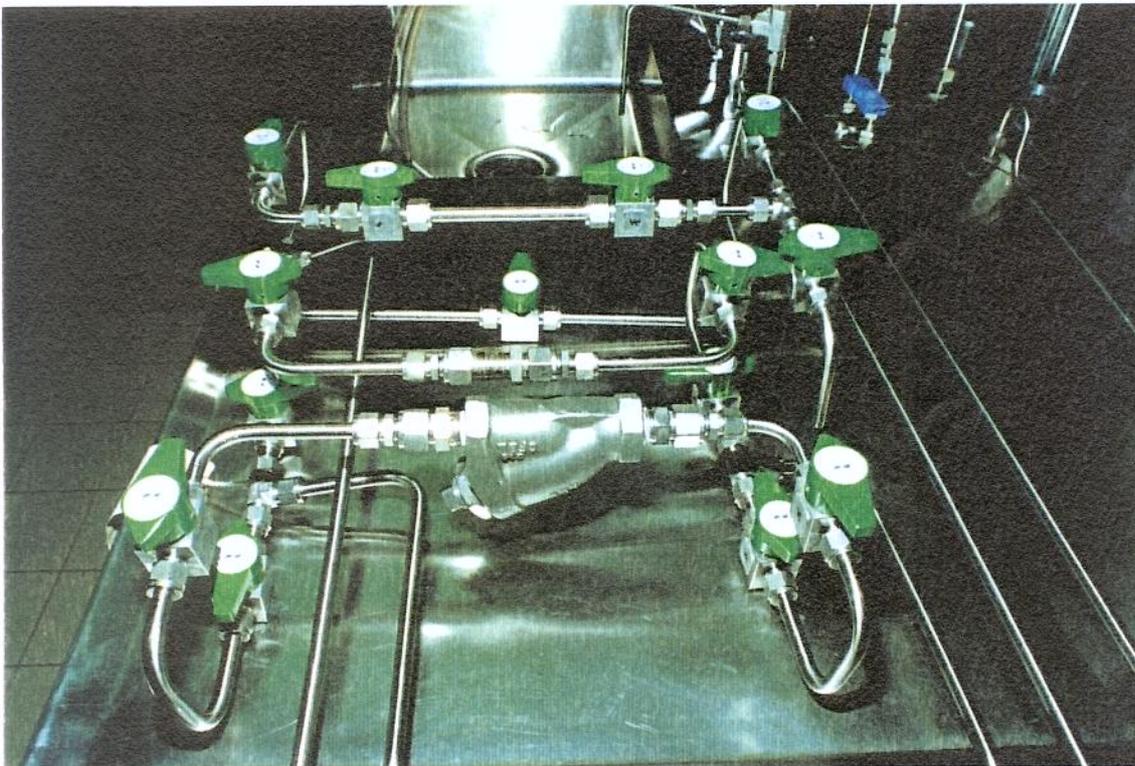


Figura 22 – Coletor (primeiro plano) e injetor (segundo plano) de esferas

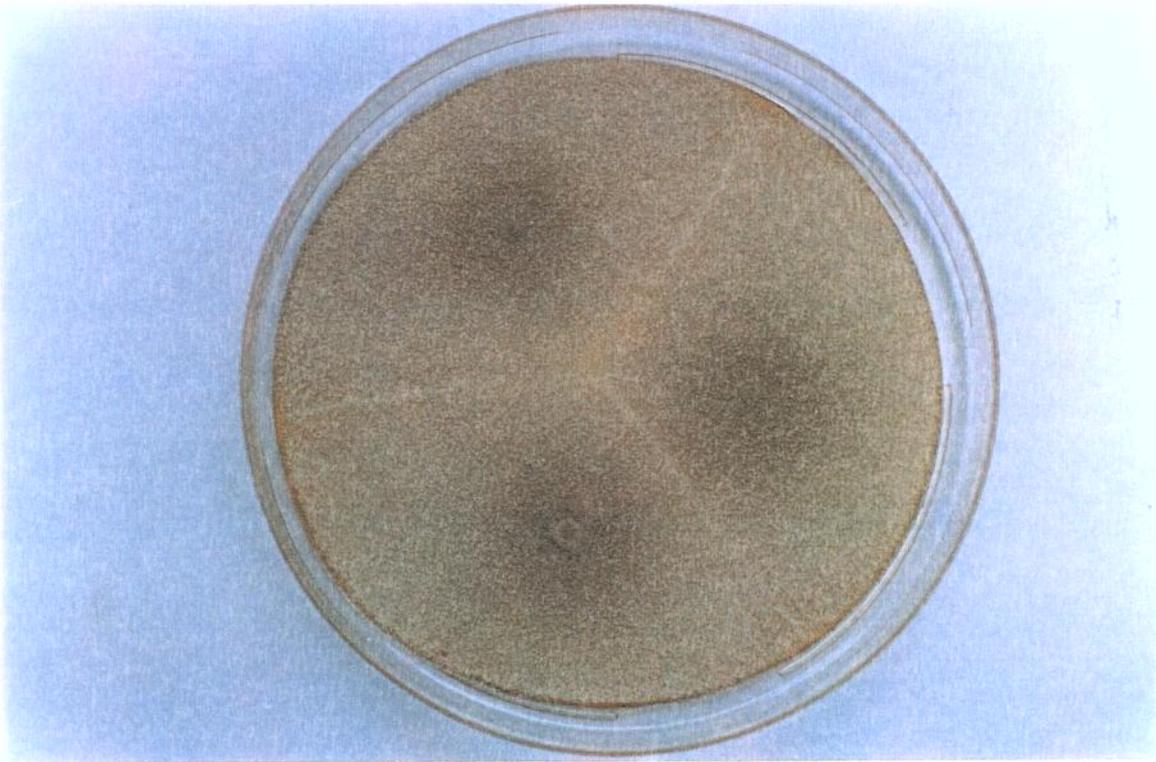


Figura 23 – Ascosporos de N. fischeri em meio Ágar Extrato de Malte (MEA)

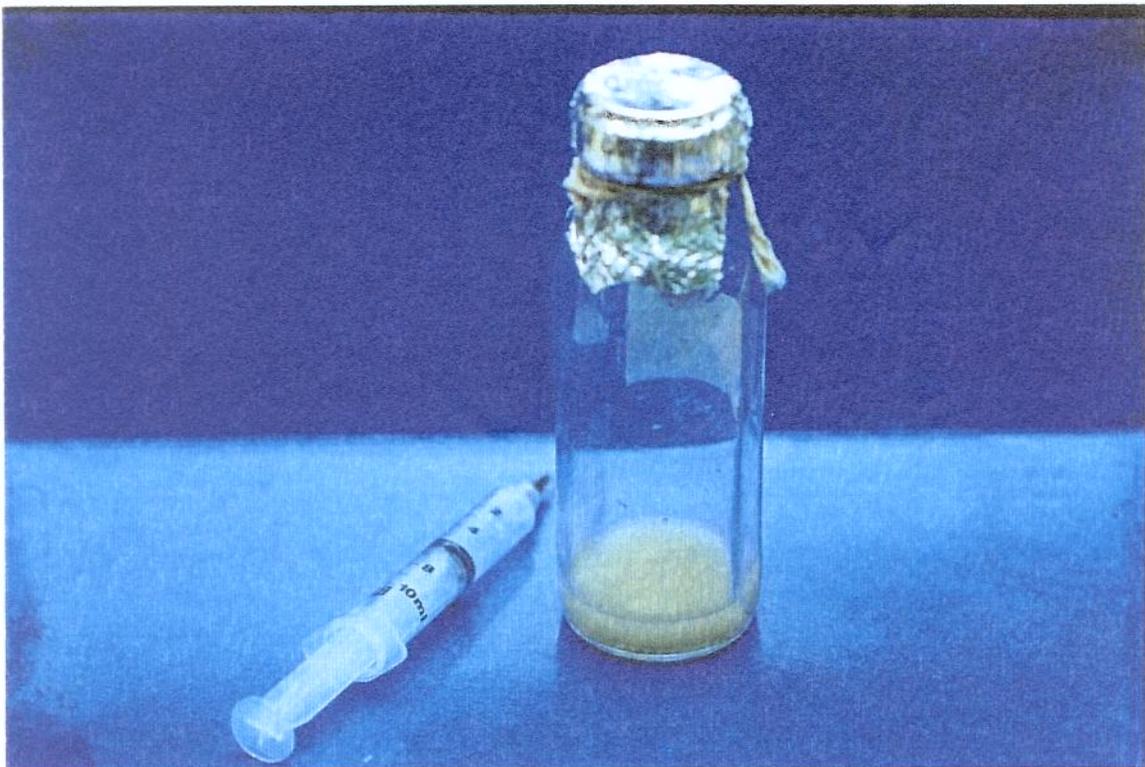


Figura 24 – Suspensão de ascosporos de N. fischeri

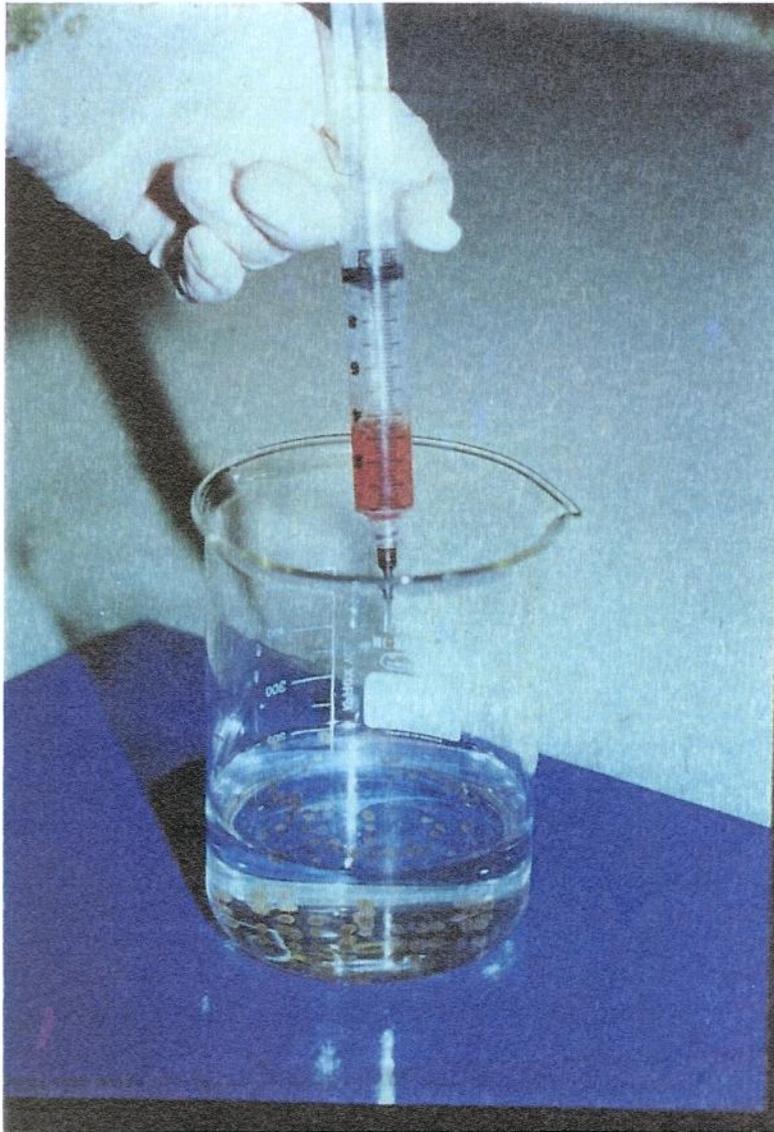


Figura 25 – Produção das esferas de alginato/tomate em solução de cloreto de sódio

Apêndice 2 – Programação do Controle Automático de Enchimento

O modo automático permite que o enchimento seja conduzido para ambas as portas de enchimento. O volume de produto proveniente de cada porta é função do tempo. O tempo de enchimento de cada porta é dado em segundos, sendo programado independentemente. O temporizador que controla o enchimento está localizado no centro do equipamento.

Para estabelecer os tempos de enchimento de interesse, nas portas 1 e 2 seguir a programação abaixo :

1. Ligar a força para poder operar o temporizador,
2. Mudar o seletor "Auto/Off/Manual" para a posição "Off",
3. Mudar o seletor "Continue/Pause" para a posição "Pause",
4. Deixar o seletor "Start Cycle" na posição "Start",
5. Mudar o seletor "Auto/Off/Manual" para a posição "Auto",
6. O display superior mostrará o intervalo de enchimento atual para V1 (porta 1). Mudar o mesmo, pressionando o botão cujo dígito deve ser alterado até que ele atinja o valor desejado. Isto deve ser repetido para cada casa decimal que precise ser reprogramada,
7. Para estabelecer o intervalo de enchimento de V2 (porta 2) pressione uma vez o botão "P". O display superior mostrará o intervalo de enchimento atual de V2. Mudar o mesmo, pressionando o botão cujo dígito deve ser alterado até que ele atinja o valor desejado. Isto deve ser repetido para cada casa decimal que precise ser reprogramada,

Enchimento no modo automático:

1. Colocar o seletor "Continue/Pause" na posição "Pause" e o seletor "Start Cycle" na posição "Start",
2. Mudar o seletor "Auto/Off/Manual" para a posição "Auto". A válvula 2 irá se abrir, e válvula 1 se fechará,
3. Mudar o seletor "Continue/Pause" para a posição "Continue",
4. Mudar o seletor "Start Cycle" para a posição "Cycle". A válvula 1 se abrirá e o tempo de enchimento começará a contar a partir da válvula 1,

OBS :Se é necessário pausar o tempo de enchimento e zerar o temporizador, mudar o seletor "Start Cycle" para posição "Start" e o "Continue/Pause" para posição "Pause"

Apêndice 3 – Certificação da Capela de Fluxo Laminar*

Capela	Atmos-tech EL-533-TT/55 classe 100
Data	24 de janeiro de 2000
Contagem De Partículas	1ª tentativa : 0
(para partículas de 0,5μ)	2ª tentativa : 0
Velocidade Do Ar	0,52m/s
Teste De Sedimentação	<1 em 15min de exposição
Verificação dos Filtros De Ar	OK

* Laudo fornecido pela VECO do Brasil - Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda.

Apêndice 4 – Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

4.1 – Ágar Extrato de Malte – MEA (Difco)

Extrato de Malte.....	20g
Glucose.....	20g
Peptona.....	1g
Ágar.....	20g
Água destilada.....	1000ml
pH final.....	5,5

Dissolução dos componentes à quente.
Esterilização à 121°C/15min

4.2 – Ágar Nutriente – NA (Oxoid)

Extrato de Carne.....	3g
Peptona.....	5g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1000ml
pH final.....	6,8

Dissolução dos componentes à quente.
Esterilização à 121°C/15min

4.3 – Caldo Dextrose Triptona – DTB (Oxoid)

Triptona.....	10g
Glicose.....	5g
Bromocresol púrpura.....	0,04g
Água destilada.....	1000ml
pH final.....	6,9

Dissolução dos componentes à quente.

Esterilização à 121°C/15min

4.4 – Agar Dextrose Triptona – DTA (Oxoid)

Triptona.....	10g
Glicose.....	5g
Bromocresol púrpura.....	0,04g
Ágar.....	12g
Água destilada.....	1000ml
pH final.....	6,9

Dissolução dos componentes à quente.

Esterilização à 121°C/15min

4.5 – Caldo Glicosado 2%

Neopeptona.....	10g
Glicose.....	20g
Ágar.....	20g
Água destilada.....	1000ml
pH final.....	6,1 a 6,3

Esterilização à 121°C/15min

4.6 – Tampão Fosfato de Butterfield

4.6.1 Preparo da solução estoque

KH ₂ PO ₄	34g
Água destilada.....	500ml

Acertar o pH final para 7,0 com 175ml de NaOH 1N, completando o volume para 1000ml.

Esterilizar à 121°C por 15min e armazenar em geladeira

4.6.2 Preparo da solução Butterfield

Solução estoque.....	1,25ml
Água destilada.....	1000ml

Esterilizar à 121°C por 15min e armazenar em geladeira.