



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**AVALIAÇÃO DE SISTEMA ASSÉPTICO PARA
LEITE LONGA VIDA EM EMBALAGEM FLEXÍVEL
INSTITUCIONAL DO TIPO *BAG-IN-BOX***

Claudio Fernandes Cardoso

Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

Orientador

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C179a Cardoso, Claudio Fernandes
Avaliação de um sistema asséptico para leite longa vida em embalagem flexível institucional do tipo bag-in-box / Claudio Fernandes Cardoso. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: José de Assis Fonseca Faria
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Bag-in-box. 2. Asséptico. 3. Leite longa vida. 4. UHT (Ultra high temperature). 5. Esterilização. 6. Embalagem. I. Faria, José de Assis Fonseca. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Evaluation of an aseptic system for long life milk in institutional package bag-in -box type

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bag-in-box, Aseptic, Long life milk, UHT (Ultra high temperature), Sterilization, Packaging

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: José de Assis Fonseca Faria
Carlos Alberto Rodrigues Anjos
Georgiana Sávia Brito Aires
Marcelo Cristianini
Marisa Padula

Data da defesa: 07/04/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



AVALIAÇÃO DE SISTEMA ASSÉPTICO PARA LEITE LONGA VIDA EM EMBALAGEM FLEXÍVEL INSTITUCIONAL DO TIPO *BAG-IN-BOX*

Claudio Fernandes Cardoso

Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas
2011

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. José de Assis Fonseca Faria
Orientador – DTA/FEA/UNICAMP

Prof^o. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos
Membro – DTA/FEA/UNICAMP

Prof^a. Dra. Georgiana Sávia Brito Aires
Membro – UNIPINHAL

Dra. Leila Maria Spadoti
Membro – TECNOLAT/ITAL

Dra. Marisa Padula
Membro – CETEA/ITAL

Prof^o. Dr. Flávio Luís Schmidt
Suplente – DTA/FEA/UMICAMP

Prof^o. Dr. Marcelo Cristianini
Suplente – DTA/FEA/UNICAMP

Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco de Sá
Suplente – TECNOLAT/ITAL

À *Lúcia e Altamiro*, mãe e pai, razões da minha vida;
A *Eduardo*, irmão, melhor amigo e meu maior incentivador;

dedico a subida de mais esse degrau em minha vida profissional, pelo amor,
dedicação, presença constante e por fazerem possível essa grande conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por me dar competência para realizar o trabalho e pela capacidade de superar as grandes dificuldades impostas ao longo do caminho;

Ao Prof. Assis pela amizade, oportunidade e orientação dedicada e valiosa;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP, pela grande oportunidade de realizar toda a pós-graduação;

Aos Professores e Pesquisadores, Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos, Dra. Georgiana Sávia Brito Aires, Dra. Leila Maria Spadoti, Dr. Flávio Luís Schmidt, Dr. Marcelo Cristianini e Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco de Sá, pelas importantes sugestões que ajudaram a enriquecer esse trabalho;

À Évelyn, pela imensa paciência, compreensão, conselhos muito especiais, por sempre acreditar e acima de tudo, pela dedicação;

Ao amigo Eduardo Henrique – Coco – incentivador e referência de trabalho e competência, pela força e sugestões valiosas;

À Alice Kimie, responsável pelo Laboratório de Embalagens, por toda a paciência e serenidade;

Aos amigos do laboratório, Simone (a Si), Wellington (o Well), Eliene, Clívia e Adriano, por todas as colaborações e por proporcionarem um ambiente alegre e fraternal;

Aos estagiários Caroline Martinez, Tatiana Sakamoto e Fernando Toledo, pela ajuda nos processamentos e durante as análises, ajuda esta imprescindível para a realização desse trabalho;

Aos amigos e amigas, Otávio, Caiçara, Tati, Lucielen, Danielle, Carol, Anderson e Salatir, pelas colaborações e alegrias;

Ao Sérgio Bertelli, pelo grande suporte nos processamentos, mas acima de tudo pela amizade, ajuda e presença nos momentos difíceis que passei;

Ao Carlos Vinnícius, o Vinniçã, grande amigo, incentivador e conselheiro nas decisões pessoais e profissionais;

Aos sempre amigos de longa data, sempre presentes e sempre lembrados, José Henrique (o Zé), Diogo Menezes (o Dino), Anibal (o Cabeça) e Danillo (o Danillão);

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial a Alessandra, Adauto, Ana Lourdes, Ana Maria, Bete, Leonel, Diana e Renata, bem como, Bernadete, Jaime, José Roberto, Marlene, Tânia, Sueli, Cosme e Maria, pelas ideais, colaborações e pela carinhosa atenção;

À Scholle Packaging Ltda., representada pelo Alexandre Cavalcante, Gabriela Pereira, Alessandra Saito e Ricardo Burgos, pela parceria, fornecimento de embalagens e equipamento, bem como por toda a atenção e ajuda de grande valia, sem as quais a realização do trabalho não seria possível;

À Sumá Indústria e Comércio Ltda., pelo inúmeros suportes técnicos prestados pelo Paulo, Miguel, Marcelo, Ronaldo, Rogério, Raquel e Vera;

As empresas Ecolab Química Ltda. e Peróxido do Brasil Ltda., pelas parcerias para doação de materiais e pelos suportes técnicos;

À Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), representada pela Jéssica Tosadori, pela parceria nos processos de esterilização das embalagens;

À Fundação André Tosello, pela doação da cultura para o estudo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realizar o doutorado e pela bolsa e auxílio concedido.

Muito obrigado!

“Não importa:

- que a ventania da incompreensão nos zurza o caminho;*
- que a ignorância nos apedreje;*
- que a injúria nos aponte ao descrédito;*
- que a maledicência nos receba a jorros de lama;*
- que a intriga nos envolva em sombra; que a perseguição nos golpeie;*
- que a crítica arme inquisições para condenar-nos;*
- que os obstáculos se multipliquem, complicando-nos a jornada;*
- que a mudança de outrem nos relegue ao abandono;*
- ou que as trevas conspiram incessantemente, no objetivo de perder-nos.*

Importa:

- nos agasalhemos na paciência;*
- que nos apliquemos à desculpa incondicional;*
- que nos resguardemos na humildade, observando que só temos e conseguimos aquilo que a Divina Providência nos empreste ou nos permita realizar;*
- que nos cabe responder ao mal com o bem, sejam como sejam as circunstâncias;*
- e que devemos aceitar a verdade de que cada coração permanece no lugar em que se coloca e que, por isso mesmo, devemos, acima de tudo, conservar a consciência tranqüila, trabalhar sempre e abençoar a todos, procurando reconhecer que todos somos de Deus e todos estamos em Deus, cujas leis nos julgarão a todos, amanhã e sempre, segundo as nossas próprias obras.”*

Emmanuel

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o desempenho de um sistema asséptico piloto para a produção de leite UHT (*Ultra High-Temperature*), com capacidade de 1.000 L/h, em embalagens flexíveis institucionais do tipo *Bag-in-box* (BIB). As embalagens estudadas eram compostas de um filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) e um filme de polietileno tereftalato metalizado (PETmet), com volume de 2.000 mL, desenvolvido especialmente para o envase asséptico de produtos lácteos. Leite cru refrigerado tipo A foi utilizado como matéria-prima. O envase do leite UHT foi realizado através de uma dosadeira semi-automática dentro de uma Sala Limpa ISO posicionada sobre o bocal de enchimento das embalagens. O sistema foi avaliado através da identificação e monitoramento de pontos de controle do processo, testes de esterilidade comercial, análises sensorial e físico-química do produto, bem como avaliações da embalagem. O desempenho das embalagens BIB foi avaliado através de ensaios de caracterização, integridade do sistema e estudos de estabilidade microbiana e testes de efetividade de esterilização. As embalagens foram esterilizadas com o uso de radiação ionizante (gama), com dose de 15 kGy. Os ensaios foram conduzidos através da produção de 4 lotes experimentais de leite UHT, obtido em trocador de calor a placas (140 °C por 5 s). A taxa de defeito encontrada nos testes de esterilidade comercial variou entre 0 e 6,7%, sendo que a principal causa de defeitos foi associada aos problemas inerentes a operacionalidade da linha, como falhas nas vedações das junções de tubulações e bombas centrífugas. Os

resultados da avaliação dos pontos de controle do processo e embalagem indicaram um bom desempenho do sistema, justificado pela ausência de microorganismos viáveis. O leite UHT acondicionado nas embalagens BIB teve sua vida de prateleira estimada em até 27 semanas de estocagem, valor este muito superior quando comparado às amostras controle de leite UHT comercial, acondicionado em embalagens laminadas cartonadas, que teve sua vida de prateleira estimada em 19 semanas. A diferença de estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial entre as amostras processadas e a comercial foi associada às propriedades de barreira das estruturas das embalagens à luz e ao oxigênio, bem como pela qualidade da matéria-prima utilizada. O sistema asséptico piloto avaliado correspondeu às expectativas de desempenho e atendeu aos requisitos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. Concluiu-se que o sistema apresenta potencial para utilização por indústrias de laticínios visando atender o mercado institucional de leite longa vida.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the performance of an aseptic pilot system for the production of Ultra High Temperature (UHT) milk, with 1.000 L/h capacity, filled in flexible institutional packages Bag-in-box (BIB) type. The BIB packages were constructed with one layer of low density polyethylene film (LDPE) and another one of metalized polyethylene terephthalate film (PETmet), with 2.000 mL capacity, specially developed for the aseptic filling of dairy products. Type-A milk was used as raw material and the UHT milk filling was made by a semi-automatic machine located inside a ISO Clean room. The system was evaluated by the identification and monitoring of the control points during the process and also by commercial sterility tests, sensorial and physical-chemistry analysis and packages evaluations. The BIB packages were sterilized by gamma radiation with minimum doses of 15 kGy. The assays were conducted by the production of 4 experimental batches processed in a plate heat exchanger (140 °C/5 s). The defect rates founded were between 0 and 6.7% and these values can be explained by problems linked to the pilot plant operation, like failures in the connections of pipes and centrifugal pumps. The results of the control points evaluation and also BIB packages showed a good performance of the entire process, justified by the absence of viable microorganisms. The milk filled in BIB packages targeted until 27 weeks of shelf life, a superior value when it was compared to the commercial UHT samples, which targeted just 19 weeks. The difference of physical-chemistry, microbiology and sensory stability between the processed samples and the

commercial one was associated to the oxygen and light barriers properties and also to the raw milk quality used during the processes. The pilot aseptic system evaluated attended to the *Codex Alimentarius* requirements and it could be concluded that the system showed potential for application in dairy industry in view of the long life milk institutional market.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	xxi
ÍNDICE DE TABELAS	xxiii
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	5
3- REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1- Sistemas Assépticos	7
3.2- Especificações Assépticas	10
3.3- Esterilidade Comercial	12
3.3.1- Esterilização de produto	12
3.3.2- Valor de F como critério para tratamento térmico	14
3.3.3- Esterilização comercial de leite	20
3.3.3.1- Requisitos de qualidade do leite in natura	21
3.3.3.2- Sistemas UHT por aquecimento indireto	23
3.3.3.3- Sistemas UHT por aquecimento direto	26
3.3.3.4- Alterações do leite durante o processamento UHT	29
3.4- Esterilização das embalagens	35

3.4.1- Contaminação microbiana de embalagens e agentes de sanificação_	37
3.5- Embalagens Bag-in-box para alimentos	39
3.5.1- Desenvolvimento da tecnologia	40
3.5.2- Bag-in-box para leite e derivados	42
3.5.2.1- Acondicionamento e fechamento	44
3.5.3- Processo de esterilização de embalagens BIB	44
3.6- Tecnologia de salas limpas	48
3.6.1- Conceito da tecnologia de salas limpas	49
3.6.2- Aplicações nas indústrias de alimentos	50
3.6.3- Classificação de salas limpas	50
3.6.4- Características das salas limpas	52
3.6.5- Operadores em salas limpas	53
3.7- Qualificação e validação de sistemas assépticos	54
4- MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1- Matéria-prima	57
4.2- Soluções de higienização	58
4.3- Embalagens Bag-in-Box (BIB)	58
4.3.1- Caracterização das bolsas	59
4.3.2- Permeabilidade ao oxigênio	60
4.3.3- Transmissão da radiação ultravioleta e luz	60
4.3.4- Resistência da termosoldagem	61
4.3.5- Teste de emissão de bolhas	61
4.3.6- Caracterização microbiológica das embalagens	61
4.3.7- Avaliação da efetividade da radiação ionizante na esterilização das embalagens	62
4.3.7.1- Quantificação inicial do inóculo	64
4.3.7.2- Quantificação do final do inóculo	64
4.4- Linha de processamento e embalagem	65
4.5- Área de envase asséptico – Sala Limpa	70

4.5.1- Descrição da Sala Limpa _____	70
4.5.2- Certificação da Sala Limpa _____	72
4.5.3- Higienização da Sala Limpa e Dosadora _____	73
4.5.4- Conformidade das condições operacionais _____	74
4.5.5- Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão no ar _____	75
4.5.6- Movimentação ativa de micro-organismos no ar _____	76
4.5.7- Avaliação de limpeza das superfícies _____	76
4.6- Higienização da linha de processamento _____	77
4.7- Monitoramento higiênico do sistema _____	77
4.8- Processamento de leite UHT _____	79
4.9- Teste de integridade das embalagens _____	82
4.10- Testes de esterilidade comercial _____	82
4.11- Marcha de detecção de contaminantes _____	84
4.12- Avaliação sensorial _____	85
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	87
5.1- Caracterização da matéria-prima _____	87
5.2- Embalagens Bag-in-Box _____	88
5.2.1- Caracterização das embalagens _____	88
5.2.2- Permeabilidade ao oxigênio _____	89
5.2.3- Transmissão de radiação ultravioleta e luz _____	91
5.2.4- Resistência da termosoldagem _____	94
5.2.5- Teste de emissão de bolhas _____	96
5.2.6- Caracterização microbiológica das embalagens _____	96
5.2.7- Avaliação da efetividade da radiação ionizante _____	97
5.3- Conformidade das condições da Área Limpa _____	98
5.3.1- Certificação da Área Limpa _____	98
5.3.2- Condições operacionais _____	99
5.3.2.1- Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão _____	99

5.3.2.2- Monitoramento ativo de micro-organismos no ar _____	101
5.3.2.3- Avaliação de limpeza e sanitização de superfícies _____	101
5.4- Monitoramento higiênico do sistema _____	102
5.5- Avaliação da integridade das embalagens _____	102
5.6- Esterilidade comercial do leite UHT _____	103
4- CONCLUSÕES _____	115
5- PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS _____	117
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	119
7- ANEXOS _____	135
Anexo I- Documento para registro de sistemas assépticos para produtos de baixa acidez. _____	137
Anexo II- Modelo de documento de registro para todos os métodos de conservação de produtos comercialmente estéreis, exceto sistemas assépticos de baixa acidez na USFDA. _____	139
Anexo III- Especificações assépticas para os equipamentos dos sistemas assépticos. _____	143
Anexo IV- Dispositivo para abertura das tampas das embalagens BIB e pontos de amostragem (1 e 2). _____	145
Anexo V- Câmaras incubadoras com amostras de leite UHT em embalagens BIB. _____	146
Anexo VI- Ficha para as análises sensoriais. _____	147
Anexo VII- Resultados da certificação da Área Limpa. _____	149
Anexo VIII- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp. _____	158
Anexo IX- Certificado de irradiação das embalagens. _____	160

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mercado de leite fluido no Brasil em 1.000.000 de litros. _____	8
Figura 2- Esquema simplificado de um sistema asséptico. _____	9
Figura 3- Opções de tratamento UHT por aquecimento indireto. _____	24
Figura 4- Diagrama tempo x temperatura para aquecimento indireto. _____	25
Figura 5- Sistema UHT por Injeção de vapor. _____	26
Figura 6- Sistema UHT por Infusão de vapor. _____	27
Figura 7- Diagrama tempo e temperatura de sistema indireto. _____	28
Figura 8- Irradiador de alimentos e embalagens. _____	46
Figura 9- Efeito “cascata” de pressões em salas limpas. _____	53
Figura 10- Embalagem tipo Bag-in-box utilizada no experimento. _____	59
Figura 11- Fluxograma do procedimento para preparo, inoculação e quantificação de esporos de <i>Bacillus pumilus</i> inoculados no interior das embalagens BIB. _____	63
Figura 12- Linha de processamento UHT do DTA/FEA (1. tanque de matéria-prima; 2. trocador de calor; 3. homogeneizador). _____	66

Figura 13- Detalhes do enchimento asséptico dos bags, montado na sala limpa da Planta Piloto do DTA/FEA: (1. tanque asséptico; 2. bomba centrífuga; 3. tanque de equilíbrio; 4. dosadeira).	67
Figura 14- Linha de processamento e embalagem	68
Figura 15- Desenho da Área Limpa utilizada para o envase asséptico de leite.	75
Figura 16- Equipamento de envase das embalagens BIB e pontos de amostragem. (1) base; (2) parte interna do tubo de envase; (3) parte externa do tubo de envase; (4) suporte do tubo de envase; (5) suporte do êmbolo controlador de fluxo e (6) topo.	79
Figura 17- Fluxograma de produção de leite UHT em embalagens BIB. Esterilização do leite realizada a 140 °C por 5 s.	81
Figura 18- Espectro de transmitância especular do filme de PEBD utilizado para confecção da embalagem BIB.	91
Figura 19- Espectro de transmitância especular do filme de PETmet utilizado para confecção da embalagem BIB.	92
Figura 20- Absorbância do filme de PETmet utilizado para confecção da embalagem BIB.	93
Figura 21- Perfil médio de ruptura das soldas longitudinais durante o teste de tração (– – – Transversal e — Longitudinal).	95
Figura 22- Amostras de embalagens com leite UHT alterada (esquerda) e normal (direita) devido ao estufamento.	106
Figura 23- Posicionamento do bico da envasadora no bocal da embalagem durante o enchimento.	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Alvos de conservação e valores F_0 para alimentos de baixa acidez em embalagens herméticas. _____	17
Tabela 2- Valores de F_0 calculados para binômios tempo-temperatura estabelecidos na legislação brasileira para leite longa vida. _____	19
Tabela 3- Binômios temperatura x tempo de residência para o tratamento de leite fluído. _____	21
Tabela 4- Concentrações de componentes do leite após o processamento direto e indireto. _____	30
Tabela 5- Categorias de defeitos de sabor do leite. _____	33
Tabela 6- Classificação de salas limpas e áreas limpas da International Organization for Standardization (ISO). _____	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7- Métodos aplicados na assepsia de embalagens para alimentos. _____	37
Tabela 8- Materiais de embalagem aprovados pela FDA para processos de irradiação. _____	47
Tabela 9- Micro-organismos teste para diversos sistemas assépticos. _____	48
Tabela 10- Classificação comparativa para salas limpas e ambientes controlados. _____	51
Tabela 11- Caracterização da matéria-prima. _____	88

Tabela 12- Caracterização das embalagens BIB.	89
Tabela 13- Taxa de permeabilidade ao oxigênio das embalagens BIB.	90
Tabela 14- Influência do tratamento por radiação ionizante na descontaminação das embalagens BIB, inoculadas com esporos de B. pumilus.	97
Tabela 15- Contagem de partículas em suspensão no ar próximo ao ponto de envase na sala limpa.	100
Tabela 16- Contagem padrão em placas de micro-organismos no ar no ponto próximo ao bico de envase da dosadora.	101
Tabela 17- Taxa de defeitos dos 4 processamentos assépticos de leite UHT.	103
Tabela 18- Caracterização das amostras de leite UHT dos 4 lotes, após os testes de esterilidade comercial.	105
Tabela 19- Caracterização das amostras de leite UHT antes e após incubação a 55 °C por 7 dias.	108
Tabela 20- Avaliação sensorial de leite UHT produzido com leite cru refrigerado tipo A em termos de aceitação média e intenção de consumo (%).	113

1- INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os dez maiores produtores de leite do mundo, sendo que a maior parcela de leite comercializado é do tipo longa vida ou UHT (*Ultra High Temperature*). Entretanto, no que se refere ao consumo *per capita*, ocupa a 65ª posição mundial, com apenas 161 L/habitante ao ano segundo a *Food and Agriculture Organization (FAO-United Nations)* (SOARES, 2010; TRIBUNA DO NORTE, 2011). Na década de 1990, a produção nacional saltou de 11,6 bilhões para 21,3 bilhões de litros anuais, sendo que no mesmo período o leite mais consumido era o do tipo C, empregado como matéria-prima tanto para o pasteurizado quanto para o longa vida e bebidas lácteas (DE MARTINO, 2001; ABLV, 2009). Na situação atual, o leite mais consumido no país é o longa vida, entretanto, o fato marcante da última década no país foi o crescimento desse mercado de 20,20% em 1994, para 74,6% em 2009, conforme estatísticas da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA (2010).

Este crescimento no consumo do leite UHT pode ser justificado pela crescente necessidade de produtos que proporcionem maior conveniência e praticidade ao consumidor final, devido, principalmente, à escassez de tempo. Sendo assim, esse fato tornou o leite longa vida um balizador do mercado de lácteos, pelo expressivo volume comercializado e pelas facilidades que esse produto oferece na sua manipulação e a organização dos agentes econômicos (ABLV, 2009; 2010; SOARES, 2010; TRIBUNA DO NORTE, 2011).

O leite UHT foi introduzido no Brasil em 1972, mas até o início dos anos 90 representava, apenas, cerca de 5% do mercado de leite fluido legalizado. Alves (2008) atribuiu esta pequena parcela de mercado ao desconhecimento do produto pelo consumidor e ao “desinteresse” das padarias - principal canal de vendas do leite fluido na época - em comercializá-lo. Além disso, a capacidade industrial instalada era baixa. Já Orbell (1980) afirmou que o mercado consumidor americano não era acostumado com o leite longa vida há alguns anos atrás e, embora testes de esterilidade comercial e testes sensoriais indicassem a boa qualidade do leite UHT, os consumidores não aceitaram o produto. Com a liberação de mercado pelo governo, iniciada em 1992, ocorreu uma concentração do setor de laticínios e um aumento da importância dos supermercados na distribuição de alimentos, que passaram a comercializar o leite UHT a preços competitivos ao leite pasteurizado. Isso possibilitou um crescimento acelerado do consumo do leite UHT no país. Nesse cenário, destaca-se também a opção do consumidor por um produto de maior conveniência na periodicidade de compra e estocagem.

O sistema asséptico, no entanto, não é uma tecnologia atual ou moderna. Estudos sobre este tema vêm sendo realizados desde o início do século XX, com os mais variados tipos de alimentos. De fato, constituem um dos setores mais dinâmicos e promissores da indústria de alimentos (SZEMPLENSKI, 2005). Nos Estados Unidos existem 28 sistemas assépticos comerciais diferentes, sendo que na década de 1980 o número de sistemas era o dobro do atual e, somente no período entre 1999 e 2005, foram criados 10 novos sistemas (BRODY, 2006). No Brasil, o mercado é praticamente dominado por uma única empresa, a pioneira Tetra Pak Ltda, a maior empresa mundial em sistemas assépticos. Outra empresa que vem atuando no mercado nacional, mas de forma restrita desde 1997, é a DuPont S.A. cuja embalagem utilizada é uma bolsa plástica parecida com a tradicional almofada do leite pasteurizado, mas formado por uma estrutura flexível multicamadas. A Sig Combibloc S.A., principal concorrente internacional da Tetra Pak, ampliou a sua atuação no mercado sul-americano em 2005. O Brasil foi priorizado com a implantação em 2009 de uma fábrica de embalagens no Paraná,

já que representa cerca de 70% do mercado sul-americano de embalagens laminadas flexíveis de alumínio, cartão e plástico (SIG.BIZ, 2008).

No segmento de embalagens assépticas de alta capacidade, encontram-se as embalagens institucionais do tipo *Bag-in-Box*, também chamadas de BIB. Tais embalagens vêm ganhando espaço em todo o mundo, inclusive no Brasil, com novas aplicações surgindo a cada dia. Os produtos acondicionados neste tipo de embalagem podem se apresentar sob diferentes volumes, indo desde aquelas com pequenos volumes (3 a 5 L), adequadas aos consumidores na linha institucional para restaurantes, hotéis, bares e escolas, passando pelos BIB de 200 a 1.200 L, para volumes em escala industrial. Uma empresa dos Estados Unidos que começou sua operação latino-americana, há aproximadamente 13 anos, é a Scholle Ltda que oferece soluções em embalagens e equipamentos de envase para produtos líquidos. A Scholle é hoje a empresa que tem maior participação no mercado de BIB no país, atuando principalmente em embalagens de pequeno volume para vinhos e embalagens industriais de alta capacidade de 1.200 L. Destaca-se, também, neste mercado a empresa brasileira Embaquim Indústria e Comércio Ltda que já atua há mais de 25 anos no segmento de BIB com bolsas de 1 a 1.200 L, compatíveis com o sistema de envase a quente (*hot filling*). Ainda no campo das embalagens BIB para a linha de assépticos, encontram-se no mercado brasileiro as empresas Conteflex, Krest International, Depall, Longa Industrial e Tropical Foods Machinery Ltda (PARDI, 2006; SOUZA, 2008; PEREIRA, 2008).

As vantagens dos produtos estáveis a temperatura ambiente transformaram o mercado de sistemas assépticos em um negócio atrativo. No entanto, existem barreiras consideráveis à entrada e permanência nesse mercado, tais como a complexidade inerente aos sistemas, os investimentos demandados em pesquisa e desenvolvimento e a competitividade empresarial. A concepção do sistema proposto nesse trabalho primou pela simplicidade, visto à necessidade de se adquirir experiência e otimizar o capital dispensado em desenvolvimento e operação. A verificação de desempenho desse sistema visou provar que o mesmo funciona conforme condições estabelecidas, ou seja, de forma eficaz e eficiente.

De acordo com Bernard et al. (1990), num sistema asséptico esses procedimentos incluem: considerações quanto às características do produto, equipamentos e embalagens, os pontos de controle, a produtividade e taxa de não-esterilidade estabelecida, assim como a legislação pertinente, dentre outros aspectos.

O sistema estudado poderá atender às indústrias de laticínios de pequeno à grande porte, bem como a cadeia consumidora de produtos institucionais, que demanda embalagens de maior volume. O sistema também poderá ser uma alternativa para as empresas de produtos lácteos, pois os sistemas assépticos comerciais requererem um grande volume de produto para se tornarem viáveis tecnicamente. Além disso, o sistema poderá ser utilizado na produção de produtos com vida de prateleira estendida (*extended shelf-life* - ESL). O leite com vida de prateleira estendida ou superpasteurizado, trata-se basicamente de produto produzido com matéria-prima de boa qualidade, tal como a do leite tipo A, que é submetido a um tratamento térmico intermediário entre a pasteurização rápida e a esterilização rápida (UHT), acondicionado em um sistema semi-asséptico e estocado sob refrigeração. Na Austrália, Canadá, Estados Unidos e em alguns países Europeus esse produto apresenta uma vida de prateleira variando entre duas semanas a dois meses (RAKIN, 2002).

Dada à limitada legislação existente para sistemas assépticos no Brasil, o presente trabalho também poderá servir como subsídio para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelecer instrumentos legais específicos para os atuais e futuros sistemas. O principal documento internacional que pode ser utilizado para sistemas assépticos é o código de práticas higiênicas para alimentos de baixa acidez processados e acondicionados assepticamente, do *Codex Alimentarius* (1993a).

Deste modo, esta proposta de pesquisa visa também transferir tecnologias para indústrias brasileiras de alimentos líquidos, além de fomentar novas pesquisas, dando continuidade à linha de pesquisa em sistemas assépticos e consolidar a atual infra-estrutura da Faculdade.

2- OBJETIVOS

- Avaliar um sistema asséptico piloto para leite longa vida em embalagens institucionais do tipo *Bag-in-box* (PETmet/PEBD), visando atender à demanda atual das indústrias de leite pasteurizado;
- Verificar o desempenho do sistema piloto através da identificação e monitoramento sistemático de pontos de controle do processo;
- Estimar a vida de prateleira do leite, através de testes de esterilidade comercial, análises sensoriais e físico-químicas;
- Avaliar a adequação do sistema de embalagem com relação a vida de prateleira necessária para a comercialização do produto.

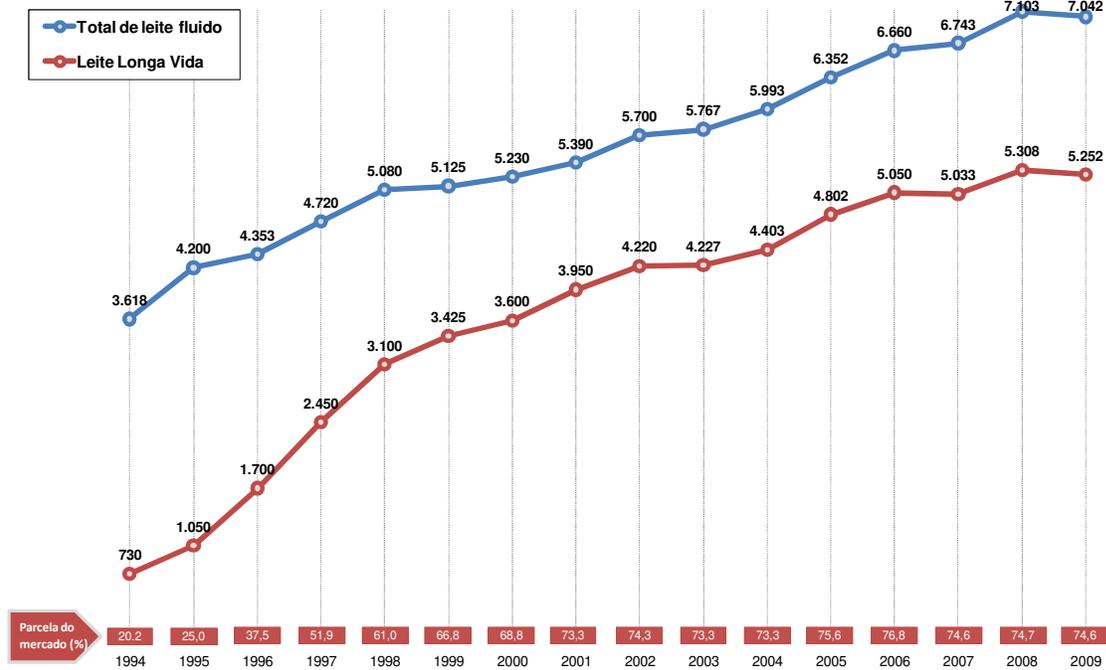
3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Sistemas Assépticos

São aqueles que fazem referência ao sistema como um todo, incluindo o processamento asséptico do produto e de embalagem, bem como o enchimento em área limpa ou zona asséptica (HOLDSWORTH e RICHARDSON, 1992). Os processos modernos de acondicionamento visam o aumento do tempo de vida de prateleira do produto, a redução do uso de conservadores químicos e da necessidade de refrigeração. Neste contexto, as técnicas de assepsia, que são básicas para a indústria farmacêutica, vêm sendo cada vez mais empregadas no setor alimentício (PETRUS, 2004).

A tecnologia asséptica tem cerca de 80 anos, com desenvolvimento a partir de 1927 na *American Can Company*, sob a coordenação de C. Olin Ball (MITCHELL, 1988). Entretanto, a sua aplicação em grande escala comercial e a diversificação dos produtos tem ocorrido nas últimas décadas. No Brasil, por exemplo, o leite *ultra high-temperature* (UHT) foi introduzido em 1972, mas até o início dos anos 90 compreendia, apenas, cerca de 5% do mercado de leite fluido, dominado pelo leite pasteurizado em embalagens flexíveis. Depois de uma década, o produto passou a representar mais de 70% do mercado, estimado atualmente em cinco bilhões de litros de leite fluido ao ano ou de embalagens laminadas cartonadas (ABLV, 2010). A Figura 1 apresenta o comportamento do mercado de leite fluido no Brasil. Ademais, os produtos assépticos, que até a

década de 1980 ficavam limitados principalmente aos sucos e leites, diversificaram as opções nas prateleiras dos mercados, incluindo alimentos particulados com carnes e vegetais.



Fig

ura 1- Mercado de leite fluido no Brasil em 1.000.000 de litros.

Fonte: Adaptado da Associação Brasileira das Indústrias de Leite Longa Vida – ABLV (2010).

Segundo o *Codex Alimentarius* (1993b), os sistemas assépticos, também denominados processamento e acondicionamento asséptico, são definidos como o processamento de um produto comercialmente estéril e acondicionamento numa embalagem esterilizada, seguido de fechamento hermético e estéril, de maneira a prevenir a recontaminação microbiológica do produto e atingir a esterilidade comercial. O envase é realizado em um ambiente estéril, conhecido como Zona Asséptica. Nesse ambiente é realizada a insuflação de ar estéril, para a obtenção de pressão positiva na região de enchimento (BRODY e MARSH, 1997).

Esses requerimentos são particularmente importantes para alimentos com pH > 4,6 e atividade de água > 0,85 (alimentos de baixa acidez). Nem todos os equipamentos de processamento empregados no mercado são capazes de

disponibilizar produtos de baixa acidez comercialmente estáveis. Tal capacidade é determinada por testes microbiológicos para validar a esterilização e os requerimentos de manutenção da esterilidade comercial, sendo que os equipamentos validados para os produtos de baixa acidez também podem ser utilizados para o envase de produtos de alta acidez (BRODY e MARSH, 1997).

A Figura 2 representa um esquema simplificado do sistema asséptico.

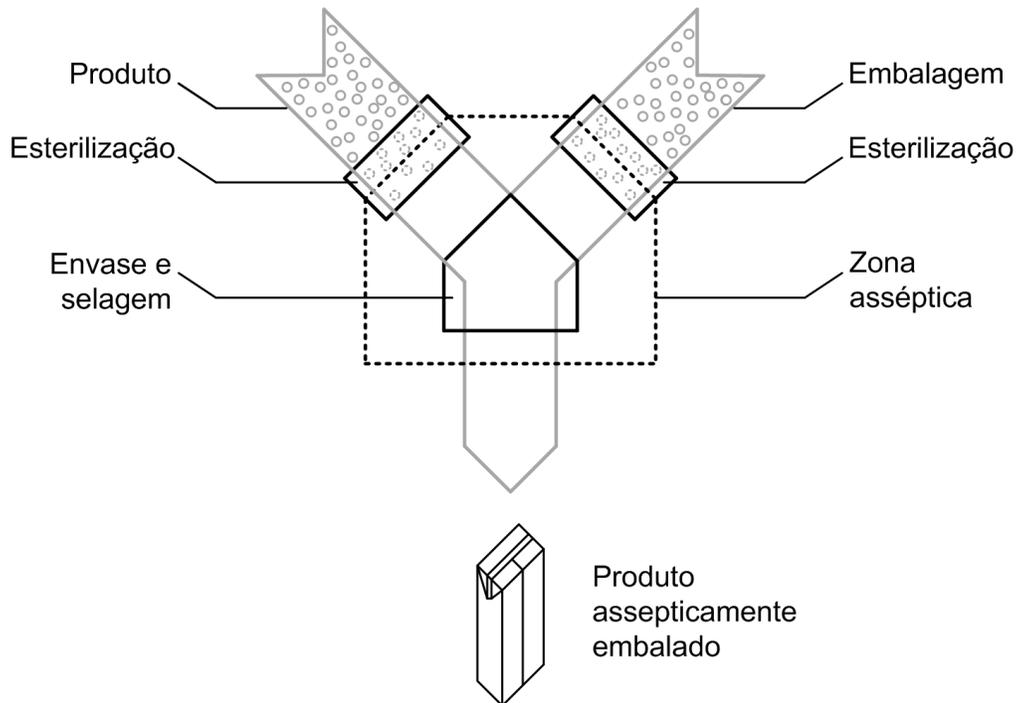


Figura 2- Esquema simplificado de um sistema asséptico.

Fonte: adaptado de Sig.Biz (2008).

Pflug (1987a) propôs uma abordagem quantitativa para a especificação do produto ou processamento, que indica o nível de micro-organismos críticos num determinado número de embalagens, em termos da probabilidade de unidades não-estéreis (PUNE). Esse parâmetro é definido como a relação entre o número de embalagens não-estéreis e o total de embalagens produzidas, sendo estabelecido em função de diversos fatores, incluindo: a legislação; a natureza do produto; a política de qualidade empresarial; a concorrência de mercado e; o tipo de consumidor alvo. Os valores de PUNE para sistemas assépticos podem apresentar-se nos seguintes níveis: 1:100 - inaceitável; 1:1.000 - realística;

1:10.000 - ambiciosa; 1:100.000 - dificilmente atingível; 1:1.000.000 – impraticável (VON BOCKELMANN, 1991).

3.2- Especificações Assépticas

As especificações assépticas (*scheduled process*), segundo o *Codex Alimentarius* (1993a), significam todas as condições necessárias para alcançar e manter a esterilidade comercial dos elementos de um sistema asséptico. Esses elementos incluem: produto; superfícies de contato do produto; material de embalagem; gases e equipamento. O estabelecimento das especificações assépticas deve ser executado por pessoas qualificadas em processamento e acondicionamento asséptico, ou seja, especialistas, e que disponham de uma infra-estrutura adequada para realização das determinações necessárias.

O estabelecimento das especificações assépticas deve ser efetuado por pessoas qualificadas ou organizações com infra-estrutura adequada, que atuem como autoridades em processos. Na indústria, as especificações assépticas devem estar documentadas e prontamente acessíveis para consulta, pelos responsáveis pelo sistema ou autoridades dos órgãos oficiais de jurisdição, consistindo num instrumento genérico para análise do sistema (CODEX ALIMENTARIUS, 1993b). Essa documentação, preferencialmente, deve ser aprovada, datada e assinada pela autoridade em processo, responsável pela operação, responsável legal e proprietário do estabelecimento, firmando o compromisso de implementação, monitoramento, avaliação, registro e manutenção das especificações.

Os operadores do sistema devem estar sob a supervisão de uma pessoa treinada, que conheça os princípios do processamento e embalagem asséptica (CODEX ALIMENTARIUS, 1993b). A legislação americana determina que o supervisor seja satisfatoriamente aprovado em um curso de instruções sobre operação de autoclaves e sistemas assépticos, assim como inspeção do fechamento de embalagens (USFDA, 2009a; 2009b). No Brasil, esse curso vem sendo ministrado pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas, SP.

Nos Estados Unidos, os sistemas assépticos de produtos de baixa acidez e acidificados sob jurisdição da *Food and Drug Administration* (FDA), são analisados através de documentos de registro de processo (*process filling*). Existem dois tipos de documentos de registro, um para sistemas assépticos de produtos de baixa acidez, apresentado no Anexo I (USFDA, 2008a), e outro para todos os métodos de conservação de produtos comercialmente estéreis, exceto sistemas assépticos de baixa acidez, apresentado no Anexo II (USFDA, 2008b). Adicionalmente, a USFDA exige uma documentação com especificações dos equipamentos, fatores críticos e controles dos sistemas assépticos, apresentada no Anexo III (USFDA, 2001). Outras informações podem ser requeridas, incluindo o relatório da validação de processo em novos sistemas assépticos. Esses documentos devem ser providenciados por todos os processadores de alimentos que comercializam produtos nos Estados Unidos, servindo para identificação de perigos potenciais à saúde pública e para monitorar o cumprimento da legislação. A USFDA disponibiliza um guia de instruções, em formato eletrônico, para preenchimento de cada documento de registro (USFDA, 1997).

Os produtos não incluídos nas regulamentações da FDA para alimentos de baixa acidez em embalagens herméticas são os seguintes (USFDA, 1997; 2009a; 2009b):

- Alimentos ácidos, com pH normal ou natural $\leq 4,6$;
- Bebidas alcoólicas;
- Alimentos fermentados, com redução do pH para 4,6 ou menos, pela ação de micro-organismos produtores de ácidos;
- Alimentos processados sob a jurisdição do programa de carnes e frangos da *United States Department of Agriculture* (USDA);
- Alimentos com atividade de água $\leq 0,85$;
- Alimentos que não são termicamente processados;
- Alimentos que não são acondicionados em recipientes hermeticamente fechados;
- Alimentos estocados, distribuídos e comercializados sob refrigeração, sendo visivelmente rotulados com informações como, mantenha refrigerado;

- Tomates e produtos derivados, com pH final de equilíbrio < 4,7.

Os produtos não incluídos nas regulamentações da FDA para alimentos acidificados são (USFDA, 1997; 2009a; 2009c):

- Alimentos ácidos, com pH normal ou natural $\leq 4,6$;
- Alimentos ácidos que contêm uma pequena quantidade de alimentos de baixa acidez e cujo pH final de equilíbrio não difere significativamente do componente predominante;
- Bebidas alcoólicas;
- Bebidas carbonatadas;
- Alimentos fermentados;
- Alimentos com atividade de água $\leq 0,85$;
- Geléias, conservas de frutas e produtos similares.

3.3- Esterilidade Comercial

3.3.1- Esterilização de produto

Visa a destruição ou inativação de enzimas e micro-organismos, incluindo seus esporos, que podem causar alterações indesejáveis ao produto, podendo incluir desde modificações no aroma e sabor até a produção de toxinas. A esterilização térmica, ultra filtração, irradiação e utilização de altas pressões figuram entre as principais tecnologias aplicadas para garantir tal condição (PETRUS, 2004; TRIBST e FARIA, 2010).

A esterilidade comercial significa ausência de micro-organismos capazes de desenvolver no alimento em condições normais sem refrigeração, pelas quais o produto deve ser manuseado durante a produção, distribuição e estocagem (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). No contexto dos sistemas assépticos, a definição de esterilidade comercial também é empregada para denotar o estado em que equipamentos e sistemas de embalagens ficam livres de micro-organismos capazes de se desenvolver no alimento nas condições de produção, distribuição e estocagem.

O conceito de esterilidade comercial é empregado na indústria de alimentos perante limitações de natureza composicional dos alimentos, técnica e analítica em se alcançar ou comprovar o estado de esterilidade absoluta; ou seja, a ausência de micro-organismos em uma amostra ou lote de produção. O tratamento necessário para alcançar a esterilização completa de um alimento pode destruir os seus atributos sensoriais e o seu valor nutritivo. A contaminação das matérias-primas é variável e as populações homogêneas geralmente apresentam uma cinética de destruição logarítmica, independentemente da aplicação de tratamentos físicos ou químicos. Por outro lado, os tratamentos de descontaminação têm intensidades fixas e estão sujeitos às falhas. As análises microbiológicas detectam somente as formas de organismos capazes de desenvolver nas condições teste, de modo que a ausência absoluta de organismos não pode ser comprovada como um todo. Ademais, as análises microbiológicas geralmente são destrutivas, demoradas, onerosas e, mesmo que fossem aplicadas em 100% das amostras de um lote, não comprovariam a esterilidade absoluta (PFLUG, 1987b). Conseqüentemente, o conceito de esterilidade comercial foi introduzido na indústria de alimentos, inicialmente para produtos enlatados e termicamente processados, denotando uma condição de estabilidade microbiana, por um período indeterminado, nas condições normais de produção, distribuição e estocagem.

O cálculo da Probabilidade de Unidades Não Estéreis (PUNE), proposto por Pflug (1987a), de um sistema composto por vários elementos pode ser determinado pela regra da adição de riscos ou Teorema de Morgan da Álgebra Booleana. A PUNE pode ser expressa como a soma dos riscos de não-esterilidade individual de todos os elementos do sistema, desde que os riscos individuais sejam muito menores que 1. Celf (1981) extraiu desta regra dois fundamentos para os sistemas assépticos: (i) O risco de não-esterilidade está diretamente associado com a operação de esterilização menos eficiente; (ii) Quanto maior o número de operações de esterilização, maior o risco de não-esterilidade. Essas considerações podem ser exemplificadas supondo-se um sistema com três elementos, com os seguintes riscos: R1 de 10^{-3} ; R2 de 10^{-5} ; R3

de 10^{-6} . O risco total do sistema seria de $1,011 \times 10^{-3}$, aproximadamente igual ao R1.

A ocorrência de unidades não-estéreis em sistemas assépticos pode ser atribuída a diferentes causas. Existem relatos que indicam a operação de embalagem asséptica como a mais crítica. Todavia, considerações operacionais do sistema como um todo, bem como a experiência, levaram a Von Bockelmann (1988) a atribuir as falhas a uma ou mais das seguintes causas:

- Construção imprópria dos equipamentos;
- Instalações incorretas das linhas de produção;
- Negligência na manutenção preventiva da planta de produção;
- Operações indevidas;
- Qualidade deficiente da matéria-prima;
- Manuseio e distribuição inadequada do produto final.

3.3.2- Valor de F como critério para tratamento térmico

Os processos térmicos para esterilização comercial do produto, ou qualquer elemento do sistema asséptico, podem ser estabelecidos através de vários critérios. Na esterilização comercial de alimentos o critério mais comumente utilizado é o valor F_T , introduzido por Ball (1923). O valor F_T significa o tempo de retenção numa temperatura arbitrária na qual o processo como um todo é equivalente. Desse modo, esse critério pode ser empregado para comparar diferentes processos com diferentes temperaturas de retenção, tempos de retenção e taxas de aquecimento (LEWIS e HEPPELL, 2000).

Pflug (1997) define o valor F_T como tempo de processo térmico equivalente em minutos a uma determinada temperatura de referência T para alcançar a condição requerida de conservação, ou seja, para reduzir a contaminação microbiana da matéria-prima até um alvo de conservação (*endpoint*). O alvo de conservação deve ser mensurável e especificado através da Probabilidade de Unidade Não Estéreis (PUNE). Os três alvos de conservação para produtos de baixa acidez em embalagens hermeticamente fechadas e estocadas à

temperatura ambiente, bem como dos outros elementos do sistema asséptico, são os seguintes: o produto deve ser seguro do ponto de vista da saúde pública, em termos de *Clostridium botulinum*, apresentando uma PUNE de 10^{-9} , ou seja, uma probabilidade de um esporo viável em 10^9 embalagens; conservado contra a deterioração de esporos de mesófilos numa PUNE de 10^{-6} ; e conservado contra a deterioração de esporos de termófilos, com uma PUNE de 10^{-3} , quando estocado em temperaturas abaixo de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, e de 10^{-6} , em temperaturas ambiente mais elevadas (PFLUG, 1987a).

Nas populações microbianas homogêneas, que apresente curvas de destruição semilogarítmica lineares, o valor F_T pode ser determinado por um modelo matemático simples (PFLUG, 1987b), descrito pelas Equações (1), (2) e (3).

$$F_T = (\log N_0 - \log N_F) \cdot D_T, \quad (1)$$

ou

$$F_T = Y_n \cdot D_T, \quad (2)$$

onde,

$$Y_n = \log N_0 - \log N_F. \quad (3)$$

Nessas equações, F_T é o tempo de processo térmico equivalente em minutos a uma determinada temperatura de referencia T ; N_0 é a população inicial de micro-organismos críticos por unidade; N_F é o número de micro-organismos que resistem ao processo térmico ou a PUNE; D_T é o tempo de redução decimal; e Y_n é o número de reduções decimais do processo F_T .

No cálculo do F_T para segurança de um produto em relação à sobrevivência de esporos de *Clostridium botulinum*, considerando-se que a contaminação inicial da matéria-prima seja de 10^3 e que o processo seja especificado com um PUNE de 10^{-9} , tem-se (Equação 4):

$$F_T = [\log(10^3) - \log(10^{-9})] \cdot D_T = 12 \cdot D_T \quad (4)$$

Para o valores $D_{121,1^{\circ}\text{C}}$ de 0,21 min e z de 7,7 $^{\circ}\text{C}$ de esporos de *Clostridium botulinum* tipo A, tem-se um $F_{121,1^{\circ}\text{C}}$ de 2,52 min. O $F_{121,1^{\circ}\text{C}}$ de um processo térmico é expresso como F_0 , ou seja, tempo de processo térmico equivalente em minutos para temperatura de referência de 121,1 $^{\circ}\text{C}$ (250 $^{\circ}\text{F}$) e valor z de 10 $^{\circ}\text{C}$, baseado no coeficiente térmico de *Clostridium botulinum* (LEWIS e HEPPELL, 2000).

O critério de esterilização comercial 12D foi definido por Stumbo (1973) para os processos térmicos de alimentos de baixa acidez em embalagens herméticas. Entretanto, os critérios 12D e o critério da PUNE de 10^{-9} coincidem somente para N_0 de 10^3 . O N_0 pode variar entre 10^4 por embalagem, para matérias-primas à base de cogumelos, e 10^{-1} , nas matérias-primas para produtos cárneos (GREENBERG et al., 1966; PFLUG, 1987b).

Pflug (1987b) formulou um guia para o estabelecimento de alvos de processos térmicos ou PUNE, bem como valores F_T requeridos para assegurar proteção à saúde do consumidor e prevenir perdas econômicas pelo processador (Tabela 1). Esses requerimentos foram estabelecidos com base em dados de laboratório e experiências empíricas adquiridas em mais de 100 anos de conservação de alimentos de baixa acidez em embalagens herméticas à temperatura ambiente.

Tabela 1- Alvos de conservação e valores F_0 para alimentos de baixa acidez em embalagens herméticas.

Perigo	PUNE ^a	F_0 (min)
Saúde pública	10^{-9}	3 ^b
Conservação		
Esporos de mesófilos	10^{-6}	5 – 7 ^c
Esporos de termófilos		
Temperaturas de estocagem e distribuição < 30 °C	10^{-3}	5 – 7 ^c
Temperaturas de estocagem e distribuição > 30 °C	10^{-6}	15 – 21 ^c

^a Probabilidade de unidades não estéreis.

^b Baseado nos dados de laboratório de Esty e Meyer (1966).

^c Baseado em experiências empíricas de Pflug (1987b).

Fonte: Pflug, Berry e Dignan (1990).

O tratamento UHT do leite consiste na aplicação de calor sob fluxo contínuo, por um período apropriado, de tal modo a tornar o produto comercialmente estéril durante o processamento (CODEX ALIMENTARIUS, 2004). A legislação brasileira define leite longa vida como o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 e 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1996). Já segundo Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998), o tratamento deve ser realizado com temperatura entre 135 e 140 °C e com tempo de retenção de 2 a 6 s para sistemas de troca de calor de forma indireta.

Considerando os parâmetros estabelecidos na legislação brasileira para esterilização comercial do leite longa vida, a Tabela 2 apresenta os valores F_0 . Os dados evidenciam que vários binômios tempo-temperatura, contemplados na legislação brasileira, não atendem ao F_0 mínimo de 3 min, para assegurar a proteção do consumidor contra *C. botulinum*, ou destruição de esporos deteriorantes.

A determinação do tempo de residência mínimo necessária para um produto atingir a esterilidade comercial numa temperatura pode ser realizada por métodos de injeção de sais ou corantes e/ou por modelos matemáticos. Os modelos matemáticos incorporam a vazão e as propriedades reológicas do fluido, assim como, as dimensões e o desenho do tubo de retenção. Em situações onde as características de escoamento do fluido são desconhecidas, os cálculos precisam ser validados através de ensaios experimentais biológicos, como pelo teste de inoculações (*inoculated pack test*) (CODEX ALIMENTARIUS, 1993a).

Tabela 2- Valores de F_0 calculados para binômios tempo-temperatura estabelecidos na legislação brasileira para leite longa vida.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	F_0 (min)
130	2	0,3
130	3	0,4
130	4	0,5
132	2	0,4
132	3	0,6
132	4	0,8
134	2	0,7
134	3	1,0
134	4	1,3
136	2	1,1
136	3	1,6
136	4	2,1
138	2	1,7
138	3	2,5
138	4	3,3
140	2	2,6
140	3	4,0
140	4	5,3
145	2	8,4
145	3	12,6
145	4	16,7
150	2	26,5
150	3	39,7
150	4	53,0

Fonte: calculado a partir de Brasil (1996).

3.3.3- Esterilização comercial de leite

Leite aquecido em sistemas de fluxo contínuo até atingir temperaturas superiores a 135 °C, por um período de no mínimo 1 s, sendo rapidamente refrigerado e envasado assepticamente é definido como leite comercialmente estéril ou leite UHT (LEWIS e HEPPELL, 2000).

O processamento do leite UHT pode ser realizado em diferentes sistemas de trocadores de calor, mas comumente em sistemas de trocadores a placas e tubulares, utilizando como meio de aquecimento vapor ou água quente pressurizada. Mais recentemente este processamento também vem sendo realizado através da tecnologia de aquecimento direto, com injeção ou infusão de vapor culinário no leite. Neste caso o vapor culinário condensa e dilui o produto, sendo que o excesso de água é removido através do sistema *flash cooling* (LEWIS e HEPPELL, 2000).

Segundo a *Food Milk and Dairy Hygiene Regulations* (STATUTORY INSTRUMENTS, 1995) é estabelecido que o leite UHT deva ser obtido através de aplicação de calor em fluxo contínuo, estabelecendo-se altas temperaturas por um curto período de tempo de exposição (não menos que 135 °C e 1 s de exposição). Dessa forma, todos os micro-organismos residuais, bem como seus esporos serão destruídos, sendo que as transformações químicas, físicas e sensoriais ao leite deverão ser mínimas.

Diversos binômios temperatura x tempo de processamento são aplicados legalmente em diversos países. Na legislação americana é estabelecido que a esterilização comercial tenha que ser necessária para assegurar a destruição de micro-organismos de significância para a saúde pública e deve ser, pelo menos, equivalente ao tratamento estabelecido por uma autoridade competente (CODEX ALIMENTARIUS, 1993b, 2003).

A Tabela 3 apresenta uma lista dos tratamentos mais comuns aplicáveis ao leite fluido (BRASIL, 2002; VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; STATUTORY INSTRUMENTS, 1995; LEWIS e HEPPELL, 2000).

Tabela 3- Binômios temperatura x tempo de residência para o tratamento de leite fluído.

Tratamento		Temperatura	Tempo de residência
Pasteurização		72 – 75 °C (fluxo contínuo)	Mínimo 15 s
UHT	1. Sistema Indireto	135 – 140 °C	2 – 6 s
	2. Sistema Direto	145 – 150 °C	1 – 4 s
Esterilização		110 – 116 °C	20 – 30 min

Fonte: Brasil (2002); Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998); Statutory Instruments (1995); Lewis e Heppell (2000).

3.3.3.1- Requisitos de qualidade do leite *in natura*

O leite é um meio ideal para desenvolvimento de bactérias, sendo sua flora natural, constituída por cerca de 10^2 a 10^4 UFC/mL, proveniente dos canais de leite da vaca, do úbere, dos equipamentos de ordenha utilizados durante a produção, dentre outros. Essa flora inclui *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter-Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e Coliformes (BURTON, 1986; FORSYTHE, 2002).

A deterioração do leite é consequência, sobretudo, do desenvolvimento de micro-organismos psicrótrópicos, que produzem lipases e proteases termoestáveis que não são inativadas durante o tratamento térmico. As *Pseudomonas*, *Flavobactérias* e *Alcaligenes* spp. são produtoras de lipases, as quais produzem cadeias médias e curtas de ácidos graxos a partir dos triglicerídios do leite. Esses ácidos graxos conferem ao leite sabor e aroma rançoso (VATNE e CASTBERG, 1991; FORSYTHE, 2002).

As proteases são produzidas pelas *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* e *Bacillus* spp. Essas enzimas hidrolisam as proteínas do leite, produzindo peptídios que o deterioram. Por esta razão, altas contagens microbianas antes do tratamento térmico são indesejáveis, já que a ação residual das enzimas durante a estocagem resulta na redução da estabilidade do leite (FORSYTHE, 2002).

Os micro-organismos no leite podem ser classificados, com base na resistência ao calor, em três classes (TEUBER e BUSSE, 1981):

-Classe I

Englobam os micro-organismos destruídos pela pasteurização convencional ou pelo processo *High Temperature Short Time* (HTST), com binômio característico de 72 °C/15 s. Este tratamento elimina os micro-organismos patogênicos, a maioria das células bacterianas vegetativas, leveduras e bolores.

-Classe II

Compreende os micro-organismos resistentes ao tratamento HTST, mas que são sensíveis ao tratamento UHT.

-Classe III

Os micro-organismos constituintes dessa classe são resistentes ao tratamento UHT, incluindo os esporos de *Bacillus stearothermophilus* e outros bacilos e clostrídios mesófilos e termófilos.

De acordo com von Bockelmann (1988), a microbiologia do leite pode seguir três situações:

- O produto está isento de micro-organismos vivos; ou
- O produto contém micro-organismos que não se desenvolvem nas condições normais de estocagem e distribuição; ou
- O produto contém micro-organismos capazes de se desenvolver nas condições normais de estocagem e distribuição.

A possibilidade de desenvolvimento de micro-organismos no leite UHT e suas consequências, com relação à falta de esterilidade comercial, são divididas entre a formação de gases (85%), coagulação sem formação de gases (10%) e alteração no sabor sem formação de gás (5%) (VON BOCKELMANN, 1988).

De acordo com Zacarchenco (2000), o micro-organismo *Bacillus sporothermodurans* vem sendo isolado a partir de leite processado pelo sistema

UHT. As amostras contaminadas apresentaram contagens em torno de 10^5 UFC/mL sem evidências maiores de alterações sensoriais. Outras espécies do gênero *Bacillus*, como *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, entre outras, também têm sido isoladas de leite UHT.

Segundo Mottar e Waes (1996), deve-se fazer uma seleção preliminar do leite *in natura*, primeiro pela determinação de suas características sensoriais (sabor e aparência), depois pelas análises físico-químicas (% de gordura, ponto de congelamento, pH, acidez, testes de antibióticos, principalmente penicilinas) e, por último, as análises microbiológicas.

3.3.3.2- Sistemas UHT por aquecimento indireto

Neste sistema, uma superfície de aço inoxidável de troca térmica separa o produto do meio de aquecimento ou resfriamento. O meio de aquecimento comumente utilizado é água ou vapor superaquecido, como é demonstrado na Figura 3 (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998).

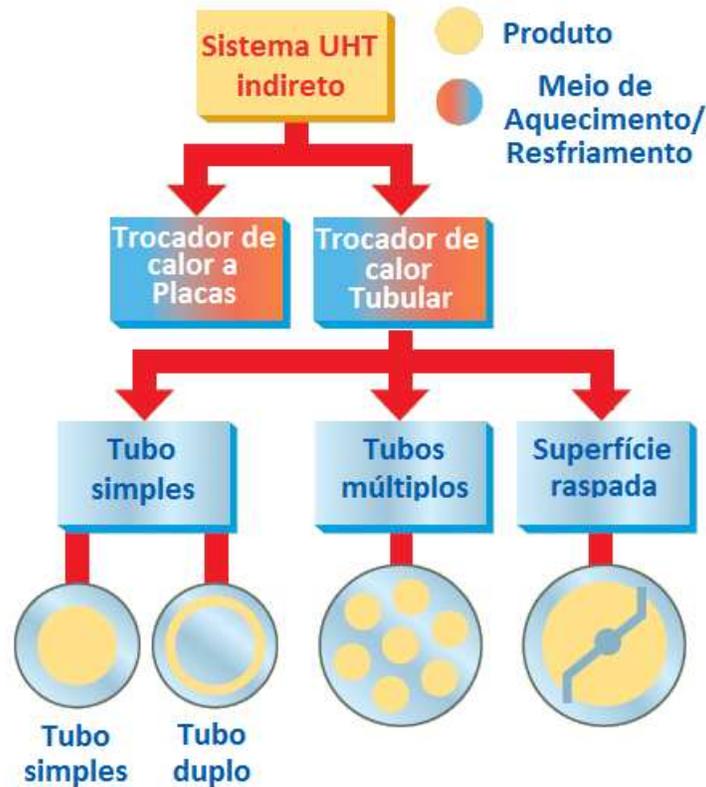


Figura 3- Opções de tratamento UHT por aquecimento indireto.

Fonte: adaptado de Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998).

O produto entra na linha de processamento, com temperatura média de 4 °C, por meio de um tanque de equilíbrio e de uma bomba centrífuga. Em seguida, é aquecido entre 70 a 75 °C e homogeneizado. Para leite, a homogeneização acontece em pressões de 200 – 250 kg/cm² (150 – 200 kg/cm² no primeiro estágio e 50 kg/cm² no segundo). O homogeneizador é uma bomba de pistão de deslocamento positivo, que impulsiona o produto através das partes restantes do processador UHT para o envase asséptico ou para o tanque asséptico. A faixa de temperatura de esterilização é entre 135 – 140 °C e o tempo de residência no tubo de retenção varia de 2 a 6 s (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; LEWIS e HEPPELL, 2000). Um diagrama típico tempo x temperatura, para o sistema de aquecimento indireto, está ilustrado na Figura 4.

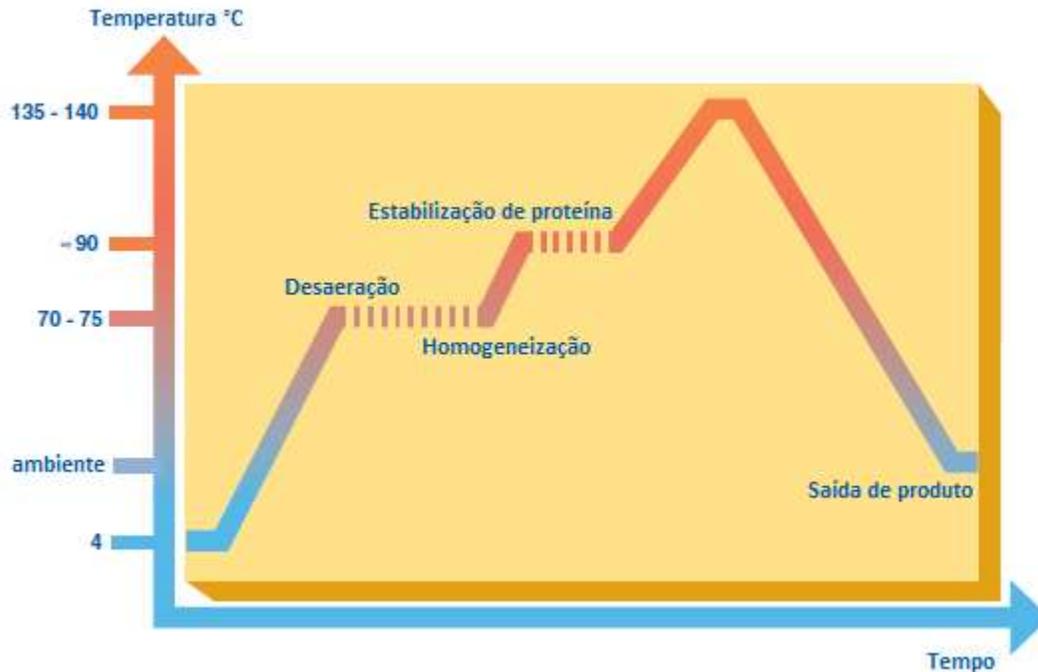


Figura 4- Diagrama tempo x temperatura para aquecimento indireto.

Fonte: adaptado de Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998).

Geralmente, o leite chega ao homogeneizador com 6 a 9 ppm de oxigênio, dependendo da temperatura. Mas nos sistemas mais completos, passa por uma câmara de vácuo (desaerador) para reduzir o oxigênio dissolvido de 1 a 3 ppm (LEWIS e HEPPELL, 2000).

As vantagens do sistema UHT de aquecimento indireto são (TETRA PAK, 2010):

- É relativamente simples tecnicamente;
- Os equipamentos são construídos e operados com custos menores;
- Permitem recuperar muita energia térmica através do sistema de regeneração (para trocadores a placas valores de até 93%);
- Requerem serviços limitados de manutenção.

Para sistemas de processamento comercial, com trocadores de calor a placas ou tubulares (com um ou múltiplos tubos), a capacidade fica em torno de 2.000 a 30.000 LI/h.

3.3.3.3- Sistemas UHT por aquecimento direto

Faz uso do contato direto entre o meio de aquecimento e o produto que será processado. Vapor culinário saturado comumente é utilizado como meio de aquecimento, entretanto a tecnologia de aquecimento elétrico também pode ser aplicada em alguns casos. No aquecimento por vapor, este pode ser realizado através de infusão ou injeção (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; RICHARDSON et al., 2007). A injeção implica na liberação do vapor culinário saturado diretamente no produto (Figura 5). Nas plantas com tratamento por infusão, o produto é infundido em uma câmara com vapor culinário (Figura 6) (VON BOCKELMANN, 1991; LEWIS e HEPPELL, 2000; MASSAGUER, 2006).

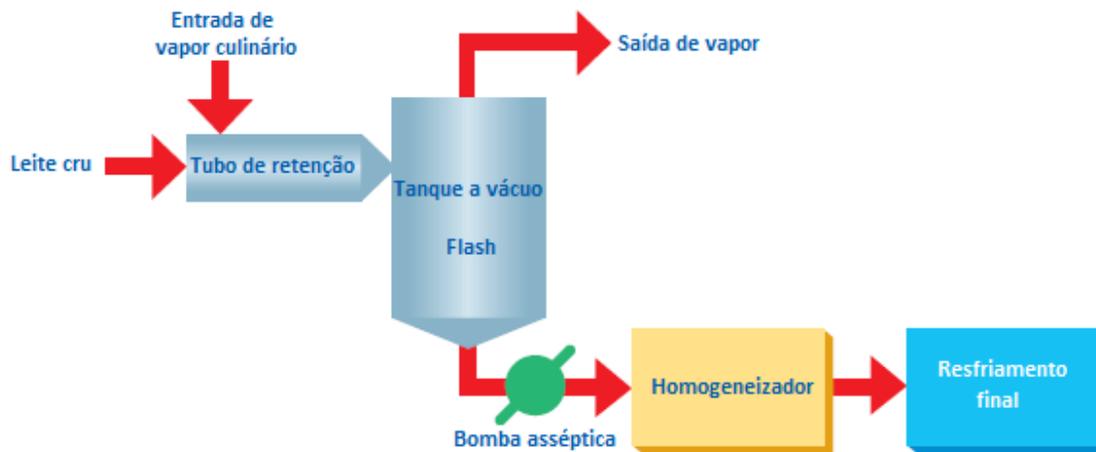


Figura 5- Sistema UHT por Injeção de vapor.

Fonte: adaptado de Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998).

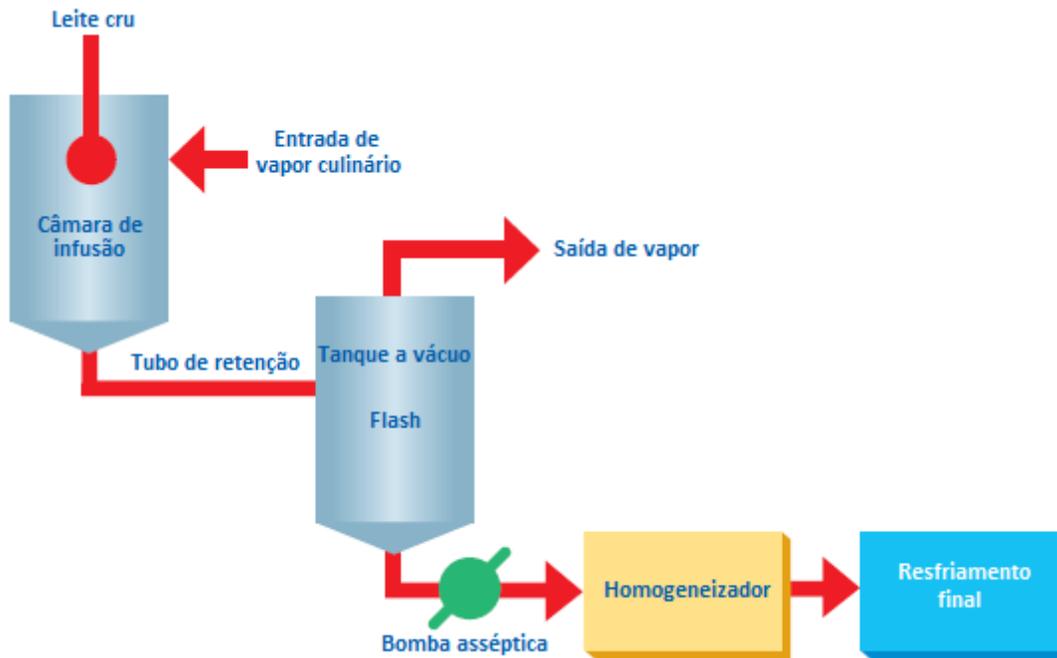


Figura 6- Sistema UHT por Infusão de vapor.

Fonte: adaptado de Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998).

Os sistemas direto de processamento UHT têm, obrigatoriamente, que operarem com vapor culinário. O *US Department of Health and Human Services* (1985) lista os seguintes requerimentos para a produção do vapor culinário:

1. A água para alimentação de caldeira deve ser tratada e sob a supervisão de pessoal treinado.
2. Operação de caldeira: uma fonte de vapor seco e limpo é necessária para a correta operação do equipamento; é recomendado que análises periódicas sejam realizadas no condensado formado.
3. Tubulações: as tubulações de fornecimento devem ter a seguinte ordem: entrada de vapor, filtro, manômetro, válvula de controle e purificador.

A Figura 7 ilustra um diagrama típico do tempo e temperatura para o sistema de aquecimento direto.

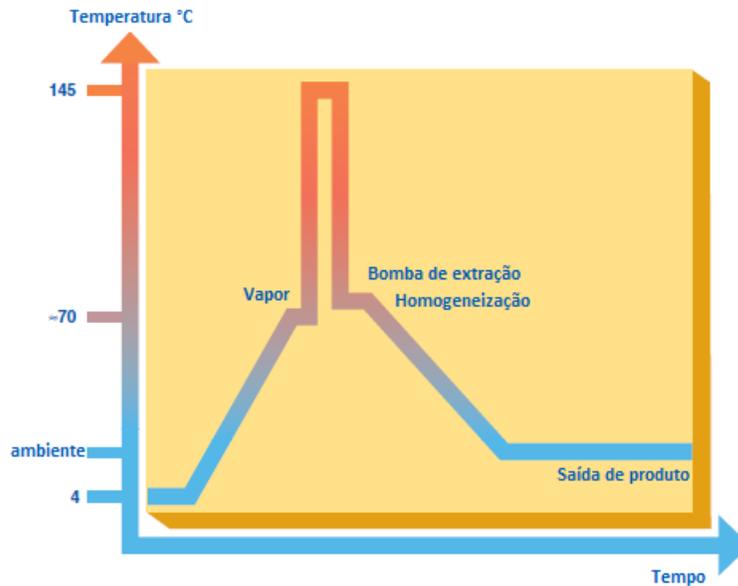


Figura 7- Diagrama tempo e temperatura de sistema indireto.

Fonte: adaptado de Von Bockelmann e Von Bockelmann (1998).

O produto entra no processador, por meio de um tanque de equilíbrio e de uma bomba centrífuga, com temperatura média de 4 °C . É então aquecido, de forma indireta, a temperatura de 70 °C e vapor culinário é injetado no produto ou este é infundido em uma câmara com vapor. A condensação do vapor provoca a elevação rápida da temperatura (~0,1 s se injetado ou ~0,25 s se infundido) até valores entre 145 – 150 °C. Nestes casos, o tempo de residência no tubo de retenção varia de 1 a 4 s (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998).

Em ambos os processos, injeção ou infusão, a condensação acaba por diluir o produto. Em média o ganho é de aproximadamente 10% no volume total que, obrigatoriamente, precisa ser removido. Para isso, um tanque a vácuo é conectado logo após o tubo de retenção. Com a baixa pressão no interior do tanque, o produto entra em ebulição, vigorosamente, para extrair o vapor formado (processo *flash*).

Ainda, segundo Tetra Pak (2010) pode-se destacar algumas vantagens do aquecimento por injeção e infusão, a saber:

- Baixa carga total de calor que, como resultado, promove alterações químicas e físicas reduzidas;
- O tempos totais de processamentos são mais longos, permitindo a redução dos ciclos de limpeza;
- Os valores reduzidos de oxigênio dissolvido no produto aumentam a estabilidade de algumas vitaminas e, durante o período de armazenamento, reduz alterações no sabor provocadas por processos de oxidação.
-

3.3.3.4- Alterações do leite durante o processamento UHT

Desde o surgimento da tecnologia de processamento UHT em sistemas diretos e indiretos (1960 – 1970), muitos estudos vêm sendo realizados comparando ambos os processos, em termos de reduções de esporos, desnaturação de proteínas, formação de sedimentos, coagulação de enzimas e perda de nutrientes (METHA, 1980; JELEN, 1982; VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; LEWIS e HEPPELL, 2000).

Já é bem definido que o sistema de processamento direto para leites proporciona um sabor menos “cozido” do que para o sistema indireto. Isso se deve principalmente ao fato de que no sistema direto há o aquecimento e resfriamento mais rápido, combinado com o sistema de vácuo proporcionado pelo sistema *flash-cooling* (Tanque *Flash*), que reduz alterações nos componentes voláteis relacionados ao sabor “cozido”. Além disso, o oxigênio dissolvido no leite oriundo do tratamento por sistema direto é reduzido, o que proporciona menor taxa de oxidação durante o período de estocagem (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; LEWIS e HEPPELL, 2000; MERMELSTEIN, 2001).

A Tabela 4 ilustra como o sistema direto de processamento UHT é menos severo.

Tabela 4- Concentrações de componentes do leite após o processamento direto e indireto.

Componente	Sistema de aquecimento	
	Direto	Indireto
Proteína (mg/100g)	38,8	27,6
Perda de lisina (%)	3,8	5,7
Perda de vitaminas (%)	B ₁₂	16,8
	B ₉	19,6
	C	17,7

Fonte: adaptado de LEWIS e HEPPELL, 2000.

Dependendo da severidade do processamento térmico, inúmeras alterações poderão acontecer nos constituintes do leite. Dentre elas, pode-se destacar as seguintes:

Proteínas

Dentre os constituintes do leite, aqueles que mais sofrem alterações durante o processamento UHT e estocagem são as proteínas. As alterações nas proteínas estão relacionadas aos problemas tecnológicos com produtos UHT, tais como *off-flavor*, gelatinização, formação de sedimento, incrustação da superfície de transferência de calor, perda de valor nutricional e escurecimento (NIEUWENHUIJSE, 1995). O principal efeito do tratamento UHT nas caseínas é a mudança na distribuição dos tamanhos das micelas que, em geral, têm seu tamanho aumentado. Quando as proteínas do soro são desnaturadas, formam complexos entre si, com caseínas e com glóbulos de gordura (DUNKLEY e STEVENSON, 1987). Proteínas também participam das reações de Maillard durante a estocagem, ocasionando o subsequente escurecimento do leite (HOLDSWORTH, 1992).

Vitaminas

O processamento UHT do leite causa pouca redução de sua qualidade nutricional, mas durante a estocagem, ou seja, após o envase asséptico, as perdas de vários nutrientes podem ser significativas. A temperatura de estocagem, concentração inicial de oxigênio no leite e a barreira do material de embalagem são de elevada importância. A qualidade nutricional mantém-se melhor conservada pela embalagem hermética do leite desaerado em materiais opacos, estocado, preferencialmente, sob refrigeração (DUNKLEY e STEVENSON, 1987).

As vitaminas lipossolúveis são pouco afetadas pelo calor, sendo as hidrossolúveis as mais sensíveis. A pasteurização destrói aproximadamente 5% de tiamina e 10% de vitamina C, enquanto que o processamento UHT destrói 10% das vitaminas B, 15% de ácido fólico e 25% de vitamina C (HOLDSWORTH, 1992).

As vitaminas hidrossolúveis como a vitamina C, ácido fólico e vitamina B12, são também perdidas durante a estocagem, especialmente na presença de luz e oxigênio. A desaeração auxilia na retenção de vitaminas hidrossolúveis; no entanto, sem a desaeração os ácidos fólico e ascórbico são perdidos dentro de duas semanas de estocagem (HOLDSWORTH, 1992).

Segundo Metta (1980), o valor nutritivo do leite UHT pode ser reduzido em dois estágios: durante o tratamento UHT ou durante a estocagem. O valor nutritivo é normalmente reduzido devido às alterações nas estruturas químicas dos nutrientes. O efeito do processamento UHT difere para os vários nutrientes do leite. O valor nutritivo de alguns constituintes como a gordura, vitaminas lipossolúveis, carboidratos e minerais permanece basicamente inalterado, ao passo que outros componentes como as vitaminas hidrossolúveis e proteínas, especialmente as soro proteínas, são adversamente afetadas. Durante a estocagem, os principais fatores que afetam os nutrientes são a temperatura, a luz e o oxigênio. As principais alterações nutricionais que ocorrem no leite durante a estocagem e comercialização estão associadas às vitaminas, sendo as proteínas afetadas em menor extensão.

Aparência

A cor do leite UHT é influenciada por muitos fatores tais como a composição do leite, as mudanças nas distribuições de tamanhos de partículas, resultantes da homogeneização e tratamento térmico e reações de Maillard. A aparência mais branca do leite UHT em relação ao leite *in natura* é devido à desnaturação das proteínas do soro e subsequente agregação com a caseína. A cor não é considerada um defeito que limita a aceitabilidade do leite, mas é de importância para produtos que contêm açúcares redutores (HOLDSWORTH, 1992), entretanto, Mendonça (2009) afirma que alguns consumidores de leite UHT são capazes de perceber alterações na coloração do produto.

Gelificação e formação de sedimentos

De acordo com Murray e Stewart (1978), o problema da gelificação do leite UHT durante a estocagem ocorre devido às seguintes hipóteses: puramente um processo físico-químico ou o efeito é derivado de enzimas.

A viscosidade aumenta gradativamente até que o produto gelifica e torna-se impróprio para o consumo. A gelificação pode também ser considerada como resultado da ação de micro-organismos psicrotóxicos, como pseudomonas, que produzem enzimas estáveis ao calor durante a estocagem refrigerada do leite *in natura* (HOLDSWORTH, 1992).

A formação de sedimento no processamento térmico é bastante dependente do pH, aumentando consideravelmente quando está abaixo de 6,6 e com a severidade do processo. Em geral, mais sedimentos são formados em processos de aquecimento direto do que indireto (HOLDSWORTH, 1992).

Fox e McSweeney (1998) afirmam que a estabilidade do leite UHT é limitada pela gelificação das proteínas ou por desenvolvimento de sabor amargo, ambos devido à proteólise causada por proteases produzidas pelos psicrotóxicos durante a estocagem refrigerada do leite *in natura*.

Um dos mecanismos da gelificação do leite UHT é a degradação proteolítica da caseína, que torna as micelas sensíveis à agregação. O

armazenamento refrigerado do leite cru agrava o problema, pelo desenvolvimento de psicotróficos (BIZARI et al, 2003).

Defeitos de sabor no leite

O sabor é a propriedade que mais limita a aceitabilidade do leite UHT. A característica dominante do leite UHT recém processado é o sabor cozido. As taxas de alteração do sabor são influenciadas por muitas variáveis, incluindo as propriedades do leite, intensidade do tratamento térmico, tipo de equipamento utilizado no processamento, embalagem, concentração de oxigênio, tempo e temperatura de estocagem (DUNKLEY e STEVENSON, 1987).

Uma correta identificação dos defeitos de sabor é um dos maiores problemas enfrentados por aqueles que trabalham com avaliação de sabor. Com o objetivo de facilitar a identificação dos defeitos de sabor, o comitê da *American Dairy Science Association* (ADSA) apresentou uma nomenclatura para sabor com sete categorias de defeitos em leite, baseadas em termos associativos ou relacionados às causas dos mesmos, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5- Categorias de defeitos de sabor do leite.

Categoria	Termos Associativos ou Descritivos
Aquecido	Aquecido, caramelizado, queimado;
Induzido pela luz	Luz, luz solar, ativado;
Lipolizado	Ranço, butírico, amargo*, caprílico;
Microbiano	Ácido, amargo*, frutado, maltado, pútrido, sujo;
Oxidado	Papel, papelão, metálico, oleoso, peixe;
Transmitido	Silagem, erva, vaca, curral;
Miscelânea	Absorvido, adstringente, amargo*, giz, químico, aguado, estranho, sem frescor, salgado.

* O gosto amargo pode ter várias causas diferentes. Se a causa específica não é conhecida, ele deverá ser classificado como miscelânea.

Fonte: Shipe *et al.* (1979).

A descrição dos defeitos de sabor adstringente, amargo, curral, aquecido, cozido, vaca, estranho, aguado, alimento, alho/cebola, sem frescor, maltado, oxidado pela luz, oxidado por metal, lipolizado ou ranço, salgado e sujo, são frequentemente encontradas no julgamento de leite comercial, sendo que algumas amostras podem apresentar mais de um defeito de sabor (AIRES, 2002; BODYFELT et al., 1988; SHIPE et al., 1979).

Quando o leite é aquecido acima de 70°C, as proteínas do soro são desnaturadas produzindo grupos sulfídricos, que na presença de oxigênio são oxidados ao sulfeto de hidrogênio (HOLDSWORTH, 1992). Segundo Dunkley e Stevenson (1987), o surgimento do sabor, descrito como aquecido ou cozido, é mais intenso imediatamente após o processamento e tende a desaparecer após poucos dias. Em temperaturas de processamento superiores a 100°C, o sabor “cozido” torna-se aparente, causado particularmente por sulfeto de hidrogênio, que é formado pela degradação térmica da β -lactoglobulina e das proteínas da membrana dos glóbulos de gordura. O sabor que ocorre quando o leite é aquecido acima de 90°C é descrito como sabor esterilizado, supostamente devido às reações de Maillard, ocorrendo a formação de coloração (HOLDSWORTH, 1992).

O processamento UHT resulta em sabor típico causado por cetonas, lactonas e compostos sulfúricos. Os lipídios do leite são a fonte mais importante do sabor UHT. O leite submetido ao tratamento térmico mais intenso apresenta sabor “caramelizado”, resultante das reações de caramelização e Maillard (DUNKLEY e STEVENSON, 1987).

Um interessante efeito colateral do aquecimento é a formação de lactulose, cuja quantidade é diretamente proporcional à intensidade do tratamento térmico. A aceitabilidade do sabor do leite processado está correlacionada inversamente com a quantidade de lactulose produzida (HOLDSWORTH, 1992). A origem dos sabores de ranço e amargo durante a estocagem do leite UHT está relacionada à presença de enzimas termo-resistentes como as proteases e lipases (DUNKLEY e STEVENSON, 1987).

Alguns sabores indesejáveis (*off-flavors*) no leite são desenvolvidos a partir da auto-oxidação de lipídios insaturados e pela oxidação, induzida pela radiação

da metionina, formando o metionaldeído. A oxidação de lipídios insaturados produz uma diversidade de aldeídos e cetonas que contribuem para a produção de *off-flavors*. Tanto os lipídios saturados quanto os insaturados podem ser oxidados na presença de oxigênio. Sob condições normais de processamento na indústria de laticínios, os lipídios saturados são considerados estáveis. A oxidação de lipídios insaturados ocorre, no entanto, facilmente. Os lipídios podem ser oxidados como ácidos graxos livres ou como triglicerídios. O primeiro passo desse processo oxidativo é a formação de hidroperóxidos, que são inodoros e insípidos, mas são muito instáveis, decompondo-se rapidamente para formar radicais livres e compostos carbonílicos e carboxílicos como aldeídos, cetonas e ácidos, podendo também ser formados alguns alcoóis. Esses compostos têm um limiar de detecção muito baixo, dando origem ao sabor oxidado (RYSSTAD et al, 1998). Segundo o mesmo autor, o mecanismo de foto-oxidação bem conhecido é a oxidação de metionina em metional, onde a riboflavina atua como foto-sensibilizador, sendo ativada por luz de comprimentos de onda na faixa de 400-500nm. A formação de metional é a principal causa de *off-flavors* no leite induzido pela luz. O metional tem um limiar de detecção de odor muito baixo, originando um forte sabor desagradável. O efeito do *off-flavor* induzido pela radiação é mais pronunciado do que o efeito da oxidação de lipídios insaturados não induzida pela radiação.

3.4- Esterilização das embalagens

Tem como objetivo eliminar ou inativar micro-organismos ou quaisquer matérias estranhas ao sistema, que possam contaminar o produto e promover alterações indesejáveis, sob condições de distribuição e estocagem (PETRUS, 2004).

A esterilização comercial das embalagens, assim como de outros elementos do sistema, depende basicamente de quatro pontos (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998):

- Contaminação inicial dos materiais de embalagens, em termos da concentração e tipo de micro-organismos presentes nas superfícies a serem esterilizadas;
- Dimensões das embalagens, especificamente da área de contato com o alimento;
- Estipulação da PUNE desejada para o sistema;
- Seleção do tratamento de esterilização.

O cálculo envolvido na especificação do tratamento de esterilização, em termos do número de reduções de esporos em materiais de embalagem, foi exemplificado por Fluckiger (1995). Nesse exemplo, foram consideradas embalagens de 1 L com área superficial de 800 cm² e contagem padrão em placas de 80 UFC/embalagem, dos quais 3% eram esporos. A PUNE foi estipulada em uma embalagem defeituosa em 10.000. Com esses dados, foi estimado que a superfície das 10.000 embalagens tivesse uma concentração total de 800.000 micro-organismos ou 24.000 esporos. Conseqüentemente, os tratamentos de esterilização dos sistemas de embalagem com esses parâmetros deveriam promover pelo menos quatro reduções decimais de esporos (4D).

Em geral, a inadequação ou a ausência de um sistema de esterilização de embalagens poderá resultar no aumento da contaminação do produto e, conseqüentemente, redução de sua vida de prateleira (PETRUS e FARIA, 1999). Pesquisas têm comprovado que o grau de esterilização obtido na embalagem depende do nível de contaminação inicial, da área da embalagem e da eficiência do processo de esterilização. Exemplos destes processos incluem os listados na Tabela 6, classificados em físicos e químicos. A combinação entre os diferentes métodos resulta, frequentemente, em uma maior eficiência.

Tabela 6- Métodos aplicados na assepsia de embalagens para alimentos.

Métodos Físicos	Métodos químicos
<u>Processos térmicos</u>	H ₂ O ₂
Vapor saturado	H ₂ O ₂ + ultravioleta
Aquecimento por extrusão	Ácido peracético
<u>Processos por irradiação</u>	Ácido peracético + H ₂ O ₂
Radiação gama	
Radiação ultravioleta	

Fonte: Petrus e Faria (1999).

3.4.1- Contaminação microbiana de embalagens e agentes de sanificação

Vatne e Castberg (1991) e Fredsted et al. (1995) consideram que os materiais de embalagem apresentam baixo número de micro-organismos, levando em consideração os padrões internacionais (*Food and Drug Administration – FDA e International Dairy Federation - IDF*), que preconizam que a contaminação das superfícies que entram em contato com o alimento deverá ser menor que 1 UFC /cm² para contagem de mesófilos.

Em garrafas de polietileno de alta densidade, Chevrotton (1996), recomenda fazer o controle da contaminação inicial para enchimento asséptico, devendo essa ser menor que 20 UFC/garrafa. Petrus et al. (2001) analisando garrafas PET de 500 mL, detectaram níveis de contaminação variando de 19 a 250 UFC/mL.

Vários testes vêm sendo desenvolvidos, para obtenção de uma esterilidade comercial, ou uma descontaminação do material de embalagem imediatamente anterior ao acondicionamento do produto, utilizando métodos químicos, particularmente o ácido peracético e peróxido de hidrogênio como ingredientes ativos na solução esterilizante, e também métodos físicos, através do uso da radiação ultravioleta (FARIA,1999; PETRUS et al., 2000; PETRUS et al., 2001; ABREU e FARIA, 2004; PETRUS, 2004; CARDOSO, 2007; AIRES et al., 2009, WALTER, 2010).

Para Reuter (1988), a eficiência dos sistemas de esterilização é determinada pela redução de 90% das células viáveis, em uma dada temperatura e/ou concentração, sendo este parâmetro denominado tempo de redução decimal, ou valor D. Quanto menor for o valor D, mais eficiente será o processo, e isto pode representar os processos térmicos e químicos.

O *Codex Alimentarius* (1993a) recomenda que os materiais de embalagem devam ser armazenados e manipulados da forma mais limpa e cuidadosa possível, minimizando contaminações e danos. Os materiais que têm a estrutura física alterada pela umidade devem ser armazenados e manipulados em embalagens adequadas ou ambientes controlados. Sujidades ou danos nos materiais de embalagem podem impedir a esterilização e o fechamento adequados das embalagens ou representar um perigo físico e, até mesmo, químico.

O padrão microbiológico da USFDA (2007a) para embalagens de produtos lácteos é a contagem máxima de 50 UFC de bactérias por recipiente, em três de quatro unidades amostradas, utilizando-se o teste de enxágue. Para embalagens com capacidade menor que 100 mL, foi estabelecida contaminação residual máxima de 10 UFC, empregando-se o teste de enxágue, ou 50 UFC/50cm², quando o teste de zaragatoa (*swab*) for aplicado. A tolerância para papeis e cartões empregados na laminação de embalagens compostas deve ser de 250 UFC/g, analisada através do teste de desintegração. Bactérias do grupo coliformes não devem ser detectadas, independentemente do tipo de embalagem.

A microbiota contaminante em superfícies de polietileno em laminados cartonados, logo após a produção do material, foi identificada como de leveduras (10,6%), bolores (20,6%) e bactérias (68,8%), sendo diferenciadas em *Micrococci* (44,4%), *Streptococci* (3,7%); *Pseudomonas* (1,2%); esporos de *Bacillus* (3,1%); bastonetes Gram positivos (6,9%) e bastonetes Gram negativos (9,4%) (VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998).

3.5- Embalagens *Bag-in-box* para alimentos

É definida como uma bolsa plástica flexível, de camada simples ou laminada, com bocal e tampa, acondicionada dentro de uma caixa de papelão, madeira, plástico ou metal, usada principalmente como embalagem institucional para o envase de produtos líquidos e pastosos, bem como os que contêm material particulado, da indústria alimentícia ou química (ANDERSON, 1993; SELKE et al., 2004; PARDI, 2006).

Na concepção de um sistema asséptico, a bolsa plástica apresenta-se com uma das alternativas de embalagens mais vantajosas. Esse tipo de embalagem racionaliza a quantidade de material utilizado, atribuindo-se características de economia e minimizando impactos ambientais do sistema. As propriedades mecânicas e de barreira desse tipo de embalagem são ajustáveis à qualidade e vida de prateleira especificada para o produto. O sistema de fechamento pode atender adequadamente aos requisitos técnicos de hermeticidade, segurança e funcionalidade (MITCHELL, 1988; ANDERSON, 1993; PARDI, 2006). O sistema de produção da bolsa, tipo *Bag-in-box* (BIB), é relativamente simples e apresenta flexibilidade quanto ao tamanho da embalagem.

A tecnologia de embalagens BIB é amplamente utilizada para o acondicionamento de alimentos de alta e baixa acidez. Embalagens BIB, em sistemas assépticos, estão substituindo rapidamente as técnicas convencionais de envase, armazenamento e distribuição anteriormente realizados somente em embalagens metálicas, como as latas, para produtos de alta acidez como a pasta e o concentrado de tomate, além de alguns sucos. Já a comercialização de produtos de baixa acidez em sistemas BIB vem ganhando espaço no mercado recentemente, pois há uma maior dificuldade no controle das variáveis de processo, sendo que as chances de ocorrerem falhas e prejudicarem a vida de prateleira do produto são muito maiores (ANDERSON, 1993; SELKE et al., 2004).

3.5.1- Desenvolvimento da tecnologia

No final da década de 40 e início da de 50 havia aumento e uso de pasta de tomate e purê de frutas concentrado para fins de processamento. Tais produtos incluíam o *catchup*, molho *barbecue*, néctares de frutas, sucos de frutas e outros, sendo que a maior aplicação ainda era destinada para pasta de tomate. Este produto era envasado em latas de aproximadamente 3,18 kg ou 4,08 kg, em um processamento longo e ineficiente. Inicialmente, o produto era aquecido a 87-96 °C, envasado, fechado e permanecia nesta temperatura durante 2-10 min. Em seguida a lata passava por um sistema de resfriamento rotativo que requeria tempo médio de 60-90 min (MITCHELL, 1988; VON BOCKELMANN, 1991).

Com o interesse em desenvolver a tecnologia de embalagens de alta capacidade por parte das empresas processadoras de alimentos, em 1955, as empresas Rheem Manufacturing Company (indústria de tambores metálicos), Thermovac Company (indústria de equipamentos) e Thornton Canning Company (indústria de pasta de tomate) se uniram com o objetivo de produzirem, de maneira eficiente, pasta de tomate em tambores metálicos de 200 L. Em 1956 uma planta piloto asséptica foi instalada da empresa Thornton Canning Company e alguns tambores foram envasados em 1957 e em 1958 uma planta comercial asséptica para tambores metálicos foi instalada e teve suas operações iniciadas (MITCHELL, 1988; ANDERSON, 1993).

Na década de 60 a Scholle Corporation introduziu o conceito BIB para leite pasteurizado e refrigerado, a fim de substituir as embalagens metálicas, que abasteciam a rede institucional como restaurantes, escolas e hotéis. Na mesma época, estendeu-se a aplicação do sistema para o leite UHT, visando à eliminação da refrigeração. A estrutura dos *bags* era constituída de Saranex/Polietileno/Polietileno - o Saranex (Policloreto de Vinilideno – PVdC) constituía a barreira ao oxigênio e vapor de água. As embalagens possuíam soldas nos quatro lados e uma válvula para dispensar o produto. Além disso, eram pré-esterilizadas com óxido de etileno e submetidas ao enchimento em zona asséptica. O bocal de enchimento da envasadora era esterilizado com vapor

culinário saturado a 121,11 °C por 30 min, sendo a zona asséptica insuflada com ar estéril (MITCHELL, 1988).

De acordo com Orbell (1980), o sistema em questão apresentou resultados tecnológicos satisfatórios: não houve esporulação, o produto apresentou boas características físico-químicas durante a estocagem, entretanto, testes de mercado falharam. No referido período, o público americano não possuía o hábito de consumir leite UHT. Resultados similares foram obtidos posteriormente em testes com leite UHT em embalagens menores, para o consumo em menor volume. Desta forma, o sistema para leite em embalagens BIB foi abandonado.

A partir da década de 70, uma segunda geração de embalagens assépticas, incluindo copos termoformados, bolsas e embalagens BIB continuaram a ampliar as aplicações da tecnologia asséptica. Entretanto, a aplicação da tecnologia para alimentos de baixa acidez era limitada, devido às várias dificuldades encontradas durante o processamento (LEWIS e HEPPELL, 2000).

Por volta da década de 80, houve um grande avanço na utilização do sistema BIB para alimentos de baixa acidez, pois foi proporcionado desenvolvimento maior nos sistemas de envase e fechamento das embalagens de alta capacidade, bem como o desenvolvimento de filmes laminados de alta barreira (MITCHELL, 1988; ANDERSON, 1993; LEWIS e HEPPELL, 2000; PARDI, 2006).

Já nos anos 90, os sistema BIB foi bastante difundido nas indústrias de alimentos pelo mundo, elevando a capacidade de envase em embalagens flexíveis de 2 L para volumes de 1.200 L (ANDERSON, 1993).

Este mercado conta com várias empresas de grande porte como a Goglio SpA, LB Europe, Rapak, Scholle, Smurfit Bag-in-Box, SVD Verpackungen, TESSERAUX Spezialverpackungen, 3M, Dupont, etc, que proporcionam novas tecnologias cada vez mais eficientes.

As embalagens do tipo BIB vêm ganhando espaço em todo o mundo, inclusive no Brasil. A sua maior aplicação no país ainda está voltada para a contenção de grandes volumes, principalmente de sucos e polpas concentradas. No entanto, sua aplicação foi destacada na área de refrigerantes em pontos de

vendas fixos, os do tipo *post-mix*. Recentemente, o seu uso tem ganhado espaço em *bags* de pequeno volume (3 a 5 L) para vinhos. Algumas vinícolas do país já fazem uso do sistema e têm previsão no aumento da produção para este tipo de embalagem. Na Noruega e Austrália, de 30 a 55% do total de vinho consumido são em embalagens BIB (PARDI, 2006).

Em Quebec – Canadá, além da tradicional garrafa de vidro para vinho, as embalagens do tipo BIB têm-se tornado bastante populares e reconhecidas pela maneira mais simplificada de armazenamento, bem como por sua facilidade de transporte (DOYON et al., 2005).

Com o passar dos anos, a tecnologia de sistemas BIB teve uma evolução surpreendente, particularmente para produtos como pasta de tomate e concentrados de frutas. Esta evolução incluiu a esterilização por radiação ionizante gama, anteriormente realizada com óxido de etileno, e o desenvolvimento de novas barreiras que continuam até os dias de hoje (MITCHELL, 1988; DOYON et al., 2005; PARDI, 2006).

3.5.2- Bag-in-box para leite e derivados

As embalagens BIB para o acondicionamento de produtos lácteos já estão bem estabelecidas no mercado europeu, australiano e japonês, especialmente os produtos formulados (ANDERSON, 1993; DUPONT, 2011).

Ainda não é comum a utilização e comercialização deste tipo de embalagem no mercado brasileiro, especificamente embalagens BIB para leite e seus derivados (DUPONT, 2011).

As principais vantagens das embalagens BIB, para o acondicionamento de leite fluido, estão associadas à conveniência no manuseio, na praticidade do sistema de fechamento (válvulas de descarga), bem como na caixa (*box*) que acondiciona o *bag*, permitindo uma maior visualização e uma impressão nos seus painéis, o que agrega maior valor ao produto no ponto de venda (PARDI, 2006; SOUZA, 2008). Duas características comuns do sistema BIB são as possibilidades do uso de uma só embalagem, mais barata, para um volume maior e, o emprego de válvula de descarga controlada, que evita a incorporação de oxigênio no

restante do produto contido na embalagem, pois o *bag* ao invés de deixar entrar o ar ambiente para sair o produto, murcha e não permite a entrada de oxigênio e ar contaminado o que possibilita a manutenção da qualidade e vida de prateleira (ELECSTER, 2007; PEREIRA, 2008; SOUZA, 2008).

No caso específico do leite longa vida, deve-se considerar que a proteção contra a foto-oxidação é fator crítico para a estabilidade do produto (BOSSET et al., 1995). No dimensionamento do sistema, pode-se optar por uma proteção tanto através da embalagem primária, com a incorporação de materiais barreira à radiação visível e ultravioleta na estrutura, quanto da embalagem secundária, com o acondicionamento das embalagens primárias em caixa de papelão (*box*), que além de proteger o produto, disponibiliza uma área para a comunicação, proporcionando um design de maior impacto.

O conceito de se utilizar o sistema BIB asséptico para o transporte refrigerado de leite pasteurizado já vem sendo pesquisado para aumentar a vida de prateleira do produto. Através do envase asséptico após a pasteurização, micro-organismos psicotróficos comumente presentes no ambiente de envase, são impedidos de recontaminar o produto. Mantendo a temperatura menor que 5 °C na distribuição é possível estender a vida de prateleira do leite em até 40 dias (ANDERSON, 1993; DUPONT, 2011).

Uma aplicação bem sucedida para derivados de leite é o *mix* para sorvetes. Trata-se de um preparado de leite, esterilizado e acondicionado em bolsas plásticas de 5-15 L (SOUZA, 2010).

Um novo segmento de mercado surgiu na Austrália e Estados Unidos, com o desenvolvimento de um equipamento dispensador para *milk shake*. A base do produto é envasada assepticamente em bolsas de 10 L que contem um tubo elastômero na tampa. A embalagem é colocada dentro do dispensador, que conta com sistema de refrigeração e agitador para a formulação do produto (ANDERSON, 1993; SOUZA, 2010).

3.5.2.1- Acondicionamento e fechamento

Para o envase asséptico de produtos de baixa acidez como o leite em sistemas BIB, é necessário a utilização de vapor culinário e cloro atomizado. O processo se dá quando a embalagem é acoplada ao equipamento de envase. Através de uma câmara asséptica contida no equipamento, vapor culinário é liberado juntamente com cloro atomizado para que ocorra a esterilização da região externa ao bocal de enchimento da embalagem. É realizada a abertura do bocal da embalagem e o produto é retirado. Ao final, a tampa é recolocada e a embalagem retirada do equipamento. Em alguns casos, é possível realizar um gotejamento de nitrogênio (*puff* de nitrogênio), após o enchimento, na região interna ao bocal, para retirar qualquer resíduo de produto que possa ter ficado nesta região (MITCHELL, 1988; SOUZA, 2010).

Nas etapas de enchimento e fechamento, dois cuidados são determinantes para o bom desempenho da embalagem: prevenir a contaminação da área de selagem e minimizar o ar residual (espaço vazio) no interior da embalagem. Para o enchimento, existem as dosadeiras especialmente desenvolvidas para diversas classes de produto (líquidos, sólidos, pastosos), de modo a minimizar problemas como formação de espuma, respingos, distribuição de sólidos, etc. Esta etapa exige cuidado especial, pois a contaminação da área de fechamento pode comprometer a hermeticidade da embalagem (VON BOCKELMANN, 1976; CETEA, 1988).

3.5.3- Processo de esterilização de embalagens BIB

A escolha do método de esterilização das embalagens deve levar em consideração diferentes requisitos de aplicação (TOLEDO, 1975; REUTER, 1993; FLUCKIGER, 1995; VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; ANSARI e DATTA, 2003; DATTA, 2009), incluindo:

- Destruição dos micro-organismos relevantes para esterilidade comercial do produto no tempo demandado pelo sistema produtivo;

- Compatibilidade com as superfícies dos materiais de embalagem e da máquina de embalagem;
- Estabilidade e controle nas condições de uso;
- Segurança aos operadores e ao ambiente;
- Facilidade de aplicação e remoção da superfície tratada;
- Inocuidade ao consumidor e a qualidade do produto em concentrações residuais;
- Economia e disponibilização no mercado.

Para o sistema BIB destinado aos sistemas assépticos, é recomendada a utilização da esterilização via meios físicos, especificamente o uso de radiação ionizante (gama) (MICTHELL, 1988; VON BOCKELMANN, 1991; ANDERSON, 1993; LEWIS e HEPPELL, 2000; SELKE, 2004; RICHARDSON et al., 2008; MASSAGUER, 2006).

O processo de esterilização por energia ionizante consiste na exposição dos produtos à ação de ondas eletromagnéticas curtas, geradas a partir de fontes seladas de Cobalto 60 ou Césio 137 que, ao encontrarem organismos vivos presentes no produto em tratamento, provocam o rompimento de seus DNAs, levando-os à falência ou à incapacidade de reprodução. Dado o elevado poder de penetração das ondas eletromagnéticas, os organismos vivos podem ser alcançados onde quer que eles estejam, sejam em embalagens lacradas ou em produtos acondicionados das mais variadas maneiras. Essa característica garante a eficácia total do processo (KILLORAN, 1983; RICE, 1989; EMBRARAD, 2011).

No processo, as embalagens devidamente acondicionadas são colocadas dentro de uma câmara de irradiação por meio de um sistema de transporte e são expostas à energia ionizante (gama), que age diretamente na cadeia de DNA dos micro-organismos. A Figura 8 pode ilustrar o funcionamento básico de um irradiador para a esterilização de embalagens (EMBRARAD, 2011).

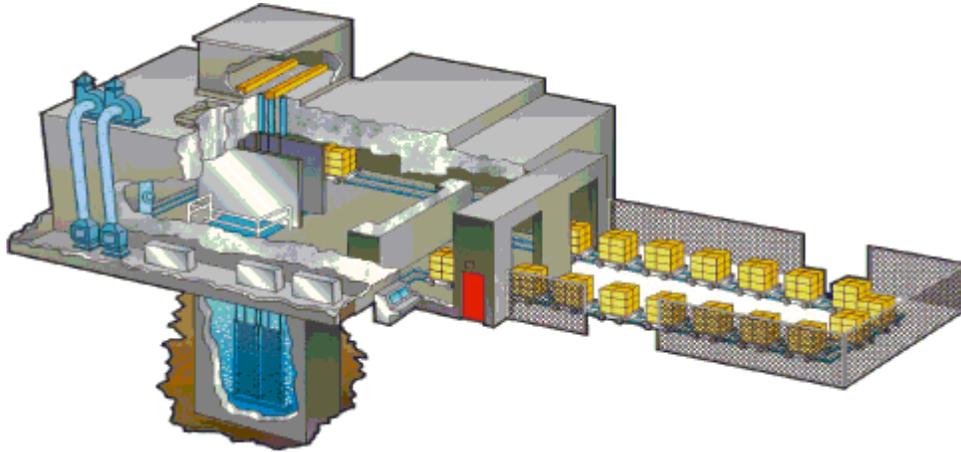


Figura 8- Irradiador de alimentos e embalagens.

Fonte: Embrarad (2011).

A radiação gama é uma onda eletromagnética curta. Os raios gama possuem alta energia e poder de penetração, sendo também chamados de energia ionizante, pois quando atravessam um objeto provocam a ionização dos átomos que o constituem. Esse efeito tem diversas aplicações benéficas como a esterilização e redução da carga microbiana de um produto, ou ainda a modificação estrutural de alguns materiais. É medido por meio da dose aplicada, ou seja, a quantidade de energia absorvida pelo produto. Para cada aplicação existe uma dose recomendada (AGARWAL, 1972; RICE, 1989).

O tratamento via irradiação é considerado como um processo a frio, pois produz, durante a sua aplicação, apenas um ligeiro aumento de temperatura no produto. As doses empregadas para pasteurização (máximo 10 kGy) e esterilização (máxima 60 kGy) não afetam significativamente a maioria dos materiais de embalagem, com exceção dos vidros e materiais celulósicos (FARIA e ESPINOZA-ATENCIA, 1992).

A USFDA regulamenta o uso, bem como a dosagem de radiação aplicada aos alimentos e embalagens. A classificação é realizada segundo o tipo de processo, pasteurização ou esterilização e tipo de material de embalagem (USFDA, 2007). A Tabela 7 mostra os materiais de embalagem aprovados para o uso em processos de irradiação e a dose máxima permitida.

Tabela 7- Materiais de embalagem aprovados pela USFDA para processos de irradiação.

Processo/materiais de embalagem	Doses máximas (kGy)
Pasteurização	
Celofane recoberto com nitrocelulose	10
Papel <i>glasine</i>	10
Cartão parafinado	10
Filme de polipropileno com ou sem aditivos	10
Filme de poliestireno com ou sem aditivos	10
Borracha hidroclorada com ou sem aditivos	10
Filme de policloreto de vinilideno-cloreto de vinila	10
Filme de poliolefina com ou sem aditivos ou recoberto com policloreto de vinilideno	10
Polietileno tereftalato com ou sem aditivos ou recoberto com policloreto de vinilideno ou polietileno de baixa densidade	10
Nylon®	10
Celofane com cobertura de PVdC/PVC	10
Esterilização	
Polietileno com ou sem aditivos	60
Polietileno tereftalato	60
Nylon® com ou sem aditivos	60
Cloreto de vinila-acetato de vinila com ou sem aditivos	60
Etileno vinil acetato	80

Fonte: USFDA, 2007.

A *American Bag Manufacturer Association* (ABMA) estabelece como segura as embalagens BIB, destinadas ao envase asséptico, que tenham sido expostas a uma dose mínima de 15 kGy. Indicadores de irradiação devem estar presentes nas embalagens e tem que apresentar a coloração vermelha, o que demonstra, qualitativamente, a efetividade do processo de esterilização as quais foram submetidas (ABMA, 2003).

Para a verificação da efetividade dos processos de esterilização dos sistemas assépticos, é recomendado o uso de micro-organismos teste dependendo de cada tipo de processamento. Para aqueles que fazem uso da radiação ionizante (gama), recomenda-se a utilização de esporos de *Bacillus pumilus* (BERNARD, 1983; MASSAGUER, 2006; NELSON, 2010). A Tabela 8 mostra alguns exemplos de micro-organismos teste para diversos sistemas assépticos.

Tabela 8- Micro-organismos teste para diversos sistemas assépticos.

Meio de esterilização	Micro-organismo
Vapor super aquecido	<i>G. stearothermophilus</i>
Calor seco	<i>G. stearothermophilus</i>
H ₂ O ₂ + calor	<i>B. subtilis</i> A
H ₂ O ₂ + U.V.	<i>B. subtilis</i> A
Calor de formação	<i>G. stearothermophilus</i>
Radiação gama	<i>B. pumilus</i>
Calor úmido	<i>G. stearothermophilus</i>

Fonte: BERNARD, 1983; MASSAGUER, 2006; NELSON, 2010.

3.6- Tecnologia de salas limpas

Devido à crescente preocupação com a contaminação na indústria alimentícia, os processos estão cada vez mais sendo realizados em salas limpas e ambientes controlados. A tecnologia de sala limpa permite atender padrões rigorosamente definidos de pureza do ar, melhorando a qualidade e segurança do alimento (SALAS LIMPAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA, 1999). As vantagens de sua aplicação na indústria alimentícia se traduzem em um controle de processo mais confiável, qualidade constante, aumento na estabilidade do produto, redução no uso de conservadores químicos, processamento mínimo do alimento, entre outras (KLAUS, 2002).

A tecnologia de salas limpas tem encontrado aplicação ampla e diversificada, expandindo-se muito nas últimas décadas e variando seu *design* de

acordo com a função desejada (WHYTE, 1991). Muitas empresas estão utilizando salas limpas pela primeira vez, assim como diversas indústrias estão desenvolvendo seus produtos dentro de rigoroso programa de controle de contaminação.

A exigência por salas limpas pode ser fundamentada em dois segmentos. O primeiro é aquele no qual a presença de partículas microscópicas inanimadas é um problema, podendo impedir o funcionamento de um produto ou componente eletrônico ou ainda reduzir sua vida de prateleira. O segundo segmento, de maior interesse na indústria de alimentos, requer a ausência de partículas carreadoras de micro-organismos, cujo desenvolvimento no produto pode ter consequências indesejáveis do ponto de vista de qualidade e segurança alimentar (WHYTE, 1991).

Portanto, o objetivo básico de uma sala limpa é reduzir a contaminação do ambiente, seja ela de natureza física, química ou microbiológica, através de uma tecnologia que combina filtragem do ar, controle de parâmetros ambientais e utilização de materiais com baixa emissão de partículas (GUILHERME, 2002).

3.6.1- Conceito da tecnologia de salas limpas

A tecnologia de salas limpas é uma alternativa moderna, embora os seus conceitos já estejam disseminados há muitas décadas. Uma sala limpa é definida como aquela na qual a concentração de partículas no ar é controlada dentro de limites específicos, construída e utilizada de forma a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas no ambiente, onde a temperatura, umidade e pressão devem ser controladas, quando necessário (WHYTE, 1991). Evita-se, neste caso, que materiais particulados ou micro-organismos entrem em contato com o produto, podendo interferir na sua qualidade e até mesmo acarretar problemas de saúde para o consumidor final (SALAS LIMPAS...,1999).

3.6.2- Aplicações nas indústrias de alimentos

Exemplos de aplicações de salas limpas podem ser observados nos setores de microinformática, óptico, biotecnológico, farmacêutico, embalagens especiais, alimentício, hospitalar, eletrônico, automobilístico, entre muitos outros. No setor alimentício, tem sido utilizadas em indústrias de laticínios, bebidas, panificação, processamento de carne e embutidos (KLAUS, 2002).

Na indústria de laticínios a utilização de salas limpas assume importante função no acondicionamento de leite de vida de prateleira estendida, que pode atingir até 90 dias mantido sob refrigeração (FOOD AND DAIRY EXPO, 1983). Na indústria de panificação, o processamento e acondicionamento de pães e bolos com maior tempo de vida de prateleira, prescindindo da adição de conservadores, ocorre em salas limpas; importante também na fabricação de embutidos perecíveis e produtos cárneos como presunto cozido e lingüiça que podem ser fatiados e embalados em filmes plásticos, uma vez que não há nenhum tratamento adicional após a embalagem. Na indústria de bebidas, salas limpas são utilizadas durante o envase a temperatura ambiente de sucos de frutas livres de micro-organismos e, portanto, de alta qualidade, tais como nos sistemas de embalagens assépticas. Na fabricação de embalagens para alimentos sensíveis (*baby food*, nutrientes) e fármacos são requeridos detalhes da tecnologia de salas limpas no processo de bobinas, frascos e demais recipientes. Portanto, essa é uma tecnologia cada vez mais presente no segmento de embalagens, incluindo frascos para remédios, filmes especiais e envase asséptico (PETRUS e FARIA, 2007).

3.6.3- Classificação de salas limpas

A classe de limpeza exigida em uma sala limpa é dependente da atividade nela desenvolvida. Em 1967 foi gerada a definição de ar limpo pelo Federal Standard 209 (FS 209), oficialmente cancelado em 2001 e substituído pela norma ISO 14644. A essência daquela norma foi classificar o grau de limpeza do ar, tomando como base as partículas com tamanho de 0,5 μm . Assim sendo, quando uma determinada sala era Classe 10 000, a quantidade de partículas > 0,5 μm por

pé cúbico de ar era igual ou inferior a 10.000. Visando um melhor esclarecimento a Tabela 9 apresenta as classificações comparativas propostas pela ISO 14644-1 e pelo FS 209E.

Tabela 9- Classificação comparativa para salas limpas e ambientes controlados.

CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE PARTÍCULAS EM SUSPENSÃO NO AR							
ISO 14644-1			FEDERAL STANDARD 209 E				
Classe de Limpeza	$\geq 0,5\mu\text{m} / \text{m}^3$	$\geq 5,0\mu\text{m} / \text{m}^3$	Classe de Limpeza	$\geq 0,5\mu\text{m} / \text{m}^3$	$\geq 5,0\mu\text{m} / \text{m}^3$	$\geq 0,5\mu\text{m} / \text{pé}^3$	$\geq 5,0\mu\text{m} / \text{pé}^3$
ISO classe 1	-	-	-	-	-	-	-
ISO classe 2	4	-	-	-	-	-	-
ISO classe 3	35	-	Classe 1	35	-	1	-
ISO classe 4	352	-	Classe 10	353	-	10	-
ISO classe 5	3.520	29	Classe 100	3.530	-	100	-
ISO classe 6	35.200	293	Classe 1.000	35.300	247	1.000	7
ISO classe 7	352.000	2.930	Classe 10.000	353.000	2.470	10.000	70
ISO classe 8	3.520.000	29.300	Classe 100.000	3.530.000	24.700	100.000	700
ISO classe 9	35.200.000	293.000	-				

Fonte: adaptado de Bennett (2002).

A Tabela 10 mostra que uma sala limpa antes denominada Classe 10.000 pela FS 209E, recebe atualmente a designação ISO classe 7. Para as classes ISO 1, ISO 2 e ISO 9 não havia correspondentes na FS 209E. Observa-se ainda que o número máximo de partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ permitido pela classe de limpeza da norma ISO é menor que o estabelecido pela classe equivalente 209E. Já para partículas $\geq 5,0 \mu\text{m}/\text{m}^3$, o limite da classe estabelecida pelo ISO é maior que o limite da classe equivalente 209E.

De acordo com uma classificação proposta pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), salas limpas ou ambientes microbiologicamente controlados ISO classe 5, classe 7 e classe 8, devem apresentar no máximo 3,5;

17,7 e 88,3 micro-organismos por metro cúbico de ar, respectivamente (SVEUM et al, 1992).

As indústrias alimentícias que operam em sistemas assépticos e ultra-limpos, normalmente, utilizam ambientes ISO classe 7 e classe 8 (PFLUG, 1997; VON BOCKELMANN e VON BOCKELMANN, 1998; SCHNEIDER, 2002; PETRUS e FARIA, 2007). Existem ainda configurações onde a sala de acondicionamento é ISO 7 e o ponto de enchimento ou manipulação asséptica recebe a classificação ISO 5, configuração também denominada “ilha”, proporcionando flexibilidade do *lay out*, custos de investimentos e operacionais relativamente baixos (MOIA, 2001).

3.6.4- Características das salas limpas

Uma sala limpa deve ter o ar recirculado e renovado, recomendando-se, no mínimo, 10 trocas de ar por hora, podendo atingir valores superiores a 150, dependendo de sua classificação (WHYTE, 1991).

Os filtros em áreas limpas apresentam uma eficiência, normalmente, superior a 99,97% na remoção de partículas maiores que 0,5 μm . Esses dispositivos são conhecidos como filtros de partículas de ar de alta eficiência (HEPA), embora os filtros de partículas de ar ultra reduzidas (ULPA), que têm uma eficiência ainda superior, sejam utilizados em indústrias de microeletrônica. Os filtros de alta eficiência usados em salas limpas são instalados no ponto de insuflamento de ar dentro da sala, ou seja, de forma terminal.

Para garantir que o ar sujo das áreas adjacentes não acesse a sala limpa, esta é positivamente pressurizada, contribuindo para a manutenção de sua limpeza. Normalmente, pressões em salas limpas são positivas relativamente às áreas vizinhas, recomendando-se uma pressão de 12 Pa ou 1,2 milímetros de coluna d'água (mmca) para o espaço limpo em relação às áreas não classificadas (SCHNEIDER, 2002). As salas limpas devem possuir um sistema de regulagem de ar que garanta o ajuste das pressões ambientais entre as salas; ou seja, uma sala mais limpa que a outra deverá ter uma pressão de ar superior a de menor limpeza de no mínimo 1,2 mmca. Esse sistema é conhecido e chamado de efeito

“cascata”, onde uma sala mais limpa classificada despeja seu ar, através da pressão, para a sala de classe menos limpa, como ilustra a Figura 10 (ABS, snt).

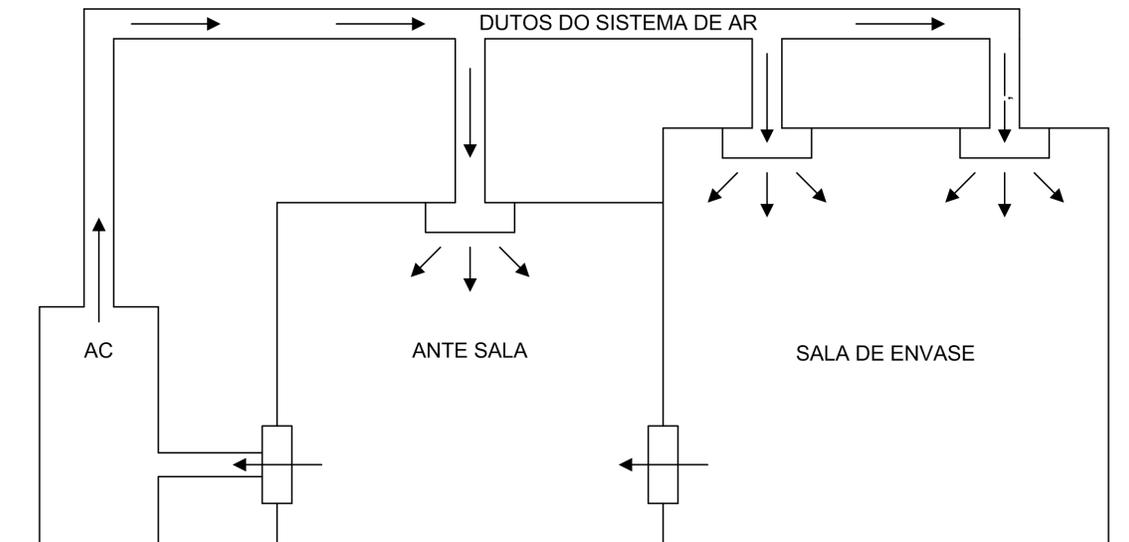


Figura 9- Efeito “cascata” de pressões em salas limpas.

Fonte: Petrus e Faria, 2007.

Como mostra a Figura 9, o sistema de ar condicionado gera uma situação de recirculação de ar pelas salas limpas do mesmo sistema, mantendo as classes de limpeza. Tem-se então a sala ISO classe 7 (mais limpa) com uma pressão de 2,4 mmca em relação ao meio externo e a sala classe 8 (menos limpa) com uma pressão de 1,2 mmca em relação ao meio externo e 1,2 mmca de pressão inferior à sala classe 7 (PETRUS e FARIA, 2007).

3.6.5- Operadores em salas limpas

Para circular e desenvolver seus trabalhos em uma sala limpa, operadores devem ser muito bem treinados. Isso garante a segurança do processo, do produto e dos próprios operadores. Os treinamentos para esse fim incluem: procedimentos relativos à roupa de proteção e higiene pessoal, sobre fontes de contaminação, transporte, deposição e retenção, comportamento adequado, equipamentos de segurança e materiais, procedimentos de limpeza e protocolos (JÖNCK, 2001).

O que se observa é que a sala limpa exige dos operadores um alto nível de conhecimento, e em consequência, extenso treinamento. O treinamento é importante, mas se as pessoas não compreendem a razão de determinados procedimentos os resultados podem ser insatisfatórios. O treinamento está baseado em Boas Práticas de Fabricação (BPF), que fornecem as diretrizes para o funcionamento de salas limpas, embora normas específicas também sejam aplicadas. Entre elas a obrigatoriedade do treinamento.

O ser humano é um grande veículo de contaminação e, nesse sentido, as atitudes apropriadas das pessoas envolvidas afastam boa parte do perigo. Portanto, as regras básicas de higiene pessoal devem ser rigorosamente observadas. No atual estágio tecnológico, o treinamento já não é considerado como custo, mas como investimento, consideração que se aplica plenamente às exigências da sala limpa, que tem no treinamento e conhecimento fatores fundamentais (PETRUS, 2004).

3.7- Qualificação e validação de sistemas assépticos

A qualificação e validação de sistema (QVS) visam comprovar formalmente que um sistema pode funcionar conforme especificações e apresentar uma capacidade de produzir de forma consistente e confiável o produto final com a qualidade especificada. O conceito da QVS não é novo, a sua aplicação tornou-se consagrado quando a indústria passou a ser inquirida a fornecer evidências documentais da adequação de suas práticas. As indústrias aeronáutica, bélica e farmacêutica foram as precursoras a adotarem a comprovação documental do funcionamento de seus sistemas. Na indústria de alimentos, esses procedimentos foram inicialmente empregados no processamento térmico de alimentos enlatados de baixa acidez. Desde então, esta prática vem sendo amplamente recomendada em sistemas de segurança e qualidade de alimentos, particularmente na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

A QVS deve estabelecer e prover evidências documentais de que as instalações, os equipamentos, os instrumentos, os serviços de suporte e os procedimentos operacionais atendem aos seguintes requisitos: serem projetados

conforme as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e as especificações assépticas (qualificação de projeto ou de *design*); construídos e instalados ou implantados, segundo a qualificação de projeto (qualificação de instalação); funcionarem de acordo com a qualificação de projeto (qualificação de operação); consistentemente produzirem produtos num nível de desempenho pré-determinado (validação de sistema) (PHARMACEUTICAL INSPECTION CONVENTION; PHARMACEUTICAL INSPECTION CO-OPERATION SCHEME, 2004ab).

A filosofia básica da validação pressupõe que se o sistema funciona nas mesmas condições, ou outras que sejam mais brandas, do que aquelas simuladas, e que sua capacidade seja similar ou superior à estimada inicialmente. Consequentemente, um produto pode ser considerado comercialmente estéril, sem ter sido analisado. No entanto, o teste desafio é uma representação pontual no tempo e espaço da capacidade de um sistema (ISO 13.408, 1998 apud MUNSON, 2004). Logo, não se pode extrapolar, automaticamente, que um produto de uma linha aprovada tenha sempre o mesmo nível de qualidade microbiológica.

4- MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada com 4 produções experimentais de leite UHT (P1, P2, P3 e P4), utilizando-se a Planta Piloto de Sistemas Assépticos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

4.1- Matéria-prima

Os experimentos foram conduzidos com leite *in natura*, provenientes de produtor de leite cru refrigerado tipo A, denominado Fazenda Atibainha, localizada em Itatiba - SP.

A matéria-prima foi caracterizada quanto ao teor de gordura pelo método butirométrico, sólidos não-gordurosos pelo método gravimétrico, acidez titulável, concentração de íon hidrogênio (pHmetro Digimed modelo DM-20, Digicrom Analítica Ltda., Santo Amaro - SP), estabilidade ao etanol (BRASIL, 2006), contagem padrão em placas (SWANSON et al., 2001), esporos de mesófilos aeróbios (FRANK et al., 1992), esporos de termófilos aeróbios (DENNY; PARKINSON, 2001), contagem de células somáticas pelo método de citometria de fluxo (Somacount 300, Bentley Instruments Inc., Chaska - EUA) e presença de antibióticos inibidores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (SP-NT/SP MINI-NT, DSM food Specialities, Delft - Nova Zelândia).

4.2- Soluções de higienização

A limpeza da linha de processamento foi efetuada com detergente alcalino, marca Avoid BR 55 (Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ), à base de hidróxido de sódio; agentes quelantes e tensoativos não-iônicos; detergente ácido, marca Acid 2100 (Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ), à base de ácido fosfórico e tensoativos não-iônicos. A esterilização da linha foi com o desinfetante da marca Vortexx ES (Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ), contendo ácido peracético, ácido peroctanóico, peróxido de hidrogênio, ácido acético e tensoativos aniônicos.

A higienização do equipamento de envase foi feita com detergente alcalino em pó, marca Det Limp S32 (Farquil Comércio e Indústria Ltda., Piracicaba - SP), e desinfetante à base de hipoclorito de sódio, marca Super Cândida (Indústria Anhembi S.A., Osasco - SP). Enquanto que para a esterilização utilizou-se desinfetante da marca Vortexx ES (Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ).

4.3- Embalagens *Bag-in-Box* (BIB)

As embalagens tipo *Bag-in-box* utilizadas consistiram em bolsas plásticas laminadas flexíveis (Figura 10) confeccionadas com duas camadas de material, sendo a interna de polietileno de baixa densidade (PEBD), com espessura de 103 μm , e a externa de polietileno tereftalato metalizado (PETmet), com espessura de 98 μm (Scholle Ltda, Vinhedo – SP). Essas embalagens apresentavam um sistema de fechamento (bocal e tampa), de dimensões de 38 mm de altura e 42 mm de diâmetro interno. As dimensões das embalagens eram 260 x 285 mm, com gramatura de 160 g/m^2 para o filme PETmet e de 163 g/m^2 para o filme PEBD (total de 323 g/m^2) e volume médio de 2 L. Segundo o fornecedor, esse material é o comumente utilizado como embalagem para o acondicionamento de produtos lácteos esterilizados em outros países.



Figura 10- Embalagem tipo *Bag-in-box* utilizada no experimento.

As embalagens BIB foram esterilizadas com dose mínima de 15 kGy de radiação ionizante (gama), proveniente de uma fonte de Cobalto 60 (CBE Embrarad – Companhia Brasileira de Esterilização, Jarinú, SP). Para serem enviadas ao esterilizador, as embalagens foram agrupadas em lotes de 200 unidades, acondicionadas dentro de um filme de PEBD e em seguida dentro de uma caixa de papelão ondulado. As caixas receberam uma etiqueta com identificação e um selo indicador de efetividade de esterilização.

4.3.1- Caracterização das bolsas

As bolsas BIB foram caracterizadas quanto à espessura, gramatura, dimensões e peso.

A espessura dos filmes foi determinada com micrômetro Mitutoyo Absolute ID-C112B, código 543-250B (Mitutoyo Corp., Utsunomiya-shi - Japão), com sonda

tipo esfera com 3 mm de diâmetro e força de medição menor que 1,5 N, conforme as recomendações da *American Society for Testing and Materials* – ASTM (2008).

A gramatura foi determinada por pesagem em balança analítica Ohaus AR2140 (Ohaus Corp., USA), utilizando-se amostras de 100 cm²

As determinações das dimensões das embalagens foram realizadas com paquímetro digital Mitutoyou 500-143B (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro-SP, Brasil).

O peso total das embalagens, sem o produto, foi determinado em balança semi-analítica QUIMIS Q-520-2000 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema - SP).

4.3.2- Permeabilidade ao oxigênio

A permeabilidade ao oxigênio dos filmes plásticos da embalagem BIB foi determinada pelo método coulométrico em equipamento MOCON OX-TRAN 2/61 MJ (Mocon Inc., Minneapolis - EUA). O equipamento foi equipado com oxigênio analítico (99,99%) como gás permeante (fluxo de 20 cm³/min) e mistura de nitrogênio com hidrogênio (2,0 : 98,0%) como gás de arraste (fluxo de 10 cm³/min), conforme metodologia da ASTM (2005). Os corpos de prova foram obtidos de 6 bolsas plásticas, sendo condicionados à temperatura 23 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de 100% (ambiente saturado com vapor d'água) por um período de 72 h (ASTM, 2007a; 2007b). Os dados foram analisados pelo *software* Mocon Windows Permeation UI (Mocon Inc., Minneapolis – EUA), versão 2.65.

4.3.3- Transmissão da radiação ultravioleta e luz

A transmitância especular dos materiais de embalagem à radiação ultravioleta (UV) e à luz foi determinada em espectrofotômetro Agilent 8453 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn - Alemanha), com conjunto de fotodiodos integrado e sistema computadorizado. A faixa de comprimento de onda avaliada foi de 200 a 800 nm, na velocidade de varredura de 120 nm/min (ASTM, 2007a; 2009a; SARANTÓPOULOS et al., 2002). O equipamento foi

calibrado ao ar, sem corpo-de-prova, para definir a leitura de transmitância de 100% ao longo do espectro UV-visível.

A amostragem foi composta por seis corpos de prova obtidos, de seis embalagens diferentes.

4.3.4- Resistência da termosoldagem

A resistência à tração das soldas das embalagens até a ocorrência de falha (rompimento) foi determinada de acordo com a metodologia ASTM F88 (2009b), em máquina universal de ensaios Instron 3365 (Instron Industrial Products, Grove City – USA), com garras de ação mod. 2710-105, célula de carga estática de 500 kgf e *software* Bluehill 2 ver. 2.21, para o processamento dos dados.

Foram utilizadas 2 amostras de 6 embalagens, totalizando 12 corpos-de-prova para os ensaios.

4.3.5- Teste de emissão de bolhas

A avaliação da integridade da embalagem foi realizada através do exame visual das soldas transversais e longitudinal, bem como pelo ensaio de emissão de bolhas, segundo ASTM E 515-95 (2000), utilizando-se um kit de vácuo/pressão (FARIA, 2005).

4.3.6- Caracterização microbiológica das embalagens

A caracterização microbiológica das embalagens BIB esterilizadas por radiação ionizante foi efetuada pela análise de micro-organismos mesófilos aeróbios (SWANSON et al., 2001), esporos de mesófilos aeróbios (FRANK et al., 1992) e esporos termófilos aeróbios (DENNY; PARKINSON, 2001). A amostragem foi efetuada pela retirada, aleatoriamente, de 12 embalagens BIB de dentro das caixas de papelão ondulado, empregando-se técnicas assépticas para prevenir a recontaminação do material. A manipulação das embalagens foi realizada dentro de cabine de segurança biológica classe II tipo “A1” (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Sociedade Ltda., Campinas - SP), certificada

conforme padrão *International Organization for Standardization* Classe 5 (ISO, 1999).

A avaliação microbiológica foi conduzida através do método de enxágue, com solução salina neutra, conforme recomendações da *American Public Health Association* (EVANCHO et al., 2001a). No procedimento de agitação, cada embalagem era colocada sobre uma bancada e recebia 100 compressões manuais alternadas, durante aproximadamente 30 s. Finalmente, as embalagens eram abertas e as soluções de enxágue submetidas às análises microbiológicas.

Adicionalmente, 6 embalagens BIB que não foram submetidas ao processo de esterilização por radiação ionizante foram avaliadas quanto as suas características microbiológicas. Esta avaliação objetivou verificar as condições sanitárias durante o processo de fabricação das embalagens.

4.3.7- Avaliação da efetividade da radiação ionizante na esterilização das embalagens

Doze embalagens BIB, esterilizadas com radiação ionizante, foram inoculadas com esporos de *Bacillus pumilus* ATCC 14884, da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, Campinas-SP.

O crescimento e manutenção do micro-organismo foram realizados com meio Agar Nutriente (3 g extrato de carne, 5 g peptona, 15 g Agar e 1000 mL de água), através da adaptação da metodologia descrita por Abreu (2001).

A suspensão foi armazenada a 10 °C e para sua utilização, foram feitas a identificação, caracterização e quantificação da carga de esporos (ABREU, 2001).

Foram realizados os seguintes testes para a confirmação da cepa de *B. pumilus*: coloração de Gram; coloração de esporos; catalase, mobilidade; crescimento a 40°C; crescimento em 7% de NaCl; crescimento anaeróbio (VICENT et al., 1990; ABREU, 2001; SHIEH et al., 2009).

Conforme o fluxograma da Figura 11, em fluxo laminar, a suspensão de esporos foi inoculada com uma população inicial em níveis de 10⁸ UFC no interior das embalagens. A inoculação foi realizada com o auxílio de uma micropipeta, pela aplicação de um volume de 100 µL da suspensão de esporos,

correspondendo a um número de 20 gotículas, sobre a área interna da embalagem.

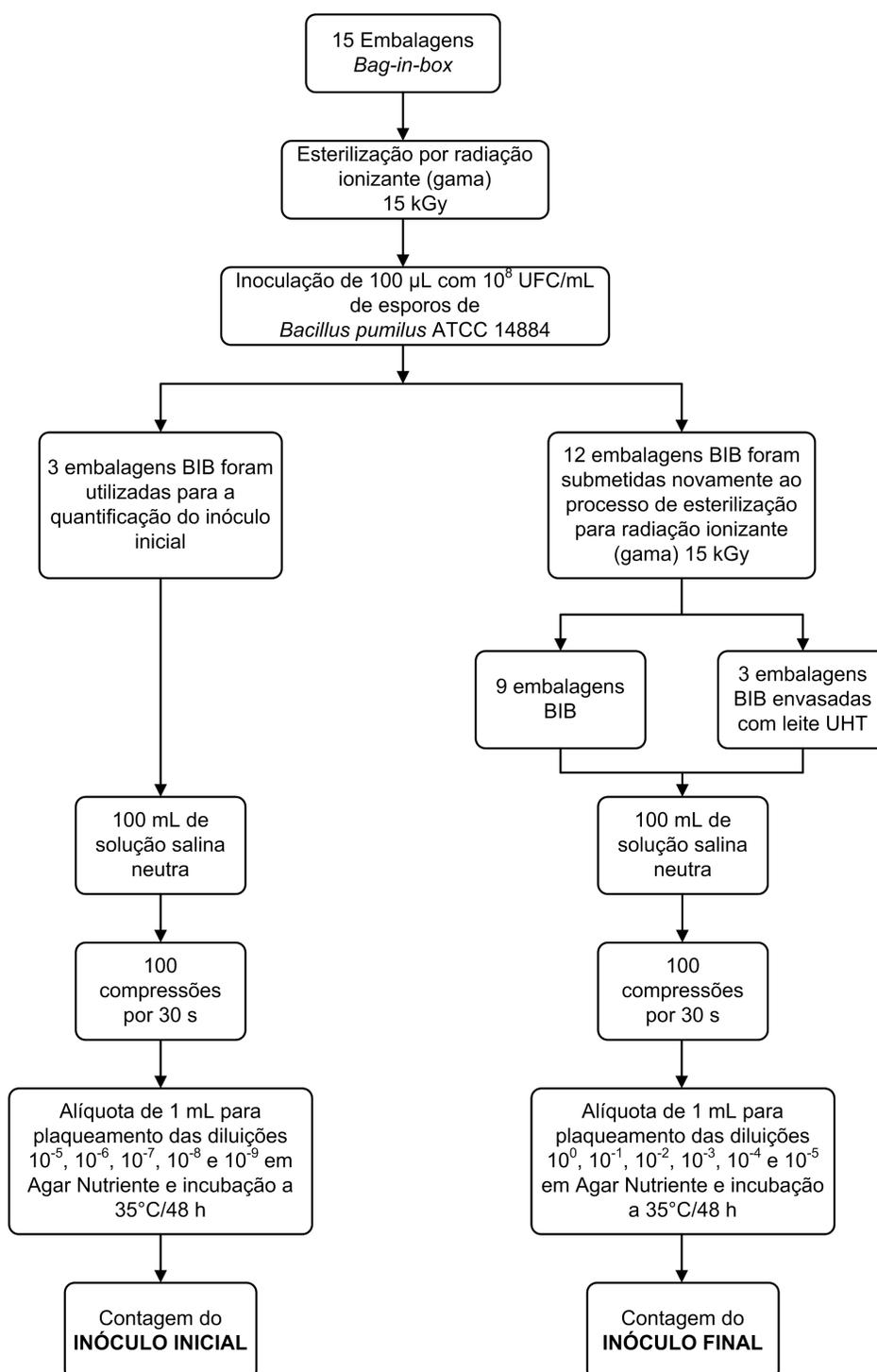


Figura 11- Fluxograma do procedimento para preparo, inoculação e quantificação de esporos de *Bacillus pumilus* inoculados no interior das embalagens BIB.

4.3.7.1- Quantificação inicial do inóculo

Três embalagens foram separadas para quantificação do inóculo inicial, conforme a metodologia ABNT (NBR 14637, 2001). Inicialmente, cada embalagem foi submetida ao procedimento de recuperação dos esporos. Esta operação foi realizada em cabine de segurança biológica classe II tipo “A1” (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Sociedade Ltda., Campinas - SP). A avaliação microbiológica foi conduzida através do método de enxágue, com solução salina neutra, conforme recomendações da *American Public Health Association* – APHA (EVANCHO et al., 2001a). No procedimento de agitação, cada embalagem era colocada sobre uma bancada e recebia 100 compressões manuais alternadas, durante aproximadamente 30 s. As embalagens eram abertas e as soluções de enxágue submetidas às análises microbiológicas.

De cada uma das embalagens, foi retirado uma alíquota de 1mL e preparada as diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , sendo estas posteriormente plaqueadas em superfície, em duplicata, em meio Agar Nutriente (3 g extrato de carne, 5 g peptona, 15 g Agar e 1000 mL de água) e incubadas a 35°C por 48 horas (NBR 14637, 2001). Em seguida, os esporos foram contados e calculou-se o log de UFC/embalagem inicial (N_0).

4.3.7.2- Quantificação do final do inóculo

De cada uma das 9 embalagens submetidas ao processo de esterilização por radiação ionizante, foi retirado uma alíquota de 1mL e preparada as diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , sendo estas posteriormente plaqueadas em superfície, em duplicata, em meio Agar Nutriente padrão (3 g extrato de carne, 5 g peptona, 15 g Agar e 1000 mL de água) e incubadas a 35°C por 48 horas (NBR 14637, 2001). Em seguida, os esporos foram contados e calculou-se o log de UFC/embalagem final (N).

Adicionalmente, 3 embalagens inoculadas com esporos de *B. pumilus* e submetidas ao processo de esterilização por radiação ionizante, foram envasadas

com leite UHT durante um dos processamentos. Foram então incubadas a 35 °C por 48 horas e realizada a quantificação final de esporos.

4.4- Linha de processamento e embalagem

A linha de processamento e embalagem foi montada com os seguintes elementos, em aço inoxidável 304: tanques de matéria-prima (Osmec Industrial Ltda., Campinas - SP); válvulas borboleta; bomba centrífuga (Fabo Bombas e Equipamentos Ltda., Curitiba - PR); homogeneizador de pistão com dois estágios (Alítec Comércio e Indústria Ltda., Pindamonhangaba - SP), trocador de calor a placas (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas - SP) com tubo de retenção, sensor de temperatura tipo termoresistência PT100 e válvula êmbolo de desvio de fluxo (para o tanque de matéria-prima ou para a linha asséptica); manômetros; Sala Limpa ISO Classe 7 (PETRUS, 2004); bomba centrífuga (Fabo Bombas e Equipamentos Ltda., Curitiba - PR); tanque de equilíbrio e uma dosadeira volumétrica desenvolvida por Faria (2005).

Nessa configuração, também foram incorporados uma válvula borboleta no fundo do tanque asséptico e uma válvula agulha, para controle de fluxo de envase. Adicionalmente, existia uma válvula borboleta antes do tanque de produto, para descarte de água ou leite UHT, bem como duas válvulas borboletas entre a bomba e a válvula agulha, para direcionamento de fluxo das soluções de higienização (recirculação pelo tanque asséptico ou via linha de processamento e embalagem). Essa configuração de linha é apresentada pelas fotos das Figuras 12 e Figura 13, e na forma de diagrama (Figura 14).

Tal linha de processamento e sala limpa tem sido utilizada nos processamentos de leite UHT e outros alimentos líquidos (ABREU, 2001; AIRES, 2007; PETRUS e FARIA, 2007; PETRUS et al., 2009).



Figura 12- Linha de processamento UHT do DTA/FEA (1. tanque de matéria-prima; 2. trocador de calor; 3. homogeneizador).



Figura 13- Detalhes do enchimento asséptico dos *bags*, montado na sala limpa da Planta Piloto do DTA/FEA: (1. tanque asséptico; 2. bomba centrífuga; 3. tanque de equilíbrio; 4. dosadeira).

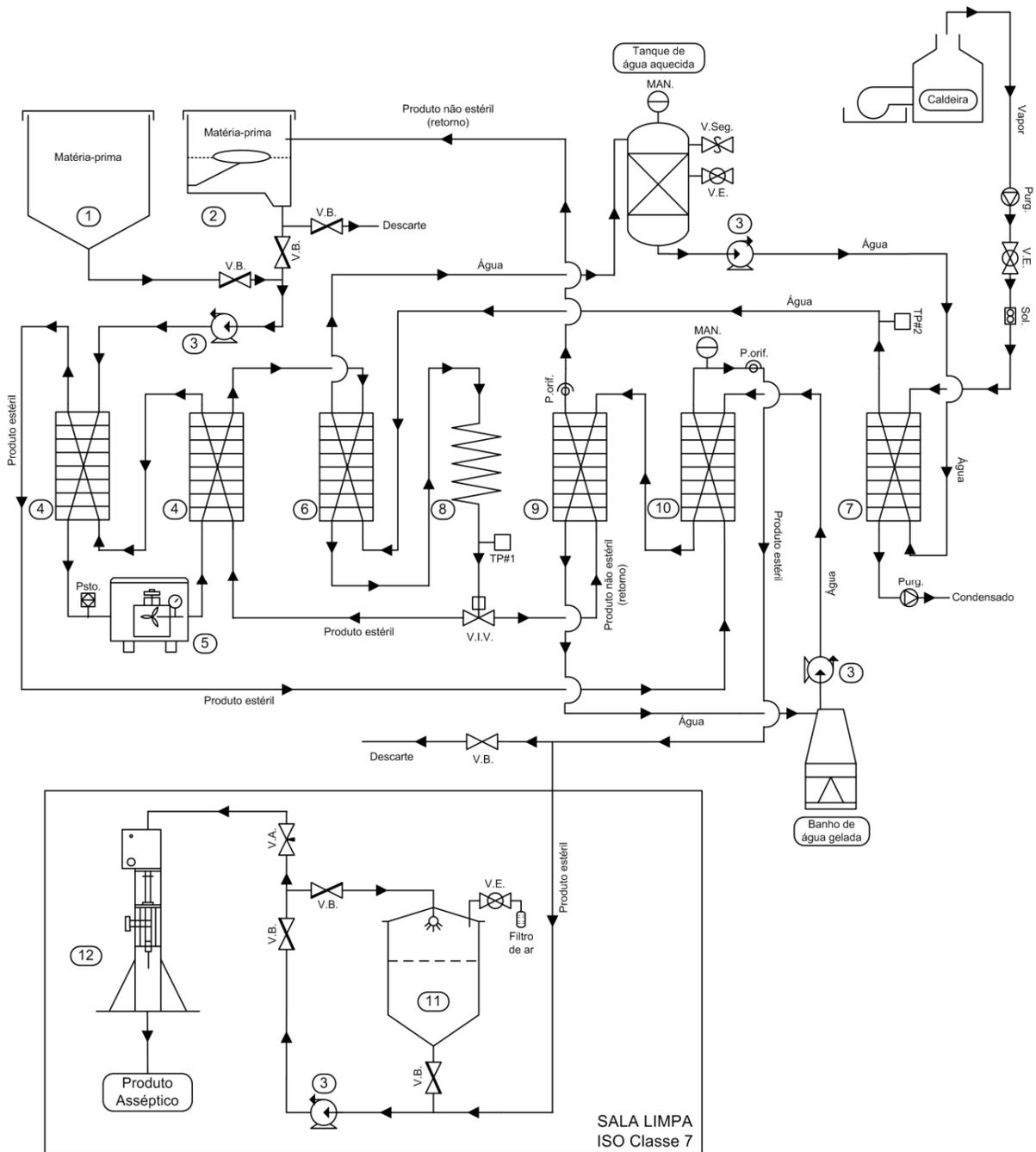


Figura 14- Linha de processamento e embalagem (1. Tanque de matéria-prima; 2. Tanque de equilíbrio; V.B. Válvula borboleta; 3. Bomba centrífuga; 4. Seção de regeneração do trocador de calor; Psto. Pressostato; 5. Homogeneizador; 7. Seção de aquecimento de produto; 6. Seção de aquecimento de água; 8. Tubo de retenção; TP#1. Sensor de temperatura do produto; V.I.V. Válvula de inversão de fluxo; 9. Seções de resfriamento de produto não estéril; 10. Seções de resfriamento de produto estéril; MAN. Manômetro; P.orif.: placa com orifício; 11. Tanque asséptico; V.A. Válvula agulha; 12.

Dosadeira; Purg. Purgador; V.E. Válvula esfera; Sol. Válvula solenóide; V.Seg. Válvula de segurança; TP#2. Sensor de temperatura da água de aquecimento).

O tanque asséptico, com capacidade de 230 L, foi construído em aço inoxidável AISI 304, apresentando corpo cilíndrico, tampa e fundo cônico. O fechamento do tanque era efetuado por meio de um anel de silicone pressionado entre os flanges da tampa e do corpo com presilhas de rosca. A tampa tinha duas entradas, uma no centro, onde foi instalado um *spray ball* de 360° para limpeza e higienização, e outra na lateral, contendo um filtro absoluto com elemento filtrante de polipropileno expandido com poro de 0,22 µm. A alimentação com leite UHT e a sua retirada para a máquina de embalagem era realizada pelo fundo do tanque.

A dosadeira foi construída em aço inoxidável AISI 304, contendo uma válvula agulha controlada por um temporizador e solenóide.

4.5- Área de envase asséptico – Sala Limpa

4.5.1- Descrição da Sala Limpa

A descrição da Sala Limpa, incluindo dados técnicos do sistema de ar, é apresentada a seguir:

Climatização:

O sistema gerador da sala limpa foi composto por uma unidade condicionadora de ar com capacidade de 4,0 TR (toneladas de refrigeração).

Os equipamentos e materiais incluíram: condicionador de ar, caixa de ventilação, rede de dutos com isolamento térmico, bocas para insuflamento e retorno do ar nos ambientes, difusores terminais, *dampers*, tomada de ar externo, caixa de filtragem instalada no duto de insuflamento, dutos flexíveis para interligação dos difusores aos dutos, atenuadores de ruído e luminárias estanques com lâmpadas fluorescentes.

O sistema de filtragem de ar apresentou a seguinte configuração:

- 4 filtros absolutos A3 (457 x 457 x 78 mm) com eficiência de 99,97% para partículas de 0,3 µm, instalados na sala de envase;
- 2 filtros absolutos A3 (305 x 305 x 78 mm) com eficiência de 99,97% para partículas de 0,3 µm, instalados na ante-sala e vestiário;

- 1 pré filtro tipo bolsa F3 (595 x 295 x 600 mm) com 4 bolsas;
- 1 pré filtro tipo encartuchado G3 (595 x 295 x 50 mm).

Depois de filtrado, através do elemento filtrante grosso (G3) e fino tipo bolsa (F3), o ar era desumidificado, resfriado e insuflado no ambiente através de uma rede de dutos embutidos e caixas de insuflamento tipo terminais com filtros absolutos A3. O retorno do ar era realizado através de uma rede de dutos e por grelhas de retorno até o condicionador. Para a sala de envase o retorno do ar era feito através de grelhas localizadas próximo ao nível do piso. O ar exterior de renovação era obtido através de uma veneziana com tela, *dampers* de regulação de vazão e filtro de ar. Para reduzir o nível de ruído admissível na sala, foram instalados atenuadores nos dutos de insuflamento e retorno.

O tipo de regime de insuflamento de ar na área limpa era não-unidirecional com filtros terminais. Um ponto que deve ser devidamente enfatizado é que a escolha dos testes de conformidade e respectivos métodos podem ser afetados pelo tipo de regime de insuflamento de ar adotado para sala limpa, de acordo com a Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC, 1997).

Vazão de ar insuflado:

2.400m³/h.

Taxa de ar externo:

A taxa de ar externo foi adotada de maneira a obter as sobre-pressões na sala de envase, ante-sala e vestiário.

Classificação da sala de envase:

ISO Classe 7, conforme normas ISO 14644-1.

Classificação da ante-sala e vestiário:

ISO Classe 8.

Trocas de ar nominais:

Sala de envase: 45 trocas de ar por hora.

Ante sala e vestiário: 25 trocas de ar por hora.

Sobre pressões nominais:

Sala de envase: + 2,0 mmca.

Ante sala e vestiário: + 1,0 mmca.

Divisórias e forro:

As divisórias e forro foram fabricadas em camadas, compondo-se de placas de poliuretano injetado, revestidas em ambas as faces com chapa de aço e chapa de fórmica, completos com portas, passagem, visores e acabamento em perfis de alumínio arredondados.

Visores:

Os visores foram fabricados em vidro duplo com injeção de nitrogênio entre as lâminas de vidro. Essa injeção retira o ar entre os vidros, eliminando a condensação causada por diferentes temperaturas, conforme citado por Veneranda (2004).

Piso:

O piso da sala de envase, ante-sala e vestiário era do tipo granilite industrial.

Cantos vivos:

Os cantos da sala de envase eram arredondados e finalizados com perfil de alumínio.

4.5.2- Certificação da Sala Limpa

A certificação da área limpa foi realizada antes do início dos processos por uma empresa especializada, abrangendo os seguintes testes:

- Verificação do *lay out* da área quanto às condições de construção civil, materiais empregados, cantos de paredes, piso e teto, luminárias, portas, visores e caixa de passagem (*pass through*);
- Velocidade e vazão do ar nos filtros absolutos terminais;
- Número de movimentações (trocas) de ar na área limpa;
- Gradiente diferencial das pressões entre salas;
- Estanqueidade dos filtros terminais; Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão.

A certificação foi feita um mês antes do início dos processamentos de leite programados para esta pesquisa.

4.5.3- Higienização da Sala Limpa e Dosadora

As paredes, caixa de passagem, portas e teto da sala limpa foram higienizadas e sanitizadas manualmente, com auxílio de vassouras de cerdas macias e detergente alcalino em pó, marca Det Limp S32 (Farquil Comércio e Indústria Ltda., Piracicaba - SP). As calhas foram higienizadas com um pano específico para este fim e com álcool 70% (v/v). O piso foi desinfetado com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,05% (500 ppm) de cloro residual livre (Super Cândida, Indústria Anhembi S.A., Osasco - SP). O sistema de insuflamento e climatização do ar na área limpa foram acionados, aproximadamente, por 12 horas antes de iniciar o processamento e envase do leite, para que entrasse em regime de operação, assegurando a classe de limpeza adequada na sala de envase (PETRUS et al., 2009).

A dosadeira das embalagens BIB foi lavada manualmente com auxílio de detergente alcalino em pó e esponjas específicas para este fim. Foi então desmontada para que as partes que entrariam em contato direto com o leite processado pudessem ser esterilizadas. Tal processo se deu pela imersão destas partes em solução comercial de ácido peroctanóico (Vortexx ES, Ecolab Química Ltda, Rio de Janeiro – RJ) na concentração de 0,3% (v/v) por um período aproximado de 12 horas, dentro da Sala Limpa.

Antes do início de cada processamento, as partes da dosadeira que não foram submetidas ao processo de esterilização por imersão em solução comercial de ácido peroctanóico, bem com a mesa no qual a dosadeira foi colocada, passaram por processo de descontaminação dividido em duas etapas. Primeiramente, com o auxílio de algodão, solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,05% (500 ppm) de cloro residual livre foi aplicada e conseguinte, também com auxílio de algodão, solução de álcool 70% (v/v).

4.5.4- Conformidade das condições operacionais

Os procedimentos adotados para demonstrar a conformidade com os critérios estabelecidos para o desempenho da área limpa foram baseados na Recomendação Normativa para Testes em Áreas Limpas, proposta pela Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC-RN-005-97), norma baseada no documento americano IES-RP-CC-006.2, *Testing Cleanrooms, Institute of Environmental Sciences*.

A verificação das especificações funcionais e expectativas de desempenho da sala limpa foram realizadas através da monitoração da pressão no interior do ambiente, que deve ser constantemente positiva, taxa de movimentação de ar, avaliação de limpeza e sanificação de superfícies, contagem de partículas totais e micro-organismos em suspensão no ar. A temperatura da área limpa foi ajustada em aproximadamente 23°C, de modo a proporcionar conforto térmico aos operadores. Alguns testes foram selecionados e repetidos como parte da rotina de monitoramento da instalação, cobrindo os três estados ocupacionais (área limpa como construída, em repouso e em operação).

A determinação da localização, número e distribuição dos pontos de medição, configurando a malha de amostragem, foi baseada nas classes de limpeza especificadas para a sala de envase, ante-sala e vestiário.

O desenho da área limpa indicando os pontos onde foram efetuados os testes é apresentado na Figura 15.

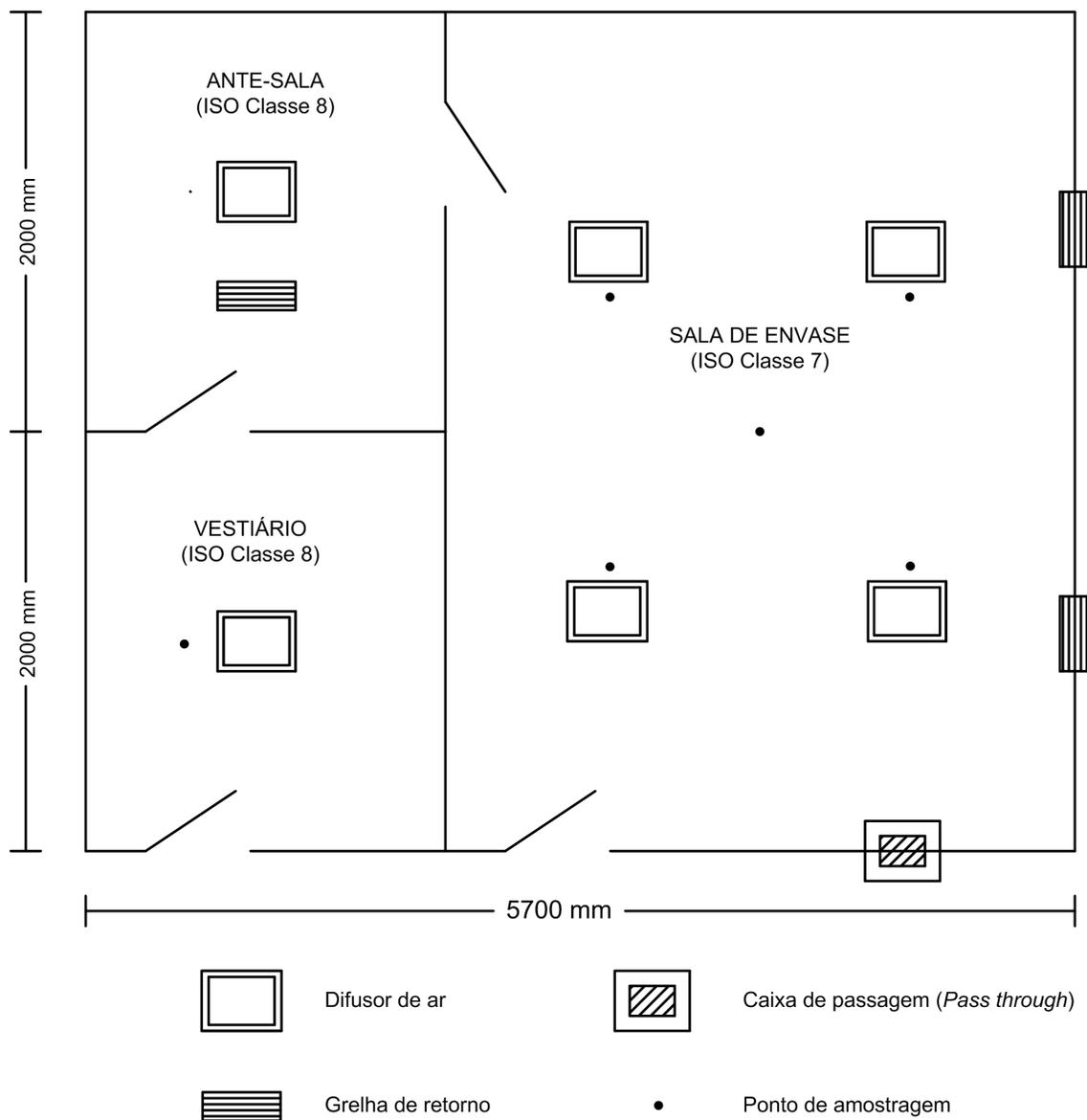


Figura 15- Desenho da Área Limpa utilizada para o envase asséptico de leite.

Fonte: adaptado de Petrus (2004).

4.5.5- Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão no ar

A contagem de partículas totais em suspensão no ar foi realizada com o contador eletrônico de partículas APC BIOTEST® modelo C1299-1020 (Biotest Diagnostics Corp., Denville, USA), com capacidade de discriminação de tamanho para detectar partículas de 0,5 e 5,0 μm , apropriado para verificação das classes de limpeza especificadas.

As contagens de partículas de 0,5 e 5,0 μm foram feitas nos três ambientes da área limpa: sala de envase, ante-sala e vestiário. Na sala de envase cinco pontos foram monitorados, como indicado na Figura 15. Na ante-sala e vestiário apenas o ponto central de cada ambiente foi monitorado (PETRUS et al., 2009).

4.5.6- Movimentação ativa de micro-organismos no ar

Foi realizado o monitoramento de micro-organismos viáveis no ar dentro da sala de envase, da mesma forma adotada no item 4.5.4. A conformidade das condições operacionais nos 5 pontos dentro da sala de envase foram checados a saber: embaixo dos 4 difusores de ar, sendo um deles próximo ao ponto de envase, e no centro da Sala Limpa.

A contagem de micro-organismos foi feita em placas de Petri com meio PCA (Agar Padrão para Contagem) incubadas a 35 $^{\circ}\text{C}$ /48 h e PDA (Agar Batata Dextrose) com incubação a 25 $^{\circ}\text{C}$ /3-5 dias. As placas foram abertas, nos pontos especificados, por um período de 15 min antes e durante os processamentos.

4.5.7- Avaliação de limpeza das superfícies

A avaliação da limpeza das superfícies foi realizada empregando-se o método de *swab* (EVANCHO et al., 2001b).

Foram determinados 3 pontos para amostragem sendo 2 no dispositivo para abertura das embalagens BIB (no suporte de bocal e na manopla de abertura – Anexo IV), e um na mesa de manipulação das embalagens.

Foi verificada, também, a higienização das luvas utilizadas pelos manipuladores dentro da sala de envase. Estes faziam uso de luvas de látex, previamente esterilizadas, e faziam a troca a cada 20 min para garantir o nível de esterilidade do sistema.

As determinações microbiológicas correspondiam à contagem total de micro-organismos aeróbios em meio PCA.

4.6- Higienização da linha de processamento

A limpeza em circuito fechado da linha (*Cleaning in place* – CIP) foi realizada de acordo com as seguintes etapas: pré-enxágue à temperatura ambiente até que a água ficasse límpida; lavagem com solução detergente alcalina na concentração de 2% (p/v) a 95 °C (temperatura no final do tubo de retenção) por 40 min (15 min sem o homogeneizador, recirculando pela seção de retorno do trocador de calor, com fluxo turbulento pela tubulação à velocidade média de pelo menos 0,8 m/s e coeficiente de Reynolds (Re) mínimo de 55.554; 15 min sem o homogeneizador, recirculando pela máquina de embalagem a 0,6 m/s e Re de 41.666, e 10 min pela linha completa a 0,3 m/s e Re de 20.833); enxágue intermediário a 55 °C por 10 min; lavagem com solução detergente ácida, na concentração de 2% (p/v) a 55 °C por 40 min, na mesma sequência do ciclo alcalino, e enxágue final por 20 min a 55 °C. A concentração das soluções detergentes foi monitorada por titulometria e medida de condutividade, conforme recomendações dos fabricantes.

A esterilização em circuito fechado (*Sterilization in place* – SIP) foi efetuada pela recirculação da solução Vortex ES (Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro – RJ), na concentração de 0,3% (v/v) de ácido peracético a 30 °C por 30 min, com fluxo turbulento a 0,2 m/s e Re de 4.901. No tanque asséptico a esterilização foi realizada pela recirculação da solução com auxílio da bomba centrífuga antes da dosadeira. O enxágue da solução esterilizante foi conduzido pela recirculação de água à temperatura ambiente pela seção de retorno do trocador de calor por 5 min, seguido pela recirculação pela linha de envase, quando a temperatura da água no final do tubo de retenção era maior que 140 °C, por um período de 15 min. A concentração da solução de ácido peracético foi monitorada por reflectometria (RQflex plus, Merck KGaA, Darmstadt - Alemanha).

4.7- Monitoramento higiênico do sistema

A esterilidade da linha de processamento e dosadeira antes das produções experimentais foram avaliadas através da análise da água de enxágue

(EVANCHO et al., 2001b). A água de enxágue após esterilização em circuito fechado foi coletada em frascos estéreis de 2 L contendo 20 mL de solução salina neutra adicionada de tiosulfato de sódio 0,5% e 15.000 unidades de catalase esterilizada, empregando-se técnicas assépticas. Essa amostra foi filtrada por meio de membrana de ester de celulose estéril, com poro de 0,22 μm (Millipore Indústria e Comércio Ltda., São Paulo - SP), em cabine de segurança biológica. A membrana foi transferida asepticamente para um frasco contendo leite UHT, previamente aprovados em testes de esterilidade comercial, sendo incubada a 35 $^{\circ}\text{C}$ por 30 dias. Após a incubação, o leite UHT foi submetido às análises sensoriais (aparência e odor) e físico-químicas (pH) e microbiológicas (micro-organismos ácidotolerantes e bolores e leveduras) (DEIBEL; JANTSCHKE, 2001). No Anexo V são apresentadas fotografias da câmara incubadora com amostras de leite UHT em embalagens BIB.

As superfícies da máquina de envase foram avaliadas antes e após a realização das produções experimentais. O monitoramento foi efetuado em seis pontos da dosadeira, dois que tinham contato com o material de embalagem ou o leite UHT (partes externa e interna do bico de enchimento) e quatro sem contato direto (base e topo da dosadeira, suporte do tubo de envase e suporte do êmbolo controlador de fluxo). A avaliação das superfícies foi realizada empregando-se o método de *swab* (EVANCHO et al., 2001b). A Figura 16 aponta os pontos de amostragem no equipamento de envase.



Figura 16- Equipamento de envase das embalagens BIB e pontos de amostragem. (1) base; (2) parte interna do tubo de envase; (3) parte externa do tubo de envase; (4) suporte do tubo de envase; (5) suporte do êmbolo controlador de fluxo e (6) topo.

4.8- Processamento de leite UHT

A produção e estocagem de leite longa vida em embalagens BIB foram realizadas conforme o fluxograma da Figura 17. O processamento foi conduzido em sincronismo com a operação de embalagem.

O leite cru foi adicionado de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0,1% (p/v), homogeneizado à temperatura entre 68 e 72 °C e pressão de 250 kgf/cm² (210 kgf/cm² no primeiro estágio e 40 kgf/cm² no segundo estágio), sendo submetido ao

tratamento térmico a 140 °C por 5 s. Em todos os ensaios a vazão da linha de processamento foi de 260 L/h e a produtividade da dosadeira ajustada para 270 embalagens de 2.000 mL/h (4,6 embalagens/min). A estocagem foi realizada à temperatura ambiente de 25 ± 4 °C.

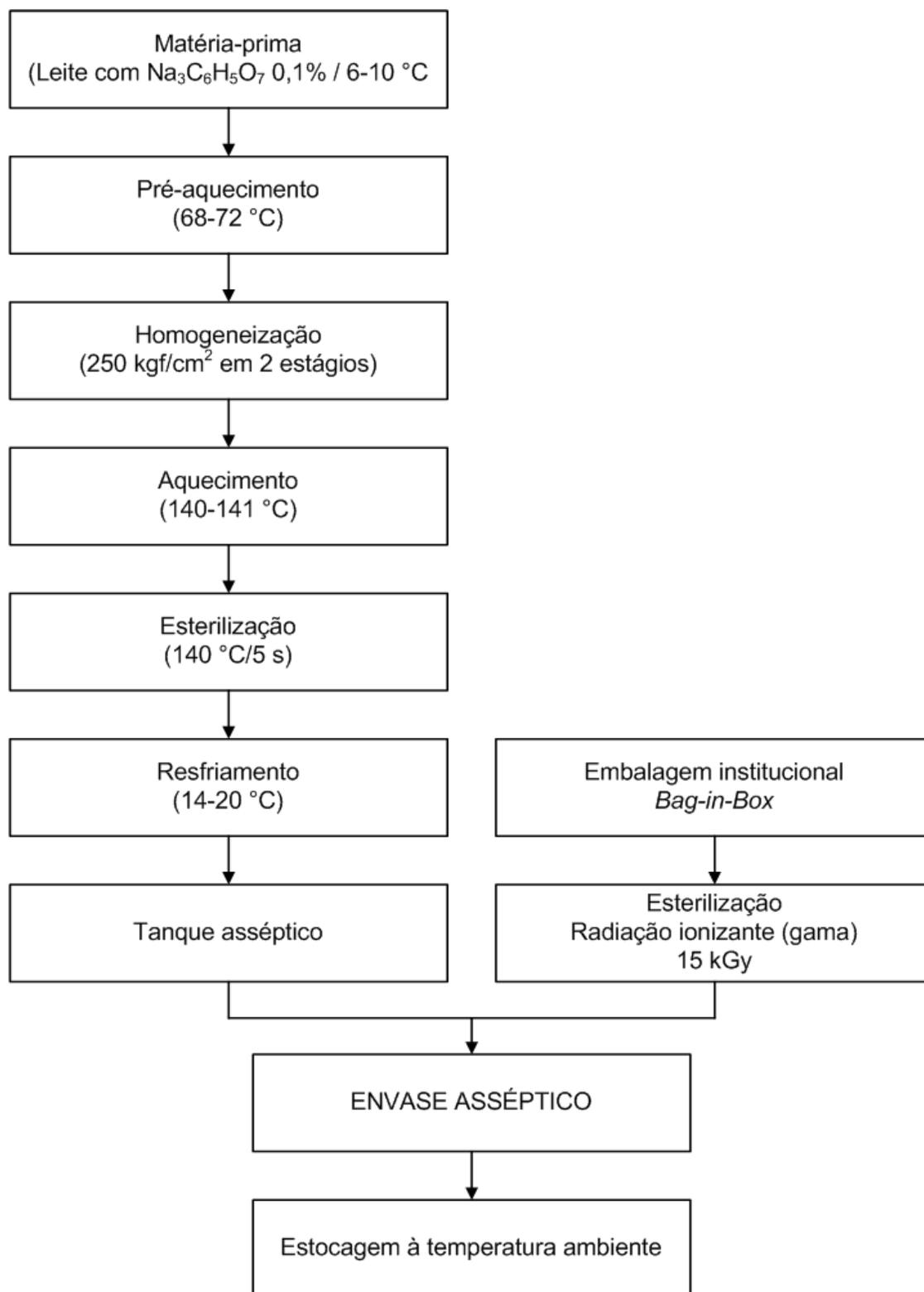


Figura 17- Fluxograma de produção de leite UHT em embalagens BIB. Esterilização do leite realizada a 140 °C por 5 s.

4.9- Teste de integridade das embalagens

A inspeção visual e o teste de compressão manual das embalagens foram realizados durante o envase em intervalos de pelo menos 5 min (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001). Para completar a investigação da hermeticidade das embalagens, foram realizados testes eletroquímicos e de penetração de solução colorida (USFDA, 2001). A preparação das amostras foi conduzida através de um corte lateral da estrutura, em forma de “v”, que possibilitou a avaliação tanto das soldas transversais como longitudinal da região oposta ao bocal de enchimento. Previamente ao teste, as embalagens foram lavadas por imersão em solução detergente alcalina 2% (p/p) com tensoativos por 48 h, marca DET LIMP S32 (Farquill Comércio e Indústria Ltda., Piracicaba - SP).

4.10- Testes de esterilidade comercial

A esterilidade comercial do produto em condições normais de estocagem, não refrigeradas, foi avaliada através da incubação a 35 °C por 30 dias e estocagem por pelo menos 4 meses à temperatura ambiente de 25 ± 4 °C de mínimo 24 amostras de cada ensaio. O leite foi avaliado quanto às suas características sensoriais (aparência e odor), conforme estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1996; 2006), e quanto ao pH, de acordo com padrões recomendados pela APHA (DEIBEL; JANTSCHKE, 2001). Pelo menos 10 amostras foram submetidas às análises microbiológicas (contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis, com exceção de *Bacillus sporothermodurans*) (BRASIL, 1996; 2003) e físico-químicas (acidez titulável, estabilidade ao etanol 68% (v/v)), conforme os padrões legais (BRASIL, 1996; 2006). Adicionalmente, foram efetuadas análises do potencial de oxirredução (Eletrodo ORP, Thermo Scientific Orion, Beverly - EUA), oxigênio dissolvido (Eletrodo Orion 97-08 O₂, Thermo Scientific Orion, Beverly - EUA) e dióxido de carbono dissolvido (Eletrodos Orion 95-02 CO₂, Thermo Scientific Orion, Beverly - EUA) no leite, bem como oxigênio e dióxido de carbono dissolvido no espaço livre

da embalagem (MOCON PAC CHECK modelo 650, Mocon Inc., Minneapolis – EUA).

Os resultados dos testes de esterilidade comercial foram expressos como amostra “alterada” ou “sem alteração”. As amostras eram consideradas sem alteração quando: a embalagem não apresentava modificações na estrutura, como estufamento; a aparência e o odor não diferiam sensivelmente de um leite UHT original, sem incubação; não existia qualquer tipo de impurezas ou elementos estranhos (BRASIL, 1996; DEIBEL; JANTSCHKE, 2001); o pH não sofria uma variação maior que 0,2 unidades em relação ao inicial (DEIBEL e JANTSCHKE, 2001); a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, com exclusão de *B. sporothermodurans*, era menor ou igual a 100 UFC/mL; a acidez não ultrapassava 0,02 g de ácido láctico/100 mL em relação ao original; a estabilidade ao etanol mantinha-se em pelo menos 68% (v/v) (BRASIL, 1996) e o potencial de oxirredução, oxigênio e dióxido de carbono dissolvido no leite e no espaço livre da embalagem não diferiam consideravelmente das amostras não incubadas.

A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis, com exceção de *B. sporothermodurans*, foi determinada pelo plaqueamento em profundidade de 1 mL da amostra e das diluições sucessivas em Agar nutriente isento de extrato de levedura e Agar infusão cérebro-coração (BH) com incubação a 30 ± 1 °C por 72 h. A presença de *B. sporothermodurans* nas amostras resulta num abundante crescimento de colônias lisas, de forma regular, com coloração entre branco e bege, com diâmetro máximo de 3 mm em Agar infusão cérebro-coração.

As colônias presuntivas de *B. sporothermodurans* no Agar infusão cérebro-coração foram identificadas por meio de testes morfológicos e bioquímicos. No Agar nutriente isento de extrato de levedura, *B. sporothermodurans*, comumente, não formam colônias visíveis, porém poderão desenvolver colônias puntiformes, de coloração entre branco e bege (BRASIL, 2003).

Adicionalmente, foi realizado um teste de exposição das embalagens à luz. Este teve por objetivo verificar os efeitos da radiação ultravioleta e da luz sobre a estabilidade do produto. Vinte embalagens compostas somente com filme de PEBD foram utilizadas no envase asséptico de leite. Foram então expostas à luz

com intensidade de 1.920 ± 100 lux por um período diário de 13 h. Essas condições foram estabelecidas por Walter (2010). A intensidade de luz foi medida com luxímetro Extech modelo LX-102 (Extech Instruments Corporation, Waltham - EUA).

A exposição à luz foi efetuada duas semanas após a produção do leite UHT, período necessário para condução dos testes de esterilidade comercial e início das análises sensoriais.

A câmara de luz apresentava superfícies internas brancas com dimensões de 500 x 900 x 800 mm e era iluminada por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Tipo “Luz do dia plus” com bulbo T8, potência 30 W, eficiência luminosa 67 lm/W, temperatura de cor 5.200 K e índice de reprodução de cores 72, Havells Sylvania Brasil Iluminação Ltda., Santo Amaro - SP). A posição das embalagens no interior da câmara era modificada semanalmente, de modo a homogeneizar a exposição à luz.

4.11- Marcha de detecção de contaminantes

O diagnóstico de causas de deterioração de amostras alteradas, durante a incubação no teste de esterilidade comercial, foi efetuado de acordo com as recomendações da APHA (DENNY e PARKINSON, 2001). A diferenciação dos grupos de micro-organismos deterioradores foi efetuada através de exames de cultura aeróbios em Agar dextrose triptose, Agar infusão cérebro coração e Agar nutriente com sulfato de manganês. Esse procedimento de cultura foi fundamentado nas condições aeróbias prevalentes no produto e no espaço livre da embalagem durante a estocagem, estabelecidas pelas características do processamento e pela permeabilidade ao oxigênio dos materiais de embalagem. Características específicas do produto, da embalagem e dos micro-organismos recuperados foram analisadas. As placas foram incubadas a 35 °C e a 55 °C por até 4 dias ou 10 dias, conforme a seqüência na marcha de detecção de contaminantes. A diferenciação de morfologia de culturas vegetativas e formadoras de esporos foi conduzida através de exames microscópicos de coloração de Gram e coloração de esporos com verde de malaquita. As amostras

alteradas também tiveram as embalagens analisadas através dos testes de eletrolíticos e de solução colorida.

4.12- Avaliação sensorial

A análise sensorial foi conduzida com o leite longa vida acondicionado nas embalagens BIB do primeiro e quarto lote de produção (matéria-prima Leite Cru Refrigerado tipo A). A estocagem das amostras foi realizada em condições normais de temperatura com exposição à luz ambiente do laboratório e com exposição à luz artificial na câmara de exposição (item 4.10), duas semanas após a produção experimental. A vida de prateleira dos produtos foi estimada através de testes de aceitação e intenção de consumo, conforme recomendações da ASTM (2005). A aceitação global das amostras foi avaliada utilizando-se uma escala hedônica estruturada mista de 9 pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente). A intenção de consumo dos provadores foi avaliada através do seguinte questionamento: “Você normalmente consumiria este produto?”; com duas alternativas para resposta: sim ou não. A ficha para as análises sensoriais é apresentada no Anexo VI. Os estudos sensoriais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, conforme parecer número 072/2010.

Da relação percentual entre o número de provadores com intenção de consumo pelo número total de provadores foi denominada índice de consumo potencial, variando entre 0 e 100%. O critério estipulado para o final da vida de prateleira das amostras foi a média das notas no teste de aceitação inferior a 6, correspondente ao termo hedônico “gostei ligeiramente”, e um índice de consumo potencial inferior a 60% (PETRUS et al., 2009). As primeiras sessões sensoriais foram realizadas duas semanas após as produções experimentais, período necessário para realização dos testes de esterilidade comercial.

A equipe de provadores foi constituída por 50 pessoas, 38% homens e 62% mulheres com faixa etária entre 16 e 75 anos. A frequência de consumo de leite era diária para 72% dos provadores, 19% pelo menos uma vez por semana e 5% a cada 15 dias. Com relação à escolha do produto pelo tipo de tratamento térmico,

82% dos provadores consumiam leite UHT, 11% leite pasteurizado e 6% ambos os produtos.

As condições dos testes foram estabelecidas conforme as recomendações de Stone e Sidel (1993). As sessões foram conduzidas entre 9:00 h e 11:00 h ou 15:00 h e 17:00 h, sendo realizadas em cabines individuais com ar condicionado a 23 ± 2 °C e iluminadas com lâmpadas fluorescentes “branca fria”. As amostras foram servidas à temperatura de 23 ± 2 °C em copos plásticos de cor branca de 50 mL, codificados com três números aleatórios. Em cada sessão sensorial, foram apresentadas no máximo cinco amostras em blocos completos balanceados em sequência monádica. Os provadores foram orientados a consumir biscoitos tipo água e sal e água mineral entre as degustações, de modo a prevenir o efeito da fadiga sensorial.

Na análise sensorial do primeiro lote experimental, foram introduzidas duas amostras de marcas comerciais distintas de leite longa vida. Os produtos tinham data de produção da mesma semana do lote experimental ou da semana subsequente. Este procedimento teve como objetivo comparar a aceitabilidade da amostra experimental e comercial, apesar das diferenças inerentes à matéria-prima e ao processamento. Uma das amostras comerciais que não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das amostras experimentais quanto à aceitação média, bem como um índice de consumo potencial similar, foi selecionada como amostra controle para ser empregada nos testes subsequentes (ASTM, 2005; PETRUS et al., 2009; WALTER, 2010).

Os dados dos testes de aceitação foram tratados estatisticamente, através da análise de variância, para verificar diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras na mesma sessão de análise e em períodos distintos de estocagem. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa Assistat, versão 7.5 beta (SILVA, 2008), para comparação entre os tratamentos em cada período de análise.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Caracterização da matéria-prima

A caracterização dos lotes de leite cru refrigerado tipo A (L-A) das 4 produções experimentais está apresentada na Tabela 10. O leite estava de acordo com os requisitos mínimos de qualidade fixados para identidade de leite cru refrigerado (BRASIL, 2002). Os lotes de leite cru apresentavam acidez de 0,15 g de ácido láctico/100 mL e estabilidade ao etanol 72% (v/v), de modo a minimizar deposições de proteína no trocador de calor. Desse modo, as características físico-químicas do leite cru eram adequadas aos tratamentos térmicos pelo processo UHT.

Tabela 10- Caracterização do leite cru refrigerado tipo A empregado nos ensaios.

Determinação	Matéria-prima
	Leite A
Gordura (g/100g)	3,6
Sólidos não-gordurosos (g/100g)	8,4
Acidez (g ácido láctico/100mL)	0,15
pH	6,64
Estabilidade ao etanol 74% (v/v)	Estável
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	$4,6 \times 10^4$
Esporos de mesófilos aeróbios (UFC/mL)	$1,8 \times 10^1$
Esporos de termófilos aeróbios (UFC/mL)	$1,4 \times 10^1$
Contagem de células somáticas (CS/mL)	$4,5 \times 10^4$
Resíduo de antibióticos	Negativo

A contagem de esporos estava em conformidade com as especificações de processo térmico. O tratamento com $F_{140\text{ }^\circ\text{C}}$ de 5 s foi projetado para atingir nove reduções decimais de esporos de *Bacillus cereus* ou probabilidade de unidades não estéreis de 1:1.000, considerando-se a produção de leite UHT em embalagens de 1.000 mL a partir de matéria-prima com contagem de esporos de 10^3 UFC/mL e resistência térmica com valor $z = 10,4$ e $10,3\text{ }^\circ\text{C}$ e $D_{140\text{ }^\circ\text{C}} = 0,16$ e $0,36$ s (KESLLER, 1981; PACHECO-SANCHEZ, 2005).

5.2- Embalagens *Bag-in-Box*

5.2.1- Caracterização das embalagens

Os dados de espessura, gramatura, dimensões e peso das embalagens são apresentados na Tabela 11. A especificação adequada e o controle destes parâmetros são considerados importantes ao ajuste das embalagens plásticas flexíveis nas máquinas de envase, bem como para a garantia de qualidade do produto acondicionado.

Tabela 11- Caracterização das embalagens *BIB*.

Filme	Parâmetro			
	Gramatura (g/m ²)	Espessura (µm)	Dimensão Total (mm)	Peso Total (g)
PETmet	160 ¹	98,70 ¹	266,00 x 293,68 ²	54,40 ¹
PEBD	163 ¹	104,25 ¹		
Total	323	202,95		

¹ e ²Valores médios.

²Valores referentes às médias de Comprimento x Altura.

5.2.2- Permeabilidade ao oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) dos filmes de PEBD e PETmet que compõem as embalagens utilizadas nesta pesquisa é apresentada na Tabela 12. Os dados foram comparados com as avaliações realizadas por Petrus (2004) com garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD) pigmentadas com dióxido de titânio (TiO₂) e garrafas de PEAD pigmentadas com TiO₂ adicionadas de uma camada intermediária preta (*carbon black*), e também com os dados de Walter (2010) que utilizou embalagens flexíveis de PEBD e um filme flexível multicamada (LMC). As embalagens utilizadas por Petrus (2004) e Walter (2010) são destinadas ao envase de leite pasteurizado ou UHT. O controle da TPO₂ nas embalagens é essencial para a garantia de uma boa vida de prateleira dos produtos acondicionados, pois é um dos fatores que monitora as propriedades de barreira dos filmes plásticos.

Tabela 12- Taxa de permeabilidade ao oxigênio das embalagens BIB.

	TPO_2^a (cm ³ /m ² .dia)	1
	atm, 23 °C/100% UR	
Embalagem BIB	< 3,7464 x 10 ⁻³	
Garrafa PEAD 500 mL + TiO ₂ ¹	165,15	
Garrafa PEAD 1000 mL + TiO ₂ e camada intermediária preta ¹	125,80	
PEBD ²	16.000	
LMC ²	1,60	

^an = 6.

¹ Petrus (2004);

² Walter (2010).

A estrutura do material plástico empregado na construção das embalagens BIB ofereceu alta barreira ao oxigênio. A embalagem LMC obteve um resultado mais próximo em termos de permeabilidade, porém com um valor 1,6 vezes maior. Já para o filme comum de PEBD de Walter (2010), a barreira ao oxigênio na estrutura utilizada nesta pesquisa foi 16.000 vezes menor.

Foi montado, adicionalmente, um módulo para análise das embalagens BIB. Os tubos, de entrada e coleta do gás de arraste do equipamento, foram dispostos na tampa das embalagens através de um furo de mesmo diâmetro. Durante a análise, verificou-se que a quantidade de oxigênio captada pelo detector era muito superior a sua capacidade de leitura, o que indicou que a interface tampa/bocal das embalagens permitia a entrada de O₂. Doyon et al. (2005) demonstraram que a interface tampa/bocal é responsável pelo ingresso de até 60% do total de O₂ na embalagem BIB durante o processo de transporte. Para efeitos de comparação com o estudo realizado por Doyon et al. (2005), não foi possível determinar a quantidade de O₂ que permeava para o interior das embalagens através da interface tampa/bocal, pois havia o risco de danificar a célula de leitura do equipamento.

5.2.3- Transmissão de radiação ultravioleta e luz

A transmitância especular dos filmes de PEBD e PETmet é apresentada nas Figuras 18 e 19.

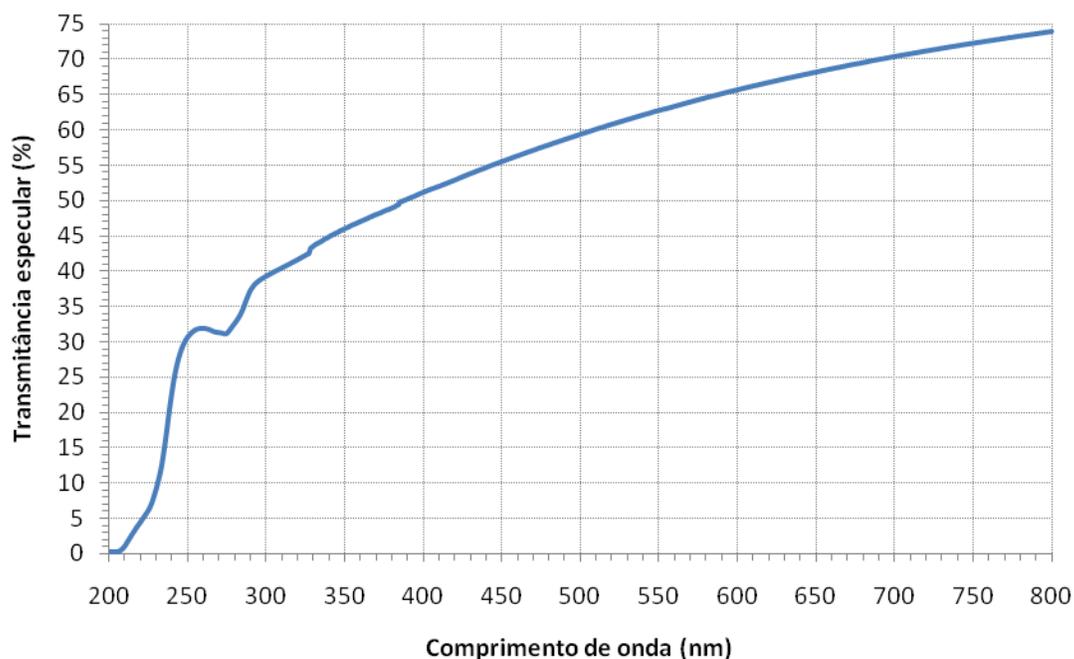
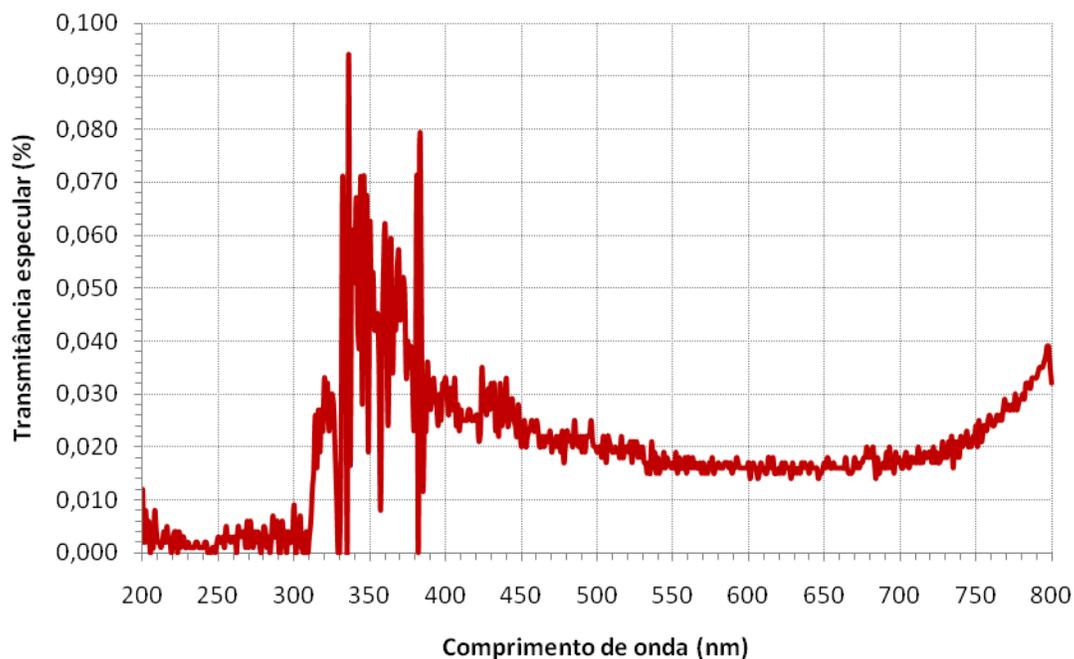


Figura 18- Espectro de transmitância especular do filme de PEBD utilizado para confecção da embalagem BIB.



Fi

gura 19- Espectro de transmitância especular do filme de PETmet utilizado para confecção da embalagem BIB.

Foi calculada, para melhor compreensão, a absorbância do filme de PETmet, pois sua transmitância apresentou valores muito pequenos em escala decimal. É apresentada na Figura 20 a absorbância para este filme.

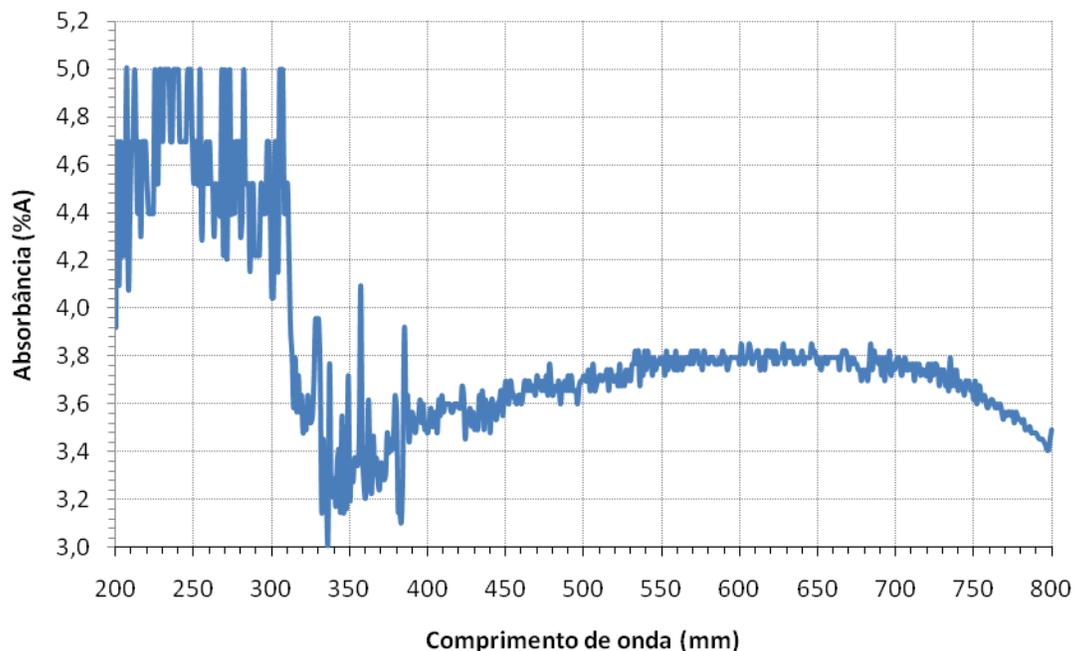


Figura 20- Absorbância do filme de PETmet utilizado para confecção da embalagem BIB.

O filme de PEBD apresentou transmitância especular elevada (~60%) numa faixa de comprimento de onda acima de 520 nm, fora do espectro principal de absorção da riboflavina (200-520 nm) (BOSSET et al., 1995). Já o filme PETmet teve seus valores de transmitância, bem como os de absorbância muito reduzidos.

Mesmo que o filme de PEBD apresente altos valores de transmitância especular, o produto acondicionado nestas embalagens não sofreu alterações em razão da luz e radiação UV, pois como se trata de uma embalagem laminada flexível, o filme externo de PETmet cumpriu a função de proteger o produto contra tais ações oxidativas, fato este discutido no item sobre teste de esterilidade comercial.

Walter (2010) comparando a transmitância especular de filmes de PEBD, pigmentados com dióxido de titânio (1,5%), contra embalagens laminadas cartonadas, garrafas plásticas comerciais e bolsas plásticas, todas destinadas ao envase comercial de leite longa vida, demonstrou que as embalagens comerciais apresentavam boa barreira, em especial as embalagens laminadas cartonadas

comumente conhecidas como “embalagens de caixinha”. Comparando o espectro desta embalagem com o do filme de PETmet obtido nesta pesquisa, foi possível observar que a transmitância especular da embalagem comercial possui valores máximos entre 0,15 e 0,18%, enquanto que a do filme PETmet valores entre 0,080 e 0,095%, demonstrando que este filme apresenta um melhor efeito na proteção do leite contra os efeitos da luz.

As alterações induzidas pela luz em produtos lácteos são principalmente de natureza oxidativa, sendo catalisadas pela riboflavina. Esse composto fotossensível está presente no leite em concentrações médias de 1,75 mg/L (DIMICK, 1982), e devido ao seu sistema de duplas ligações conjugadas, prontamente absorve e transfere a energia luminosa visível, com formação de peróxidos e radicais livres. A decomposição dos peróxidos e as reações subsequentes dos radicais livres com componentes dos alimentos, além de ocasionar alterações sensoriais e perdas de valor nutritivo, podem levar à formação de substâncias potencialmente tóxicas (ARAÚJO, 2004; BRADLEY; MIN, 1992; SKIBSTED, 2000). Como esse processo é iniciado pelas radiações absorvidas, a comparação do espectro em que o produto é exposto com o espectro de absorção dos fotossensores é fundamental na predição das alterações ao longo da estocagem (SATTAR e DEMAN, 1975; SKIBSTED, 2000), possibilitando estabelecer e avaliar os requisitos de proteção dos sistemas de embalagens.

No caso das embalagens laminadas cartonadas, a proteção do alimento contra a foto-oxidação é exercida por uma folha de alumínio, bem como pelo papel cartão e a tinta de impressão. Já para o filme de PETmet, a proteção pode ser atribuída à maior espessura do material de embalagem, bem como a maior espessura de camada de metalização incorporada.

5.2.4- Resistência da termosoldagem

As curvas na Figura 21 demonstram o perfil médio de ruptura das soldas, longitudinais e transversais, respectivamente, submetidas ao teste de tração.

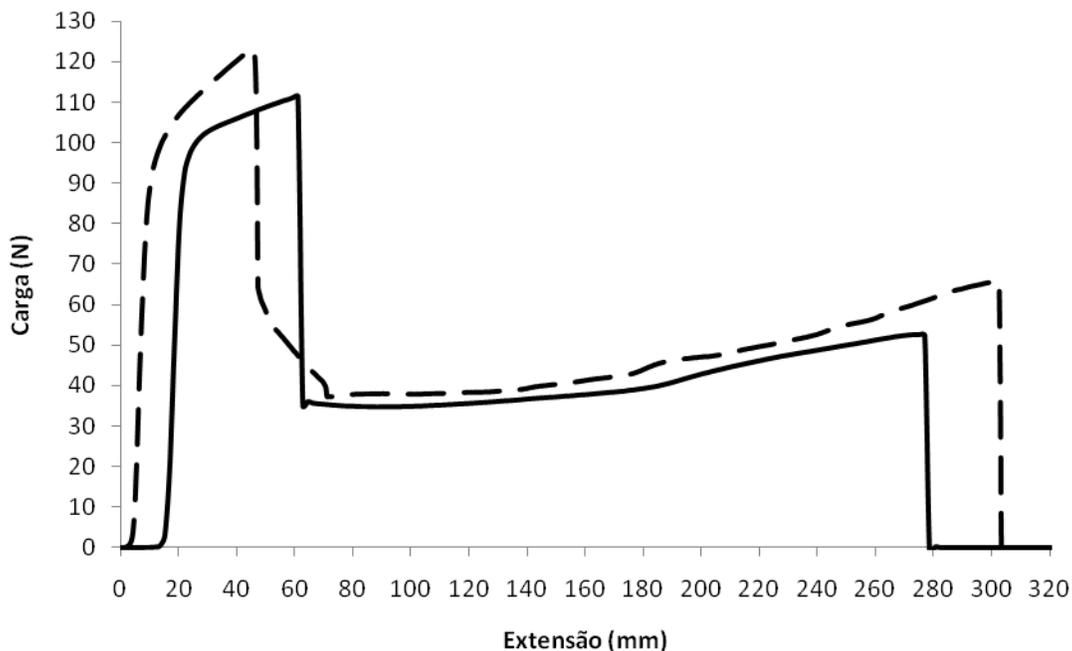


Figura 21- Perfil médio de ruptura das soldas longitudinais durante o teste de tração (--- Transversal e — Longitudinal).

A verificação da resistência à tração das soldas é considerada importante para o ajuste do filme plástico nas máquinas de envase com relação as características da termossoldagem durante o processo de manufatura das embalagens, da resistência mecânica e das propriedades de barreira.

Foram encontrados valores de até 123 N para as soldas transversais e 115 N para as soldas longitudinais. Tais resultados são considerados elevados e, portanto, satisfatórios para o acondicionamento de alimentos líquidos (SARANTOPOULOS, 2002).

Uma importante observação feita durante esta avaliação foi que não aconteceu a ruptura do filme na região de solda, em nenhuma das amostras. Esse fato demonstra que as soldas, mesmo submetidas a força superior a 100 N, apresentaram grande resistência. Isso pode proporcionar maior segurança e praticidade durante as operações de logística e manipulação no ambiente de consumo do produto acondicionado.

Observou-se que houve a formação de dois picos no perfil de ruptura do teste, sendo o primeiro respectivo ao filme PETmet e o segundo ao filme PEBD. Isso ocorreu, pelas diferenças, em termos de resistência mecânica, entre os filmes testados, sendo que o primeiro apresentou menor elasticidade, portanto se rompeu primeiro, e o segundo maior poder de elasticidade tendo a sua ruptura depois de transcorrido maior esforço (SARANTÓPOULOS, 2002).

5.2.5- Teste de emissão de bolhas

Nenhuma das amostras avaliadas apresentou formação de bolhas no teste de vácuo, o que seria indicativo de falhas na termossoldagem (FARIA, 2005). Consequentemente, a fabricação das embalagens foi satisfatória e o processo de esterilização por radiação ionizante não afetou a integridade da termossoldagem.

5.2.6- Caracterização microbiológica das embalagens

Na caracterização microbiológica das embalagens BIB foram analisadas um total de 12 amostras, que foram submetidas ao processo de esterilização por radiação ionizante (gama), divididas entre a enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios, esporos de mesófilos aeróbios e esporos de termófilos aeróbios. Também foram avaliadas 6 embalagens que não foram submetidas ao processo de esterilização, a fim de se verificar as condições higiênicas do processo de fabricação.

Não foram encontrados micro-organismos nas amostras avaliadas. Este resultado demonstra a eficiência do processo de esterilização que as embalagens foram submetidas. Para as embalagens não irradiadas, a ausência de micro-organismos é um importante indicativo da boa qualidade de manufatura destes materiais, bem como da presença efetiva dos procedimentos de BPF e de APPCC. Mesmo diante deste resultado, não se pode concluir que não seria necessário o tratamento de radiação visto que, para todos os sistemas assépticos, é de suma importância que as embalagens passem por um tratamento de descontaminação objetivando, sempre, reduzir o valor de unidades não estéreis

em um lote processado (VON BOCKELMANN, 1991; FARIA e ESPINOZA-ATENCIA, 1992; RICHARDSON et al., 2007; MASSAGUER, 2006).

Esses resultados são indicativos da conformidade microbiana dos materiais de embalagem para o sistema asséptico, bem como para o seu uso na linha de processamento do leite UHT.

5.2.7- Avaliação da efetividade da radiação ionizante

As embalagens submetidas à esterilização por radiação ionizante foram analisadas microbiologicamente e os resultados estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13- Influência do tratamento por radiação ionizante na descontaminação das embalagens BIB, inoculadas com esporos de *B. pumilus*.

Embalagem	N ₀ (10 ⁸ UFC/emb.)	N (UFC/emb.)	Reduções decimais
1	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
2	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
3	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
4	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
5	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
6	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
7	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
8	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8
9	1,7 ¹	c.n.d. ²	> 8

¹ Valor referente à média de 3 embalagens: 1,6, 1,6 e 1,7 x 10⁸ UFC/emb.

² Crescimento não detectado.

Foram obtidos no mínimo 8 reduções decimais no processo de esterilização, comprovando assim a efetividade do método na descontaminação das embalagens. O grau de esterilização depende da quantidade inicial de micro-organismo e da área da embalagem. A USFDA recomenda um total de 5 reduções decimais em embalagens de 1-10 dm², sendo que para o *Clostridium botulinum* são requeridas 10 reduções decimais no material de embalagem. Contudo, este

micro-organismo é considerado menos resistente ao tratamento utilizado (BUCHNER, 1993).

Para uma quantificação pontual de reduções decimais, seria necessária uma cultura de esporos de *B. pumilus* com carga microbiana acima daquela utilizada nesta pesquisa. Portanto, é conveniente expressar o resultado de reduções decimais com o sinal “>”, pois há a possibilidade de se encontrar um valor ainda maior (MASSAGUER, 2006).

No teste adicional realizado com 3 embalagens inoculadas com esporos de *B. pumilus*, submetidas ao processo de esterilização por radiação ionizante, com posterior envase com leite UHT durante um dos processamentos, também não apresentou alteração visual e nem microbiológica. Após o período de incubação a 35 °C por 48 horas e quantificação final de esporos, não foi detectado crescimento em placas. Tais resultados são indicativos da conformidade microbiana dos materiais de embalagem para o sistema asséptico, bem como para o seu uso na linha de processamento do leite UHT. Entretanto, percebe-se que a dose recomendada para a esterilização das embalagens BIB é muito alta e que os resultados demonstram a necessidade de redução do tratamento, considerando os problemas de odores e de oxidação das embalagens plásticas submetidas a esse procedimento.

5.3- Conformidade das condições da Área Limpa

5.3.1- Certificação da Área Limpa

A certificação da Área Limpa foi realizada por uma empresa especializada.

As salas da Área Limpa foram classificadas, em repouso, segundo a norma ISO 14644-1 para partículas de 0,5 µm e 5,0 µm, como ISO Classe 8 para o Vestiário e Anti-sala, e como ISO Classe 7 para a Sala de Envase.

Os resultados da certificação são apresentados no Anexo VII.

5.3.2- Condições operacionais

5.3.2.1- Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão

Os resultados das contagens de partículas totais em suspensão no ar dentro da sala de envase e próximo à máquina de envase, em repouso e em operação, são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Contagem de partículas em suspensão no ar próximo ao ponto de envase na sala limpa.

Estado ocupacional	Processo	Concentração de partículas (unidades/m ³)					
		0,5 µm			5,0 µm		
		Mín	Máx	Méd ¹	Mín	Máx	Méd ¹
Repouso	P1	64	313	183	0	23	13
	P2	71	415	160	0	37	23
	P3	71	462	168	0	43	11
	P4	63	453	153	0	39	23
	P5	60	402	142	0	43	13
Operação	P1	83	1513	530	0	47	21
	P2	80	1602	523	0	53	30
	P3	80	1504	530	0	47	15
	P4	77	1498	537	0	51	40
	P5	76	1466	522	0	43	11

¹ Média entre 12 leituras realizadas a cada 10 min.

A empresa especializada em certificação realizou leitura de partículas com tamanho de 0,3 µm, obtendo valor mínimo de 177, máximo de 1.635 e média de 640 unidades/m³.

Considerando os valores máximos de concentrações de partículas no ar, a área de embalagem foi classificada, de acordo com os padrões da *International Organization for Standardization* (1999), como ISO Classe 7: concentrações máximas de partículas com tamanho maior ou iguais a 0,3 µm de 10.200 unidades/m³, a 0,5 µm de 353.000 unidades/m³ e 5 µm de 2.470 unidades/m³. As concentrações de partículas obtidas nos pontos de coleta pré-determinados estavam próximas aos padrões ISO classe 5: concentrações máximas de partículas com tamanho ≥ 0,3 µm de 1.020 unidades/m³; ≥ 0,5 µm de 3.530 unidades/m³ e ≥ 5 µm de 0 unidade/m³. A sala para o envase demonstrou a conformidade do ambiente para o processamento asséptico de leite UHT

5.3.2.2- Monitoramento ativo de micro-organismos no ar

A Tabela 15 apresenta os resultados do monitoramento ativo de micro-organismos no ar no ponto mais próximo ao bico de envase da dosadora. As contagens obtidas durante o envase de todos os lotes dos 4 processamentos atenderam aos limites definidos pela NASA (ISO, 1999). A reduzida concentração de micro-organismos em suspensão na sala de envase assegurou o alto grau de limpeza do ambiente.

Tabela 15- Contagem padrão em placas de micro-organismos no ar no ponto próximo ao bico de envase da dosadora.

Estado ocupacional	Processo	Contagem total próximo ao ponto de envase (UFC/m ³ de ar) ¹			
		Início	Meio	Fim	Média
Repouso	P1	-	0	-	0
	P2	-	1	-	1
	P3	-	0	-	0
	P4	-	1	-	1
Operação	P1	0	<2	<2	<2
	P2	0	1	3	2
	P3	0	0	0	0
	P4	0	3	<2	<3

¹ Padrão NASA para sala limpa ISO Classe 7 $\leq 17,7$ UFC/m³ de ar.

Segundo a ISO 14644-1, o limite máximo para contagem total de micro-organismos aeróbios presentes em ambientes ISO Classe 7 é < 20 UFC/m³ de ar. Além disso, os testes microbiológicos não detectaram a presença de bolores e leveduras no ar da Sala Limpa em operação.

5.3.2.3- Avaliação de limpeza e sanitização de superfícies

Os testes microbiológicos de micro-organismos aeróbios nos 3 pontos determinados dentro da sala limpa (suporte de bocal e manopla do dispositivo de

abertura e mesa) e nas luvas utilizadas pelos operadores não detectaram crescimento microbiano em meio PCA. Tais resultados são indicativos da conformidade microbiana do ambiente de envase para o processamento asséptico de leite UHT.

5.4- Monitoramento higiênico do sistema

Nas análises da água de enxágue, após a esterilização em circuito fechado (SIP) da linha de produção e embalagem, não foram verificados sinais de atividade microbiana ou detectada a presença de micro-organismos. Walter (2010), utilizando a mesma linha de processamento, com exceção do equipamento de envase, detectou problemas em um dos processamentos com leite UHT. As amostras apresentaram sinais de alteração sensorial e de pH em relação ao controle, bem como presença de micro-organismos mesófilos aeróbios e esporos de mesófilos aeróbios. Como medida corretiva para o sistema, foi realizada limpeza manual do “T” reto para conexão do sensor de temperatura tipo termo resistência PT100, localizado no final do tubo de retenção do trocador de calor. Tal medida foi adotada para todos os processamentos realizados nesta pesquisa.

Também não foi detectado crescimento microbiano na análise das superfícies da dosadora, como descritas no item 4.7 (Monitoramento higiênico do sistema).

5.5- Avaliação da integridade das embalagens

Exceto para uma embalagem do processamento P3, todas as demais não indicaram falhas no fechamento, bem como na integridade das soldas, com base no exame visual, no teste de compressão manual, teste eletrolítico e uso de solução colorida. Foram amostrados pelo menos 8 embalagens de cada processamento para os testes. Tais resultados são indicativos da eficiência das soldas e do fechamento hermético das embalagens, impedindo a recontaminação do produto acondicionado.

A embalagem defeituosa do processamento P3 apresentou falha em uma região de 33 mm na solda transversal superior, próxima à região do bocal. Nesta região não houve fusão das interfaces PEBD/PEBD e, conseqüentemente, não houve a termossoldagem. O problema pode ser justificado por falha ou fadiga das barras de fechamento no momento da produção das embalagens. Pressão ou calor insuficiente pode ter ocasionado a falha e assim produzido uma embalagem defeituosa (ROBERTSON, 1993; SARANTÓPOULOS et. al, 2002).

5.6- Esterilidade comercial do leite UHT

A representação dos resultados dos testes de esterilidade comercial é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16- Taxa de defeitos dos 4 processamentos assépticos de leite UHT.

Parâmetro	Processamento			
	P1	P2	P3	P4
Tamanho do lote	200	171	168	170
Amostras incubadas¹	32	30	24	24
Alterações em amostras incubadas²	0	2	1	1
Taxa de defeitos³ (%)	0	6,67	4,17	4,17

¹ 35 °C por 30 dias.

² Embalagem estufada, leite com alteração sensorial (odor e aparência) e, ou, variação de pH maior que 0,2 unidades.

³ Relação entre amostras com alteração pelas amostras incubadas.

A taxa de defeitos, exceto pelo processamento P2, apresentou resultados baixos indicando o bom funcionamento do sistema asséptico. O maior valor encontrado para o processo P2 pode ser explicado por uma falha ocorrida durante o processamento. Um anel de vedação que compunha a seção estéril do trocador de calor se rompeu (conexão entre a primeira seção de resfriamento e a válvula inversora de fluxo). Para solucionar o problema, foi interrompida a alimentação de

matéria-prima e água foi enviada para o trocador de calor. Essa medida serviu para retirar o resíduo de leite das placas do trocador de calor para que pudesse ser feita a parada emergencial da linha. A troca do anel de vedação foi realizada, em condições assépticas, e o processo pode ser reiniciado. Mesmo com todos os cuidados tomados durante a operação, pode-se atribuir que a taxa de defeitos tenha sido maior em função da manipulação na região estéril do equipamento, logo após o tubo de retenção.

Walter (2010), avaliando a vida de prateleira de leite UHT processado a 145 °C por 10 s obteve, após o teste de esterilidade comercial, taxas de defeito das amostras entre 0,5 e 7,7%. Comparando com os valores obtidos nessa pesquisa, tais resultados são indicativos da possibilidade de adequação do tratamento térmico a 140 °C por 5 s, para laticínios que processam leite com as características microbianas similares a do utilizado nesse trabalho.

A operação da linha de processamento em temperaturas mais elevadas implica no aumento dos custos do trocador de calor, no aumento do consumo de energia, na redução do tempo de operação e alteração sensorial, bem como a adoção de programas de higienização mais complexos. Entretanto, existem relatos da ocorrência de *B. cereus* em leite UHT (VIDAL-MARTINS, ROSSI JR. e REZENDE-LAGO, 2005; REZENDE-LAGO et al., 2007), demandando a aplicação de tratamentos térmicos mais severos, como recomendado por Pacheco-Sanchez (2005).

A Tabela 17 apresenta os resultados das análises feitas no leite UHT das embalagens sem alteração e nas alteradas, após a incubação a 35 °C por 30 dias. Nas 6 amostras de cada processamento submetidas a contagem de microorganismos mesófilos aeróbios viáveis e de *B. sporothermodurans*, não foram detectadas colônias microbianas. Na marcha de detecção de contaminantes das amostras com alterações sensoriais (odor e aparência) e físico-químicas, foi verificada a presença de microbiota mista de células vegetativas em todas as unidades. Esses resultados são indicativos de deteriorações por contaminações microbianas pós-processamento (PACHECO-SANCHEZ 2005; REZENDE-LAGO et al., 2007; e MASSAGUER, 2006).

Tabela 17- Caracterização das amostras de leite UHT dos 4 lotes, após os testes de esterilidade comercial.

Parâmetro	Amostra	
	Sem alteração	Alterada
Embalagem	Normal	Estufada
Aparência	Líquido branco	Laranja ou marrom
Odor	Leite	Azedo ou queijos
pH	6,64 ¹ – 6,80 ²	5,88 ¹ – 7,50 ²
Acidez (%)	0,16 ¹ – 0,19 ²	0,19 ¹ – 3,97 ²
Estabilidade ao etanol 68%	Estável	Instável
Potencial de oxirredução (mV)	160 ¹ – 213 ²	- 336 ¹ – 182 ²
O ₂ dissolvido (mg/L)	1,10 ¹ – 3,16 ²	0,00 ¹ – 5,89 ²
CO ₂ dissolvido (mg/L)	3,23 ¹ – 12,2 ²	4,90 ¹ – 3.763 ²
O ₂ no espaço vazio (%)	11,9 ¹ – 18,4 ²	0,0 ¹ – 11,5 ²
CO ₂ no espaço vazio (%)	0,0 ¹ – 2,1 ²	0,0 ¹ – 37,1 ²

¹ Valor mínimo.

² Valor máximo.

Nas amostras alteradas, o teste eletrolítico, bem como o com solução colorida, não indicaram falhas nas soldas das embalagens.

A Figura 22 mostra a diferença entre uma embalagem alterada e uma normal em termos de estufamento.



Figura 22- Amostras de embalagens com leite UHT alterada (esquerda) e normal (direita) devido ao estufamento.

Anteriormente à realização dos 4 processamentos efetivos, 2 processamentos preliminares foram executados para verificação da adequação da operacionalidade da linha. O primeiro foi executado com água e o segundo com leite cru refrigerado tipo B. Neste último, o lote de produção correspondeu a 90 embalagens BIB. Vinte e quatro amostras foram submetidas ao teste de esterilidade comercial (35 °C por 30 dias) e 21 amostras apresentaram alterações sensoriais (odor e aparência), representando taxa de defeitos de 87,5%. Diante do fato, foi decidido que todas as demais amostras que não foram incubadas fossem analisadas. Todas apresentaram alterações sensoriais e com pH normal. Dez amostras foram submetidas à análise microbiológica e foi detectada a presença de *B. sporothermodurans*. Constatou, também na análise de matéria-prima, a presença do mesmo micro-organismo, concluindo-se assim que o leite cru utilizado no

processamento preliminar era de baixa qualidade e que o binômio tempo x temperatura não foi suficiente para inativar os esporos. Optou-se, a partir daí, em utilizar leite cru refrigerado tipo A proveniente de um outro fornecedor.

Paralelamente ao teste de esterilidade comercial, 10 amostras recém processadas de cada lote produzido foram incubadas em temperatura de 55 °C por 7 dias. Essa condição objetivou o desenvolvimento, caso estivessem presentes, de esporos de termófilos presentes no produto. Conforme Metha (1980), a técnica de pré-incubação de um lote processado visa aumentar o número de células de bactérias viáveis ou esporos que não foram destruídos durante o processamento térmico. Uma das condições citadas pelo autor e executadas por Petrus (2004) e Walter (2010) é a de 55 °C por 7 dias, para a quebra de dormência de esporos de termófilos, caso estivessem presentes.

Nos produtos incubados a 55 °C por 7 dias não foram observadas alterações características de deterioração sensorial (aparência, consistência ou odor da bebida), nem variações de pH maior que 0,2. O pH, bem como outros parâmetros físico-químicos (potencial de oxirredução, oxigênio dissolvido e dióxido de carbono dissolvido) sofreram pequenas variações (Tabela 18), ocasionadas pela aceleração das reações de oxidação do produto em temperaturas mais elevadas (FOX e MCSWEENEY, 2003; WALTER, 2010). A principal alteração foi o ligeiro estufamento de todas as embalagens de todos os lotes de produção. Esse estufamento era esperado, uma vez que a embalagem era flexível e apresentava espaço livre. Desse modo, com a elevação da temperatura de estocagem, ocorria a expansão dos gases e a conseqüente deformação da embalagem.

Todo o sistema apresentou um desempenho próximo a PUNE estipulado e comumente praticado no Brasil de 1:1.000 (MASSAGUER, 2006).

Tabela 18- Caracterização das amostras de leite UHT antes e após incubação a 55 °C por 7 dias.

Parâmetro	Leite UHT	
	Antes	Depois
Aparência, consistência e odor	normal	normal
pH	6,66 ± 0,01	6,58 ± 0,01
Acidez (%)	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,07
Estabilidade ao etanol 68%	Estável	Estável
Potencial de oxirredução (mV)	34,1 ± 0,8	34,8 ± 2,5
O ₂ dissolvido (mg/L)	1,7 ± 0,9	1,3 ± 0,3
CO ₂ dissolvido (mg/L)	9,4 ± 1,3	6,6 ± 1,7
O ₂ no espaço livre (%)	21,4 ± 0,8	21,4 ± 0,8
CO ₂ no espaço livre (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1

Não houve alteração no peso de produto durante a estocagem. Apesar da expansão dos gases e ligeiro estufamento da embalagem, mesmo com a elevação da temperatura, a barreira da embalagem foi suficientemente boa, não permitindo a perda de água para o ambiente. Esse fato demonstra a eficiência das propriedades de barreira do material utilizado, como já discutido nos itens 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3.

Durante o envase, o bico da dosadora era posicionado a aproximadamente 1,5 cm dentro do bocal da embalagem BIB, sem entrar em contato com as paredes internas tanto da embalagem quanto do bocal. Com um tempo de 12 s de enchimento para cada embalagem, o produto, mesmo em uma área ultra-limpa, ficava exposto ao ambiente, o que pode ter colaborado para a maior taxa de defeitos nas embalagens do processamento P2. Em um processo industrial de larga escala é conveniente que não haja essa exposição do produto asséptico, ou seja, a construção de um bocal de enchimento de menor ou maior diâmetro que possa se encaixar ao bico da envasadora, sem deixar espaços para o contato do ar com o produto. A Figura 23 ilustra os detalhes de enchimento das embalagens.



Figura 23- Posicionamento do bico da envasadora no bocal da embalagem durante o enchimento.

As análises sensoriais dos lotes de leite UHT produzidos a partir do Leite Cru Refrigerado tipo A (L-A), ao longo da estocagem sob condições normais e sob exposição à luz, são apresentadas na Tabela 20. Os resultados foram expressos em termos da aceitação média e do índice de consumo potencial.

Na primeira sessão sensorial, realizada duas semanas após a produção experimental, a aceitação média do leite UHT comercial (Controle) não diferiu de uma amostra processada e armazenada sob condições normais. Já as amostras expostas à luz (BIBLuz) iniciaram as avaliações com médias baixas e diferindo significativamente ($p < 0,05$) das demais amostras, assim permanecendo até o fim de sua vida de prateleira. Exceto a amostra exposta à luz, todas as demais apresentaram aceitação média com nota 7, baseada no termo hedônico “gostei moderadamente”, com índice de consumo potencial superior a 80%.

As amostras BIBLuz diferiram significativamente ($p<0,05$) de todas as demais, durante todas as semanas de avaliação. Esses resultados indicam que o leite UHT necessita de acondicionamento ao abrigo da luz, seja por intermédio de uma embalagem secundária (caixa ou *Box*) ou por outra camada opaca aplicada ao filme.

Na segunda, quarta e sexta semana de estocagem pelo menos uma das amostras processadas não diferiu significativamente ($p<0,05$) da amostra Controle. Somente na oitava semana as três amostras não diferiram entre si, porém a maior nota para intenção de consumo foi para o processo P2, demonstrando a qualidade sensorial do produto acondicionado nas embalagens flexíveis BIB.

As amostras BIBluz apresentaram redução significativa ($p<0,05$) de aceitação após oito semanas de estocagem e a vida de prateleira foi estimada em nove semanas. Comparada às amostras dos processamentos P1 e P2, que foram acondicionadas em embalagens metalizadas, conclui-se que a luz não afetou a estabilidade do leite UHT nestas embalagens, mas em poucos dias ocasionou a deterioração do produto na embalagem de PEBD sem metalização. Essa diferença de estabilidade do produto está associada às propriedades de barreira a luz e ao oxigênio das embalagens.

Na décima terceira semana a amostra do processamento P2 apresentou nota muito baixa para aceitação (5,4), valor este que poderia determinar o fim da vida de prateleira, mas em função da nota de intenção de consumo (60%), a amostra foi mantida na avaliação sensorial. Na décima quinta semana houve a recuperação tanto da nota de aceitação quanto da nota de intenção de consumo, entretanto, a amostra diferiu significativamente das demais.

A partir da 17^a semana, tanto a amostra Controle quanto a do processamento P2 tiveram redução significativa ($p<0,05$) de aceitação. A vida de prateleira de ambas pode ser estimada em dezenove semanas ou 4,4 meses.

A amostra restante, P1, somente apresentou redução significativa ($p<0,05$) nas notas de aceitação e intenção de consumo entre as semanas de estocagem

24 e 26. Com base nesses dados, a vida de prateleira foi estimada em 27 semanas ou 6,3 meses.

Walter (2010) em condições similares de processamento obteve vida de prateleira de 12 semanas para leite UHT em embalagem flexível multicamada. Petrus (2004), também em condições similares de processo, estimou em 11 semanas, para o leite UHT acondicionado em garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD).

Apesar das diferenças inerentes à matéria-prima e às condições de processamento e embalagem, pode-se considerar, através dos dados apresentados na Tabela 19, que o leite UHT acondicionado nas embalagens BIB apresentou vida de prateleira maior do que a amostra comercial em embalagem laminada cartonada (Controle).

Tabela 19- Avaliação sensorial de leite UHT produzido com leite cru refrigerado tipo A em termos de aceitação média / intenção de consumo (%).

Leite	Tempo de estocagem (semanas)													
	2	4	6	8	9	11	13	15	17,5	19	21	24	26	27
Controle	¹ 7,2 ^{ba} /83 ²	7,2 ^{abA} /80	7,0 ^{bAB} /73	7,0 ^{aAB} /86	6,6 ^{bc} /81	6,2 ^{cd} /78	6,9 ^{ab} /84	6,6 ^{aC} /81	6,3 ^{bd} /72	5,4 ^{ce} /57	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p
P1	7,6 ^{aA} /88	7,4 ^{aAB} /82	7,5 ^{aA} /82	7,2 ^{aBC} /84	n.d. ⁴	7,0 ^{aCD} /74	6,8 ^{aDE} /88	6,6 ^{aEF} /95	7,2 ^{aBC} /93	6,8 ^{aDE} /84	6,5 ^{aF} /76	6,6 ^{aEF} /88	6,0 ^{aG} /66	5,8 ^{aG} /57
P2	7,3 ^{ba} /87	7,1 ^{bAB} /78	7,1 ^{bAB} /88	7,1 ^{aAB} /95	7,0 ^{aB} /86	6,7 ^{bc} /84	5,4 ^{be} /60	6,0 ^{bd} /76	5,8 ^{cd} /66	5,9 ^{bd} /53	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p
BIBLuz³	5,1 ^{cd} /62	5,4 ^{cBC} /54	5,6 ^{cb} /65	5,9 ^{ba} /65	5,3 ^{cd} /57	f.v.p ⁵	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p	f.v.p

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna (comparação entre tratamentos) e maiúscula na linha (comparação entre tempos de estocagem) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de médias de Tukey;

¹ Aceitação média;

² Intenção de consumo (%);

³ As amostras foram expostas à luz após duas semanas de estocagem;

⁴ Não determinado.

⁵ Final da vida de prateleira: média de aceitação < 6,0 e índice de consumo potencial < 60%.

4- CONCLUSÕES

A embalagem laminada flexível estudada, do tipo *Bag-in-box*, ofereceu propriedades mecânicas compatíveis ao acondicionamento asséptico de leite. As propriedades de barreira à luz e ao oxigênio, possibilitadas principalmente em função do filme PETmet, permitiram obter vida de prateleira similar ou superior a da embalagem laminada cartonada comercial, de modo que os principais fatores que afetaram a estabilidade do produto foram inerentes às operações da linha de processamento, como falhas nas vedações das junções de tubulações e bombas centrífugas.

O monitoramento higiênico e de operacionalidade da sala limpa demonstraram ser satisfatórios para o desempenho de sua função. O tanque asséptico, apesar de não possuir pressão positiva, foi adequado, visto que era operado dentro da sala limpa ISO Classe 7.

A esterilização (SIP) da linha de processamento e embalagem mostrou-se eficiente e não foi detectado crescimento microbiano nas amostras de água de enxágue avaliadas.

O processo de esterilização via radiação ionizante (gama) das embalagens BIB pode ser considerado altamente eficiente, pois possibilitou no mínimo 8 reduções decimais de esporos de *Bacillus pumilus*, ou seja, na caracterização microbiológica das embalagens destinadas ao envase asséptico em questão, não foram encontrados micro-organismos viáveis.

Os lotes de leite UHT processados nesta pesquisa apresentaram maior vida de prateleira do que as amostras de leite UHT em embalagem laminada cartonada comercial (Controle).

O leite UHT em embalagens BIB de dois processamentos (P1 e P2) submetidos à avaliação sensorial, atingiu entre 19 e 27 semanas de estocagem, enquanto que as amostras controle chegaram somente a 19 semanas de estocagem, com notas de aceitação e intenção de consumo menores, apesar de diferenças inerentes à matéria-prima, material de embalagem e condições de processamento.

A qualidade da matéria-prima utilizada nos experimentos (leite refrigerado tipo A) contribuiu substancialmente para o aumento da vida de prateleira e qualidade sensorial do produto.

O produto nas embalagens PEBD exposto à luz apresentou vida de prateleira de 9 semanas de estocagem. A exposição do leite à radiação ultravioleta e visível foi capaz de alterar as características do leite nesta embalagem e reduzir a vida de prateleira. Portanto, tal produto deve ser acondicionado ao abrigo da luz, o que pode ser viabilizado empregando-se embalagens secundárias de papelão ondulado (caixas ou *box*). Desta forma, o sistema de embalagem poderá ser um atrativo para laticínios de pequena e média escala de produção.

O sistema apresentou um desempenho próximo a PUNE estipulado.

A configuração do sistema avaliado (linha de processamento e embalagem) foi capaz de atender aos requisitos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (1993).

Esse trabalho contribuiu para a viabilização técnica do sistema asséptico, como uma opção em potencial para as indústrias de laticínios, bem como consolidar a linha de pesquisa sobre sistemas assépticos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

5- PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um estudo em embalagens sem metalização e dentro de uma caixa de papelão ondulado (*Box*), protegida ao abrigo da luz, a fim de se comparar os resultados com os dados de estabilidade obtidos neste trabalho;
- Avaliar outros materiais de embalagem, tais como Polipropileno Bi-orientado Metalizado e Polietileno de Baixa Densidade (BOPPmet/PEBD), bem como a aplicação de bocais de enchimento com estrutura mais simples objetivando a possível redução de custos inerentes ao processo;
- Realizar um estudo de envase em câmara asséptica, acoplada ao bocal de enchimento, para a comparação com os dados deste trabalho que realizou todo o processo de envase em Sala Limpa;
- Simular condições mais drásticas de qualidade do ar no ambiente de envase, com o uso da classificação ISO Classe 7 e 8;
- Avaliar o possível sistema logístico de comercialização.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.F. Avaliação de processo de sanificação química de garrafas plásticas para sistemas assépticos. 2001. 139p. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

ABREU, L.F.; FARIA, J.A.F. Evaluation of a system for chemical sterilization of packages. **Packaging Technology and Science**, v.17, p.37-42, 2004.

AGARWAL, S.R. Packaging of irradiated flesh foods: present status. **Journal Food Technology**. v. 8 (1), p. 27-37, 1972.

AIRES, G.S.B. Treinamento de um painel de estudantes para julgamento de qualidade sensorial de leite fluído. 2002. 149p. **Dissertação** (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

AIRES, G.S.B. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos e condições de embalagem sobre a vida de prateleira do leite fluído com ênfase no julgamento de defeitos do sabor. 2007. 202p. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

AIRES, G.S.B.; WALTER, E.H.M; JUNQUEIRA, V.C.A.; ROIG, S.M.; FARIA, J.A.F. *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. **Journal of Food Protection**, v.72 (6), p.1301-1305, 2009.

ALVES, D.R. **Industrialização e comercialização do leite de consumo no Brasil**. 2001. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=opniao>>. Acesso em: 19 mai 2008.

AMERICAN BAG MANUFACTURER ASSOCIATION. **Specification sheet for 200/220 and 1000/1200 litres aseptic bags.** 2003. v. 3, 5p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for leaks using bubble emission techniques ASTM E 515-95.** Philadelphia: ASTM, 2000, 3 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E2454-05: Standard guide for sensory evaluation methods to determine the sensory shelf life of consumer products.** West Conshohocken: ASTM International, 2005. 9p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D1003-07: Standard test method for haze and luminous transmittance of transparent plastics.** West Conshohocken: ASTM International, 2007a. 7p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E104-02(2007): Standard practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions.** West Conshohocken: ASTM International, 2007b. 5p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM F2251-03(2008): Standard test method for thickness measurement of flexible packaging material.** West Conshohocken: ASTM International, 2008. 4p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E1164-09: Standard practice for obtaining spectrometric data for object-color evaluation.** West Conshohocken: ASTM International, 2009a. 8p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard Test Method for Seal Strength of Flexible Barrier Materials ASTM F88 / F88M.** Philadelphia: ASTM, 2009b. 11 p.

ANDERSON, I. Aseptic bulk of low acid UHT sterilised. **Asia Pacific Food Industry.** Singapura, n. 2, p. 62-65, 1993.

ANSARI M.D.I.A.; DATTA A.K. An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. **Food and Bioproducts Processing**, v.81 (1), p.57-65, 2003.

ARAÚJO, J.M.A. Oxidação de lipídeos em alimentos. In: ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. Cap.1, p.1-67.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). **Sobre o leite longa vida**. 2009. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Estatisticas.aspx>>. Acesso em: 11 nov. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). **Sobre o leite longa vida**. 2010. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Estatisticas.aspx>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14637: Embalagem plástica para água mineral e de mesa - Garrafão retornável** - Requisitos para lavagem, enchimento e fechamento. 2001. 5p.

BALL, C.O. **Thermal process time for canned foods**. Bulletin of the National Research Council, v.7 (37), 1923.

BENNETT, E.S.F. O fim de uma era. **Revista da Sociedade Brasileira de Contaminação (SBCC)**, São José dos Campos, n. 6, p. 28-30, jan/fev. 2002.

BERNARD, D. Microbiological considerations of testing aseptic process and packaging systems. In: *Proceedings of National Foods Processors Association conference entitled Capitalization on Aseptic*, 13-14. Washington, D. C.: FPI. 1983.

BERNARD, D. T.; GAVIN III., A.; SCOTT, V. N.; SHAFER, B. D.; STEVENSON, K. E.; UNVERFERTH, J. A.; CHANDARANA, D. I. Validation of aseptic processing and packaging. **Food Technology**, v. 44 (12) p. 119-122, 1990.

BIZARI, P.A.; PRATA, L.F.; RABELO, R.N. Eficiência da contagem microscópica a partir de leite UHT processado na retroavaliação da qualidade da matéria-prima. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 8 (47), p. 70-78, 2003.

BODYFELT, F. W.; TOBIAS, J.; TROUT, G. M. In: **The Sensory Evaluation of Dairy Products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. 598p.

BOSSET, J.O.; SIEBER, R.; GALLMANN, P.U. Light transmittance: Influence on the shelf life of milk and milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.300, p.19-39, 1995.

BRADLEY, D.G.; MIN, D.B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31 (3), p.211-236, 1992.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Portaria INMETRO nº 74, de 25 de maio de 1995. **Diário Oficial da União**, 21 jul. 1995. Seção 1, p.10825.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 544, de 16 de Novembro de 1998. Aprova os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.90, 17 nov., 1998.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Portaria nº 96, de 07 de abril de 2000. **Diário Oficial da União**, 12 abr. 2000. Seção 1, p.34.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de dezembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, 20 ago. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, 18 ago. 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 10 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico** - nº 34 de 31 de outubro de 2007. Uma análise dos achados laboratoriais sobre ocorrências de fraudes em Leite UHT (UAT) – Polícia Federal, Operação “Ouro Branco”. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/informes/34_311007.htm> Acesso em: 20/03/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 6871, de 04 de Junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.20, 5 jun., 2009.

BRODY, A. L. Aseptic and extended-shelf-life packaging. **Food Technology**, v. 60 (2), p. 66-68, 2006.

BRODY, A.L.; MARSH, K.S. **The Wiley Encyclopedia of packaging technology**. 2. ed. Ney York: John Wiley & Sons, Inc., 1997. 1023p.

BURTON, H. Monograph on pasteurized milk – microbiological aspects. **Bulletin International Dairy Federation**, n. 200, p. 9-14, 1986.

BUCHNER, N. Aseptic processing and packaging of food particulates. In: WILLHOFT, E.M.A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, Cap. 1, p.1-22, 1993.

CARDOSO, F.C. Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta. 2007. 111p. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CELF, O. Aseptic packaging. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.133, p.93-104, 1981.

CETEA (Centro de Tecnologia de Embalagens de Alimentos) – ITAL. **Novas tecnologias de acondicionamento de alimentos**. Campinas, 1988. 162p.

CHEVROTON, D. The aseptic filling of beverage bottles. **Industrie delle Bevande**, v. 25 (142), p. 120-122, 1996.

CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/RCP 40-1993: Code of hygienic practice for aseptically processed and packaged low-acid foods**. Rome: FAO/WHO, 1993a. 34p.

CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/RCP 23-1979, Rev. 2-1993: Recommended international code of hygienic practice for low and acidified low acid canned foods**. Rome: FAO/WHO, 1993b. 95p.

CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/MISC 3: Inventory of processing aids**. Rome: FAO/WHO, 1999. 39p.

CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/RCP 1-1969 Rev. 4-2003: Recommended international code of practice general principles of food hygiene**. Rome: FAO/WHO, 2003. 31p.

CODEX ALIMENTARIUS. **CAC/RCP 57-2004: Code of hygienic practice for milk and milk products**. Rome: FAO/WHO, 2004. 40p.

DATTA, A.K. Milk sterilization and aseptic packaging under rural context. **Indian Dairyman**, v.61 (3), p.114-119, 2009.

DE MARTINO, D. B. A escalada do leite longa vida. **Engarrafador Moderno**, Santo André, v.10 (86), p.10-15, jun, 2001.

DEIBEL, K.E.; JANTSCHKE, M. Canned foods – Tests for commercial sterility. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap.61, p.577-582. 2001.

DENNY, C.B.; PARKINSON, N.G. Canned foods – Tests for cause of spoilage. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap.62, p.583-600. 2001.

DIMICK, P.S. Photochemical effects on flavor and nutrients of fluid milk. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v.15 (4), p.247-256, 1982.

DOYON, G.; CLEMENT, A.; RIBEREAU, S.; MORIN, G. Canadian bag-in-box under distribution channel abuse: material fatigue, flexing simulation and total closure/spout leakage investigation. **Packaging technology and science**. New York, v. 18, p. 97-106, 2005.

DUNKLEY, W.L.; STEVENSON, K.E. Ultra-high temperature processing and aseptic packaging of dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70 (10), p. 2192-2202, 1987.

DUPONT. Dupont Bag-in-Box: sistema de embalagem. 2011. Disponível em <www.dupont.liquidpackaging.com.br>. Acesso em: 12 jan 2011.

ELECSTER. **Products**. 2009. Disponível em: <<http://www.elecster.fi/products.html>>. Acesso em: 01 fev. 2009.

EMBRARAD, CBE. Embalagens. 2011. Disponível em <www.cvesa.com.br>. Acesso em: 12 jan 2011.

ESTY, J.R.; MEYER, K.F. The heat resistance of the spores of *B. Botulinum* and allied anaerobes. XI. **Journal of Infectious Diseases**, v.31 (6), p. 650-663, 1922.

EVANCHO, G.E.; WALLS, I. Aciduric flat sour sporeformers. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap.24, p. 239-244. 2001a.

EVANCHO, G.M.; SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap.3, p.25-35. 2001b.

FARIA, J.A.F. Sistema de esterilização de embalagens. Br. Patente PI0101926-0. 1999.

FARIA, J.A.F.; ESPINOZA-ATENCIA, E. J. . Embalagens plásticas para alimentos irradiados. **Revista Plástico Moderno**, São Paulo-SP, v. 11 (227), p. 20-22, 1992.

FARIA, J. A. F. Material de aula TA711. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

FLUCKIGER, E. Alternative methods to avoid recontamination during aseptic filling and packaging. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.300, p.52-56, 1995.

FOOD AND DAIRY EXPO. Extended shelf life packaging. **Food Engineering**. Radnor, v. 55 (12), p. 65-66, 1983.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia de segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOX P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Advanced dairy chemistry**: Volume 1 – Proteins. 3. ed. London: Blackie, 2003. 1349p.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B.; RICHARDSON, G.H. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap.8, p.271-286. 1992.

FREDSTED, L.B.; RYSSTAD, G.; EIE, T. Pure-Lactm. The new milk with protected freshness and extended shelf life. In: International Dairy Federation. **Heat Treatments and Alternative Methods**. Bruxelas: IDF. Session I, p. 104-125. 1996

GREENBERG, R.A.; TOMPKIN, R.B.; BLADEL, B.O.; KITTAKA, R.S.; ANELLIS, A. Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in the United States and Canada. **Applied Microbiology**, v.14 (5), p.789-793, 1966.

GUILHERME, A.S. Controle de contaminação através da tecnologia de salas limpas. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. São Paulo, v. 16 (102-103), p. 25-34, 2002.

HOLDSWORTH, S. D.; RICHARDSON, P. S. Aseptic processing and packaging of food. **Food Reviews International**, v. 1 (2), 1992.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14644-1:1999(E): Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness**. Geneva: ISO, 1999. 18p.

JELEN, P. Experience with direct and indirect UHT processing of milk: A Canadian viewpoint. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 873-883, 1989.

JÖNCK, R.H. Produção de parenterais exige áreas classificadas e água purificada. **Controle de contaminação**, São Paulo, n. 6 (42), p. 12-19, 2002.

KESLLER, H. G. Pasteurization - sterilization - heating methods. In: **Food engineering and dairy technology**. Freising: Verlag A. Kessler, Cap.6, p.139-207. 1981.

KILLORAN, J. J. Packaging irradiated food. In: Preservation of food by ionizing radiation. Volume II, Cap. 8, p. 317-326, 1983.

KLAUS, J.S. Soluções para o projeto de salas limpas na indústria de alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São José dos Campos, n. 8, p. 14-16, 2002.

LECHNER, E.: Über den Gehalt der H-Milch an Sauerstoff und dadurch bedingte Veränderungen während der Lagerung. **Deutsche Milchwirtschaft**, v. 28, 123-126, 1977.

LEWIS, M.; HEPPELL, N. **Continuous thermal processing of foods: Pasteurization and UHT sterilization**. Geithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. 447p.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 2006. v. 1. 268p.

MENDONÇA, P. V. R. Shefa Agropecuária Tuiuti Ltda. **Comunicação pessoal**, 2009.

MERMELSTEIN, N.H. High-temperature, short-time processing. **Food Technology**, v.55 (6), p.65-78, 2001.

METTA, R. S. Milk processed at ultra-high-temperatures: A review. **Journal of Food Protection**. v. 43, p. 212-225, 1980.

MITCHELL, E.L.A. review of aseptic processing. **Advances in Food Research**, v.32, p. 1-37, 1988.

MOIA, E. O guia ISPE e a sala limpa farmacêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São José dos Campos, n. 4, p. 18-27, 2001.

MOTTAR, J.; WAES, G. Monograph on pasteurized milk: Quality control of pasteurized milk. **Bulletin International Dairy Federation**, n. 200, p. 66-70, 1986.

MUNSON, T.E. Basics of an aseptic process simulation program. **Pharmaceutical Technology**, v. 28, p. 35-39, 2004.

MURRAY, J.G.; STEWART, D.B. Advances in the microbiology of milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 31 (1), p. 28-35, 1978.

NELSON, P. E. Principles of Aseptic Process and Packaging. GMA Science and Education Foundation: Indiana. 3 ed., 157 p., 2010.

NIEUWENHUIJSE, J. A. Changes in heat-treated milk products during storage. In IDF (1995) Heat induced changes in milk (2nd ed.) No. SI 9501. 1995.

ORBELL, J. A. Aseptic bag-in-box packaging. **Food Technology**. v.34, p.56-57, 1980.

PACHECO-SANCHEZ, C.P. Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT. 2005. 231p.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PARDI, G. Bag-in-box invade o Brasil. **Engarrafador Moderno**. Santo André, n. 145, p. 20-27, 2006.

PEREIRA, G. Scholle Packaging Ltda. **Comunicação pessoal**, 2008.

PETRUS, R.R. Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica. Campinas, 2000 122p. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PETRUS, R. R. Adaptação e avaliação de desempenho de sistema asséptico para leite fluido em garrafa plástica. 2004. 219 p. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PETRUS, R.R.; FARIA, J.A.F. Sistema de esterilização de embalagens. **Engarrafador Moderno**, v. 10 (70), p. 36-38, 1999.

PETRUS, R. R.; CORRÊA NETO, R.S.; FARIA, J.A.F.; GÂNDARA, A.L.N. Sanificação química de garrafas plásticas. **Higiene Alimentar**, v.15 (80/81), p. 80-90, 2001.

PETRUS, R.R.; FARIA, J.A.F. Testing a small scale aseptic system for milk in plastic bottles. **Food Science and Biotechnology**, v.16 (1), p. 18-22, 2007.

PETRUS, R.R.; WALTER, E.H.M.; FARIA, J.A.F.; ABREU, L.F. Sensory stability of ultra high-temperature milk in polyethylene bottles. **Journal of Food Science**, v.74 (1), p. 53-56, 2009.

PFLUG, I.J. Endpoint of a preservation process. **Journal of Food Protection**, v.50 (4), p. 347-351, 1987a.

PFLUG, I.J. Factors important in determining the heat process value, F_T , for low-acid canned foods. **Journal of Food Protection**, v. 50 (6), p. 528-533, 1987b.

PFLUG, I.J.; BERRY, M.R.; DIGNAN, D.M. Establishing the heat-preservation process for aseptically-packaged low-acid food containing large particulates, sterilized in a continuous heat-hold-cool system. **Journal of Food Protection**, v.53 (4), p. 312-321, 1990.

PFLUG, I. J. Validation of Sterilization Processes. **Proceedings of the First Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology Symposium**. Vienna, p. 20-26, 1997.

PHARMACEUTICAL INSPECTION CONVENTION; PHARMACEUTICAL INSPECTION CO-OPERATION SCHEME. **Recommendations on validation master plan, installation and operational qualification, non-sterile process validation, cleaning validation**. Geneva: PIC/S, 2004a. 26p. (PI 006-2)

PHARMACEUTICAL INSPECTION CONVENTION; PHARMACEUTICAL INSPECTION CO-OPERATION SCHEME. **Recommendation on the validation of aseptic processes: PI 007-2**. Geneva: PIC/S, 2004b. 16p. (PI 007-2)

RAKIN, S. A. Super-pasteurized milk. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. v. 3, p. 1633-1637, 2002.

REUTER, H. Evaluation criteria for aseptic filling and packaging systems. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., Cap. 4.1, p. 95-108. 1988.

REUTER, H. Processes for packaging materials sterilization and system requirements. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1. ed. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., Cap.5, p. 155-165. 1993.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JR., O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; AMARAL, L.A. Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59 (6), p. 1563-1569, 2007.

RICE, J. Irradiated packaged foods processing. v. 6, p. 51-55, 1989.

RICHARDSON, P.S.; CHRISTIAN, G.; TUCKER, G.S. **Guidelines on the safe production of aseptically processed and packaged foods**. Gloucestershire: Campden & Chorleywood Food Research Association Group, 2007. 88p. (Guideline No. 53)

ROBERTSON, G. L. **Food packaging – Principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 1993. 676p.

RYSSTAD, G.; EBBENSEN, A.; EGGESTAD, J. Sensory and chemical quality of UHT milk stored in paperboard cartons with different oxygen and light barriers. **Food Additives and Contaminants**, v. 15 (1), p.112-122, 1998.

SALAS LIMPAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v. 5 (6), p. 22-24, 1999.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. **Embalagens plásticas flexíveis**: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267p.

SATTAR, A.; DEMAN, E.A. Photooxidation of milk and milk products: A review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 7 (1), p. 13-37, 1975.

SCHNEIDER, R.K. Projetos de sistemas de HVAC para salas limpas. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São José dos Campos. n. 6, p. 26-27, 2002.

SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D.; HERNANDES, R. J. Plastic Packaging: properties, processing, applications and regulations. Cincinnati: Hanser Gardner Publications. 2. ed. 448p. 2004.

SHIEH, E.; PASZCZYNSKI, A.; WAI, C.M.; LANG, Q.; CRAWFORD, R. Sterilization of *Bacillus pumilus* spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions. **Journal of Microbiological Methods**, v.76 (3), p. 247-252, 2009.

SHIPE, W.F.; BASSETTE, R.; DEANE, D.D.; DUNKLEY, W.L.; HAMMOND, E.G.; HARPER, W.J.; KLEYN, D.H.; MORGAN, M.E.; NELSON, J.H.; SCANLAN, R.A. Off-flavors in Milk: nomenclature, Standards and bibliography. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 855, 1979.

SIG.BIZ/COMBIBLOC: SIG Combibloc vai abrir fábrica de embalagem longa vida. 2008. Disponível em: <<http://www.combibloc.com.br/>>. Acesso em: 12 mai 2008.

SILVA, F.A.S. **Assistat - Statistical Assistance**. 2008. Disponível em: <<http://www.assistat.com/>>. Acesso em: 18 out. 2008.

SKIBSTED, L.H. Light-induced changes in dairy products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 346, p. 4-9, 2000.

SOARES, T. **Embalagem – mais competitividade ao setor de leite**. **Engarrafador Moderno**, n. 198, p. 26-31, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO (SBCC). **Recomendação normativa SBCC-RN-005-97 para testes em áreas limpas.** São José dos Campos, 1997.

SOUZA, J.A. C. Scholle Packaging Ltda. **Comunicação pessoal**, 2008.

SOUZA, J.A. C. Scholle Packaging Ltda. **Comunicação pessoal**, 2010.

STATUTORY INSTRUMENTS (ST). Food Milk and dairies, the dairy products (hygiene) regulations, No. 1086. Londres: HMSO. 1995.

STONE, H; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices.** San Diego: Academic Press, 1993. 338 p.

STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing.** 2. ed. New York: Academic Press, 1973. 329p.

SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environmental. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3rd ed. Washington: American Public Health Association. Cap. 3, p. 51-74. 1992.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap.6, p.53-62. 2001.

SZEMPLENSKI, T. **Aseptic packaging in the United States: Systems, installations and trends for the food and beverage markets.** 2008. Disponível em: <<http://www.packstrat.com>>. Acesso em: 19 mai 2008.

TETRA PAK. Capacidade de processamento. 2010. Disponível em: <www.tetrapak.com.br>. Acesso em: 18 de jan de 2010.

TEUBER, .M; BUSSE, M. Microbial aspects. In: **Bulletin of the International Dairy Federation:** New monograph on UHT milk, Brussels, n. 133, cap. 1, p. 5-10, 1981.

TOLEDO, R. T. Chemical sterilizants for aseptic packaging. **Food Technology**, v.29, n.5, p.102-112, 1975.

TRIBST, A. A.; FARIA, J. A. F. Inovações sobre sistemas de embalagens para alimentos processados termicamente. **Boletim CEPPA**. Curitiba-SP, v. 28 (2), p. 255-270, 2010.

TRIBUNA DO NORTE. **Consumo de leite cresce**. 2011. Disponível em: <www.tribunadonorte.com.br/noticia/consumo-de-leite-cresce/174032>. Acesso em: 17 mar 2011.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Instructions for Establishment Registration and Processing Filing for Acidified and Low-Acid Canned Foods**. 1997. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/AcidifiedLow-AcidCannedFoods/EstablishmentRegistrationThermalProcessFiling/Instructions/default.htm>> Acesso em: 29 nov. 2009.

UNITED STATE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**: Examination of flexible and semirigid food containers for integrity. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072703.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2009.

UNITED STATE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Packaging Materials for Use During Irradiation of Prepackaged Foods** (21 CFR 179.45). 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/IrradiatedFoodPackaging/ucm074764.htm>>. Acesso em: 12 jan 2011.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Form FDA 2541a**: Food process filing for all methods except low-acid aseptic. 2008a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/ReportsManualsForms/Forms/UCM076784.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Form FDA 2541c**: Food process filing for low-acid aseptic systems. 2008b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-forms/documents/form/ucm123687.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of federal regulations 21CFR108**: Emergency Permit Control. 2009a. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=108>>. Acesso em: 26 nov. 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of federal regulations 21CFR113**: Thermally Processed Low-Acid Foods Packaged in Hermetically Sealed Containers. 2009b. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=113>>. Acesso em: 26 nov. 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of federal regulations 21CFR114**: Acidified Foods. 2009c. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=114>> Acesso em: 26 nov. 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of federal regulations Title 21**. 21CFR178.1005. 2009. Hydrogen peroxide solution. 2009d. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>>. Acesso em: 26 nov. 2009.

US Department of Health and Human Services; PMO Grade A Pasteurised Milk Ordinance, 1985.

VATNE, K. B.; CASTBERG, H. B. Processing and packaging aspects of extended shelf life products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Nov, 1991.

VENERANDA, N. RDC 210 traz novas exigências para BPE. **Controle de Contaminação**. São Paulo, v. 6 (57), p. 10-15, 2004.

VICENT, F.; TIBI, A.; GOURY, V.; DARBORD, J.C. Combined treatment using radiation and heat: susceptibility of *bacillus*, salmonella, staphylococcus and clostridium. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation**, v.35 (1-3), p. 279-283, 2009.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JR., O.D.; REZENDE-LAGO, N.C.M. Micro-organismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo de *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57 (3), p. 396-400, 2005.

VON BOCKELMANN, B. Aseptic packaging. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea Febiger, Cap. 48, p. 833-845. 1991.

VON BOCKELMANN, B. Aseptic Processing in the food industry – quality control of aseptically packaged products. In: REUTER. H. **Aseptic Packaging of Food**. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., Cap. 6.1, p. 237-243. 1988.

VON BOCKELMANN, B.; VON BOCKELMANN, I. **Long-life products**: Heat-treated, aseptically packed: A guide to quality. Värnamo: Fålh & Hässler, 1998. 246p.

WALTER, E.H.M. Adequações técnicas de um sistema asséptico para leite e bebidas de alta acidez em embalagens flexíveis. 2010. 195p. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

WHITE, W. An introduction to design of clean and containment areas. In: WHITE, W. **Clean room design**. Baffins Lane: John Wiley and Sons Ltd, Cap. 1, p. 1-22. 1991.

WIRTANEN, G.; MIETTINEN, H.; PAHKALA, S.; ENBOM, S.; VANNE, L. **Clean air solutions in food processing**. Espoo: VTT Publications, 2002. 95p.

ZACARCHENCO, P.B. Aperfeiçoamento da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans* e sua ocorrência em leite UHT/UAT. 2000. 94p. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

7- ANEXOS

Anexo I- Documento para registro de sistemas assépticos para produtos de baixa acidez.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES ■ Food and Drug Administration						NOTE: No commercial processor shall engage in the processing of low-acid foods unless completed Forms FDA 2541 and FDA 2541c have been filed with the Food and Drug Administration, 21 CFR 108.35 (c)(1) and (2).			FORM APPROVED: OMB No. 0910-0037 EXPIRATION DATE: 6/31/2011																				
FOOD PROCESS FILING FOR LOW-ACID ASEPTIC SYSTEMS									FDA USE ONLY																				
(USE FDA BOOKLET TITLED "ASEPTIC PACKAGING SYSTEM SUPPLEMENT")									DATE RECEIVED BY FDA																				
(TYPE OR PRINT ALL INFORMATION REQUESTED, IF AN ITEM DOES NOT APPLY ENTER "NA". FILE ACIDIFIED ASEPTIC (pH 4.6 or BELOW) ON FORM 2541a)																													
1. FCE -----						7. PRODUCT NAME, FORM OR STYLE, AND PACKING MEDIUM																							
2. ESTABLISHMENT NAME						8. NAMES OF STERILIZING SYSTEMS																							
ADDRESS (No. and Street)						a. Product ¹																							
CITY STATE						b. Packaging																							
ZIP (OR OTHER POSTAL CODE) COUNTRY						9. PROCESS ORIGIN																							
3. SID 2 0 - - - / - - - Y Y Y Y M M D D S S S						No. Source for 8.a. and 8.b. Date (mm/yyyy)																							
4. <input type="checkbox"/> NEW <input type="checkbox"/> CANCELS <input type="checkbox"/> REPLACES Y Y Y Y M M D D S S S						a.																							
5. <input type="checkbox"/> SCHEDULED <input type="checkbox"/> ALTERNATE FOR Y Y Y Y M M D D S S S						b.																							
6. SUP SID 2 0 - - - / - - - Y Y Y Y M M D D S S S						10. CONTAINER TYPE (Check one)																							
						a. <input type="checkbox"/> Tinplate or Steel Can b. <input type="checkbox"/> Aluminum Can c. <input type="checkbox"/> Glass																							
						d. <input type="checkbox"/> Other (Specify below and in item 22 if necessary)																							
11. MAXIMUM WATER ACTIVITY ²		12. pH		13. MAXIMUM CONSISTENCY OR VISCOSITY IN CENTIPOISES OR APPROPRIATE UNITS				14. SPECIFIC GRAVITY AT 77 ± 2°F		15. INSIDE DIAMETER OF HOLDING TUBE (Inches)		16. HOLDING TUBE LENGTH (Inches)																	
Normal		Max. ³		Value at 77±2°F		Value at Other Temp		Other Temp (°F)		Units		Method Name																	
0.																													
17. OTHER CRITICAL CONTROL FACTORS (Check all that apply)			18. CONTAINER DIMENSIONS (Inches and Sixteenths)			19. SCHEDULED PROCESS				20. MAXIMUM FOOD FLOW RATE (gal / min)		21. THRUPUT (containers / minute)		FOOTNOTES															
61 <input type="checkbox"/> Percent Solids			No.			Diameter or Length		Height or Width		Height		Minimum Initial ⁴ Temp (°F)		Time (sec)		Temp (°F)		Least Sterilizing Value (F ₀) ⁵		Flow Correction Factor									
62 <input type="checkbox"/> Ratio of Solids to Liquids			1																										
63 <input type="checkbox"/> Syrup Strength			2																										
64 <input type="checkbox"/> Method of Preparation			3																										
65 <input type="checkbox"/> Formulation			4																										
66 <input type="checkbox"/> Rehydration (specify method in 22)			5																										
67 <input type="checkbox"/> Particulates (specify maximum size in 22)			6																										
68 <input type="checkbox"/> Other (specify in 22)																													
22. COMMENTS						AUTHORIZED COMPANY REPRESENTATIVE																							
						NAME (Type or Print)						TITLE																	
						SIGNATURE						DATE						PHONE NO.											

FORM FDA 2541c (10/08)

PREVIOUS EDITION IS OBSOLETE.

PSC Graphics: (301) 443-1090 EF

Fonte: USFDA, 2008a.

Anexo II- Modelo de documento de registro para todos os métodos de conservação de produtos comercialmente estéreis, exceto sistemas assépticos de baixa acidez na USFDA.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH SERVICE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

FOOD PROCESS FILING FOR ALL METHODS EXCEPT LOW-ACID ASEPTIC

(Use FDA booklet titled: "Instructions for Establishment Registration and Process Filing for Acidified and Low-Acid Canned Foods" for completing Form FDA 2541a.)

A. PRODUCT Name, Form or Style, and Packing Medium: _____ pH: ____ * ____ (Before Acidification) Governing Regulation: _____ <input type="checkbox"/> low-acid (21 CFR 108.35/113) <input type="checkbox"/> acidified (21 CFR 108.25/114)		Type of Submission: <input type="checkbox"/> new <input type="checkbox"/> replaces _____ / _____ <input type="checkbox"/> cancels _____ / _____	Process Use: <input type="checkbox"/> scheduled <input type="checkbox"/> alternate for _____ / _____ <input type="checkbox"/> emergency for _____ / _____	FORM APPROVED: OMB NO. 0910-0037 EXPIRATION DATE: 9/31/2011 See Burden Statement on page 3. 20 ____ / ____ / ____ FCE SID	
B. PROCESSING METHOD NAME OF STERILIZER (MFR. & TYPE) _____ HEATING MEDIUM (e.g., Steam, water, Immersion or spray, steam-air) _____		1. <input type="checkbox"/> Still a. <input type="checkbox"/> Horizontal b. <input type="checkbox"/> Vertical Divider Plates (complete for a. or b.) <input type="checkbox"/> None <input type="checkbox"/> Perforated c. <input type="checkbox"/> Crateless Bottom Surface (complete for c.) <input type="checkbox"/> Solid <input type="checkbox"/> Perforated			
2. <input type="checkbox"/> Agitating a. <input type="checkbox"/> End over End <input type="checkbox"/> Axial b. <input type="checkbox"/> Continuous <input type="checkbox"/> Batch		3. <input type="checkbox"/> Hydrostatic <input type="checkbox"/> Inner Chain only <input type="checkbox"/> Outer Chain only <input type="checkbox"/> Both Inner and Outer Chain <input type="checkbox"/> Single Chain <input type="checkbox"/> Multiple Chain		4. <input type="checkbox"/> Flame 5. <input type="checkbox"/> Other (explain) _____	
6. <input type="checkbox"/> Acidified Maximum Equilibrium pH: ____ * ____ Method of Acidification: _____ Acidifying Agent: _____ Pasteurization Method: _____ Preservative Used: _____ Concentration: ____ * ____ ; ____ * ____ ; ____ * ____		CONTAINER TYPE: 1. <input type="checkbox"/> Tinplate/Steel Can <input type="checkbox"/> 2-piece <input type="checkbox"/> Welded <input type="checkbox"/> Aluminum Can <input type="checkbox"/> 3-piece <input type="checkbox"/> Cemented 3. <input type="checkbox"/> Glass or Ceramic 4. <input type="checkbox"/> Flexible Pouch (specify material): _____ 5. <input type="checkbox"/> Semirigid (specify material): Lid _____ Body _____ 6. <input type="checkbox"/> Other (specify): _____			
PROCESS ESTABLISHMENT SOURCE (Limit entry to 30 characters) _____		DATE LAST ESTABLISHED ____ / ____ / ____		PROCESS RECOMMENDATIONS ATTACHED? <input type="checkbox"/> YES <input type="checkbox"/> NO	
C. CRITICAL FACTORS: AS DELINEATED BY PROCESS AUTHORITY TO ASSURE COMMERCIAL STERILITY (Check or Describe)					
None of the following _____ Maximum Water Activity (a _w) _____ Consistency / Viscosity _____ Value _____ Units _____ Method Name _____ Temperature _____ Container Position in Retort _____ Nesting of Containers _____ Fill Method (check applicable method) _____ Hand or Volumetric _____ Vibrating or Tumble _____ Other (specify) _____ % Solids _____ Solid to Liquid Ratio (wt. to wt.) _____ Drained wt./Net wt. Ratio _____		NO <input type="checkbox"/> MW <input type="checkbox"/> (* ____) CV <input type="checkbox"/> (____ * ____) CP <input type="checkbox"/> _____ NC <input type="checkbox"/> _____ FM <input type="checkbox"/> _____ SO <input type="checkbox"/> (____ * ____) SL <input type="checkbox"/> (____ * ____) DW <input type="checkbox"/> (____ * ____)		Arrangements of Pieces in Container _____ Formulation Changes _____ Preparation Method _____ Product Quality _____ Matting Tendency _____ Layer Pack _____ Max. Flexible Pouch/Semirigid Container Thickness in Retort _____ Max. Residual Air (Flexible Pouch/Semirigid Container) _____ Particle Size _____ Syrup Strength _____ Starch Added _____ Max. % _____ Type _____ Other Binder _____ Min. % Moisture of Dry Ingredients _____ Other (specify) _____	
AP <input type="checkbox"/> _____ FC <input type="checkbox"/> _____ PM <input type="checkbox"/> _____ PQ <input type="checkbox"/> _____ MT <input type="checkbox"/> _____ LP <input type="checkbox"/> _____ MP <input type="checkbox"/> (____ * ____) MR <input type="checkbox"/> (____ * ____) c.c. PS <input type="checkbox"/> _____ SS <input type="checkbox"/> (____ * ____) SA <input type="checkbox"/> (____ * ____) OB <input type="checkbox"/> _____ MM <input type="checkbox"/> (____ * ____) OT <input type="checkbox"/> _____		NOTE: No commercial processor shall engage in the processing of low-acid or acidified foods unless completed Forms FDA 2541 and FDA 2541a have been filed with the Food and Drug Administration, 21 CFR 108.25(c)(1) and (2) and 108.35(c)(1) and(2).			

FORM FDA 2541a (10/08) Page 1 PREVIOUS EDITION IS OBSOLETE PSC Graphics: (301) 443-1390 EF

Anexo III- Especificações assépticas para os equipamentos dos sistemas assépticos.

<u>PRODUCT STERILIZER SPECIFICATIONS</u>	
1	Sterilizing medium
2	Minimum sterilizing temperature
3	Minimum time
4	Minimum back pressure

<u>START UP SPECIFICATIONS TO ACHIEVE COMMERCIAL STERILITY IN SPECIFIED EQUIPMENT AREAS</u>							
		(a) Filling Chamber	(b) Filing Equipment	(c) Sterilizing Chamber for Containers	(d) Sterilizing Chamber for Lids	(e) Container Closing Area	(f) Container Closing Equipment
5	Sterilizing Medium used						
6	Minimum Temperature of Sterilizing Medium (°F)						
7	Minimum flow rate (gal/min)						
OR							
8	Minimum pressure of sterilizing medium (psi)						
9	Minimum time for circulating (exposure to) the sterilizing medium (min)						

<u>SPECIFICATIONS TO ACHIEVE AND/OR MAINTAIN (AS INDICATED) COMMERCIAL STERILITY OF SPECIFIED EQUIPMENT AND/OR AREAS</u>					
		(a)	(b)	(c)	(d)
		Achieve and Maintain		Filing Area	Closing Area
		Containers	Lids	Maintain	Maintain
10	Sterilizing Medium used				
11	Minimum temperature of sterilizing medium				
12	Minimum concentration of sterilizing medium (if chemical)				
13	Minimum exposure time				
OR					

14	Maximum Conveyor Speed				
15	FOR STERILIZING GASES ONLY Minimum Gas flow rate through chamber				
OR					
16	Minimum gas pressure required in chamber				

<u>SPECIFICATIONS TO FILTERS FOR THE FILLING AND CLOSING AREAS</u>		
17	(a)	Maximum operating time interval
	(b)	Sterilization cycles permitted between filter changes

Fonte: USFDA, 2001.

Anexo IV- Dispositivo para abertura das tampas das embalagens BIB e pontos de amostragem (1 e 2).



Anexo V- Câmaras incubadoras com amostras de leite UHT em embalagens BIB.



Anexo VI- Ficha para as análises sensoriais.**ANÁLISE SENSORIAL DE LEITE UHT INTEGRAL**

Por favor, prove as amostras de leite UHT integral e responda as duas perguntas na ficha que lhe foi entregue*:

***Favor realizar uma pequena pausa entre as degustações, com um enxágüe da boca ou comendo um pedaço de biscoito água e sal, para minimizar o efeito da fadiga sensorial.**

Escala para avaliação da segunda pergunta*

*(Quanto você gostou ou desgostou de cada amostra?)

9 - Gostei extremamente (Adorei)

8 - Gostei muito

7 - Gostei moderadamente

6 - Gostei ligeiramente

5 - Nem gostei/Nem desgostei

4 - Desgostei ligeiramente

3 - Desgostei moderadamente

2 - Desgostei muito

1 - Desgostei extremamente (Detestei)

Nome: _____

Data: _____

Amostra	1) Você consumiria esse produto?		2) Qual a nota você daria segundo a escala?
	Sim	Não	
_____	()	()	_____
_____	()	()	_____
_____	()	()	_____
_____	()	()	_____

Questionário de Recrutamento de Provedores

1. Nome: _____
2. Idade: _____
3. Sexo: feminino masculino
4. Você costuma consumir leite?
 sim não
5. Com que frequência você costuma consumir leite?
 todos os dias
 uma vez por semana
 a cada quinze dias
 uma vez por mês
 menos de vez por mês
6. Quais os fatores que determinam sua escolha na hora de comprar leite? Enumere as opções em ordem de importância, sendo 1 o fator mais importante.
 se é pasteurizado (não longa vida)
 se é longa vida
 preço
 marca
 sabor
 valor calórico
 outro. Qual? _____
9. Você é alérgico a algum tipo de alimento?
 sim não
10. Se você respondeu sim à pergunta anterior, qual(is)?

Anexo VII- Resultados da certificação da Área Limpa.



CCL
CONTROLE E VALIDAÇÃO

CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Cliente: Faculdade de Engenharia de Alimentos
Sector: Área Limpa
Sala: Sala de Envase

Testes a realizar

	A realizar
1) Vazão e Trocas de ar / hora	X
2) Diferencial de Pressão	X
3) Contagem Eletrônica de Partículas	X
4) Temperatura e Umidade do Ar	X
5) Teste de Recuperação	-
6) Integridade de Filtros Absolutos	X
4) Nível de Ruído	-
5) Luminosidade	-

Medidas da Sala

	Dimensão [m]		Nº Leituras (mínimo)
Largura	3,35		
Comprimento	4,00		
Altura	2,48		4
Área		15,80	
Volume		39,18	

1) Vazão e Trocas de Ar

Difusor	Vazão	Projeto	Resultado	ΔP [mmca]
1	1856	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-

2) Diferencial de Pressão

Sala	Positiva	Negativa	ΔP [mmca]	Especificado	Resultado
Sala Envase		Plta. Processamento	2,34	-	Conforme
Sala Envase		Ante câmara	0,02	-	Conforme

Variação admitida [%]

Especificado	1650
Vazão mínimo admitido	
Vazão [m³/h]:	1856,00
Vazão máximo admitido	

Volume da sala [m³]: 39,18
Trocas de ar m³/hora 47,37
Especificado -

Area da sala [m²]: 15,80
Trocas de ar m³/hora 117,47
Especificado 45,00
Conforme

Observações

Avaliação da Sala

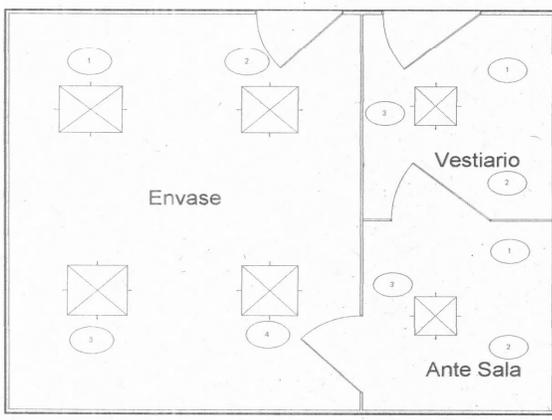
Conforme

Técnico

Noberto / Lucas

Cliente

Sr. Cláudio



Desenho da Sala

Folha	1 de 3
Data	17/11/2009

14



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Sala: Sala de Envase
 N° de Pontos: 4
 N° de pessoas: 3
 Estado: Repouso

3) Contagem Eletrônica de Partículas

Pontos	Partículas/m³	
	0,5 µm	5 µm
1	21013	462
2	27446	462
3	42133	1884
4	83840	782
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		

Soma	174.434	3.590
Leituras	4	4
Média	43.609	898
Desvio	28.240	675
Erro	14.120	337
UCL	77.496	1.707
Solicitado	352.000	2.930
K 95%	2,40	2,40

Classe da Área:	ISO	Solicitado	Resultado
			7

Folha	2 de 3
Data	17/11/2009

4) Temperatura e Umidade

Pontos	Temperatura	Umidade
	[°C]	[%]
1	18	51
2	18	51
3	18	51
4	18	51
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		

Min. Solicitado		
Média	18,00	51,00
Máx. Solicitado	24,00	60,00
Resultado	Conforme	Conforme

Observações

Cada ponto de leitura de temperatura e umidade teve um tempo de duração de um minuto.



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Cliete: Faculdade de Engenharia de Alimentos
Sotor: Área Limpa
Sala: Sala de Envase

5) Teste de Recuperação

Classe Encontrada	Classe Superior
ISO 7	ISO
Início	-
Término	-
Tempo total	-
Aceitação	-

6) Integridade de Filtros Absolutos

Filtro	Leitura	Resultado	Concentração [µg / lt.]
1	0,0017	Conforme	-
2	0,0022	Conforme	-
3	0,0028	Conforme	-
4	0,0023	Conforme	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
Leitura Máxima [%]	0,01		
Eficiência [%]	99,99		

7) Nível de Ruído

Pontos a medir (mínimo)	Leitura [dBA]	Resultado
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
Média	-	-
Aceitação	-	-
Valor máximo recomendado	-	-

Observações

Folha	3 de 3
Data	17/11/2009

8) Luminosidade

Pontos a medir (mínimo)	Leitura [Lux]	Resultado
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
Média	-	-
Aceitação	-	-
Valor mínimo recomendado	-	-

Impressão da Contagem de Partículas

```

STORED DATA
UNIT= UCL
#LOCATIONS
PROGRAM=
#SAMPLES = 4

ID= SALA ENVASE 17/11/09
SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
TIME 38.5 35.0 FLOW
14:49:4 21013 462 49.5

ID= P2 17/11/09
SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
TIME 38.5 35.0 FLOW
14:51:34 27448 49.5

ID= P3 17/11/09
SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
TIME 38.5 35.0 FLOW
14:53:3 42133 1864 49.5

ID= P4 17/11/09
SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
TIME 38.5 35.0 FLOW
14:54:07 83840 782 49.5
    
```

ISO 14644-1 REPORT

```

UNIT= UCL
ISO CLASS 7 (AT 0.5 µM)
17/11/09 14:55:52
START 17/11/09 14:49:43
END 17/11/09 14:54:07

PROGRAM=
SAMPLE VOLUME = 1.0CF
SIZE = 38.5µM AVERAGE AVERAGE
ID #SAMPLES COUNTS CONC/CM
SALA ENVASE 1 591.0 21013.3
P2 1 772.0 27448.9
P3 1 1395.0 42133.3
P4 1 8384.0 83840.0

MEAN OF AVERAGES = 43508.9
STANDARD DEVIATION = 28209.6
STANDARD ERROR = 4413.7
95% UCL = 77496.4
    
```

PASS

ISO 14644-1 REPORT

```

UNIT= UCL
ISO CLASS 7 (AT 0.5 µM)
17/11/09 14:55:52
START 17/11/09 14:49:43
END 17/11/09 14:54:07

PROGRAM=
SAMPLE VOLUME = 1.0CF
SIZE = 38.5µM AVERAGE AVERAGE
ID #SAMPLES COUNTS CONC/CM
SALA ENVASE 1 13.0 462.2
P2 1 13.0 462.2
P3 1 53.0 1864.4
P4 1 22.0 782.2

MEAN OF AVERAGES = 43.0
STANDARD DEVIATION = 13.0
STANDARD ERROR = 3.07
95% UCL = 77.0
    
```

PASS



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Cliente: Faculdade de Engenharia de Alimentos
Setor: Área Limpa
Sala: Ante Sala

Testes a realizar

	A realizar
1) Vazão e Trocas de ar / hora	X
2) Diferencial de Pressão	X
3) Contagem Eletrônica de Partículas	X
4) Temperatura e Umidade do Ar	X
5) Teste de Recuperação	-
6) Integridade de Filtros Absolutos	X
4) Nível de Ruído	-
5) Luminosidade	-

Medidas da Sala

	Dimensão [m]		
Largura	2,00		
Comprimento	1,46		N° Leituras (mínimo)
Altura	2,48		2
Área	2,96		
Volume	7,34		

2) Diferencial de Pressão

Sala	Positiva	Negativa	AP [mmca]	Especificado	Resultado
Ante Sala		Vestibulo	0,03	-	Conforme
Sala de Envase		Ante Sala	0,02	-	Conforme

1) Vazão e Trocas de Ar

Difusor	Vazão	Projeto	Resultado	ΔP [mmca]
1	184	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-

Varição admitida [%]

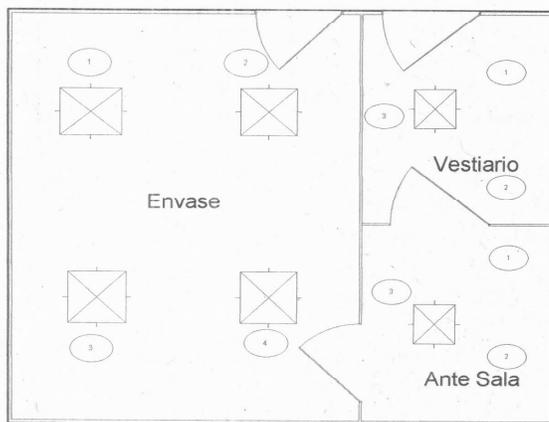
Especificado	-
Vazão mínimo admitido	-
Vazão [m³/h]:	184,00
Vazão máximo admitido	-

Volume da sala [m³]:	7,34
Trocas de ar m³/hora	25,07
Especificado	-

Area da sala [m²]:	2,96
Trocas de ar m³/hora	62,16
Especificado	-

Observações

Sem observações.



Desenho da Sala

Folha	1 de 3
Data	17/11/2008

Avaliação da Sala
Conforme
Técnico
Herberto / Lucas
Cliente
Sr. Cláudio



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Cliente: Faculdade de Engenharia de Alimentos
Setor: Área Limpa
Sala: Ante Sala.

5) Teste de Recuperação

Classe Encontrada	Classe Superior
ISO 8	ISO
Início	-
Término	-
Tempo total	-
Aceitação	-

6) Integridade de Filtros Absolutos

Filtro	Leitura	Resultado	Concentração [µg / ft.]
1	0,0012	Conforme	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
Leitura Máxima [%]	0,01		
Eficiência [%]	99,99		

7) Nivel de Ruído

Pontos a medir (mínimo)	Leitura [dBA]	Resultado
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
Média	-	-
Aceitação	-	-
Valor máximo recomendado	-	-

Observações

ISO 14644-1 REPORT

UNIT= CCL
 ISO CLASS 0 (AT 0.5 µM)
 17/11/09 15:02:12
 START 17/11/09 15:00:19
 END 17/11/09 15:01:54
 PROGRAM=
 SAMPLE VOLUME = 1.0CF
 SIZE = 0.5µM

ID	#SAMPLES	COUNTS	CONC/CM
ANTE SALA	1	2962.0	105315.6
P2	1	1944.0	69120.0
P3	1	2507.0	90204.4

MEAN OF AVERAGES = 80213.3
 STANDARD DEVIATION = 10179.7
 STANDARD ERROR = 10496.1
 95% UCL = 110652.0
 PASS

ISO 14644-1 REPORT

UNIT= CCL
 ISO CLASS 0 (AT 5.0 µM)
 17/11/09 15:03:10
 START 17/11/09 15:00:19
 END 17/11/09 15:01:54
 PROGRAM=
 SAMPLE VOLUME = 1.0CF
 SIZE = 5.0µM

ID	#SAMPLES	AVERAGE COUNTS	AVERAGE CONC/CM
ANTE SALA	1	131.0	4657.8
P2	1	75.0	2666.7
P3	1	136.0	4835.6

MEAN OF AVERAGES = 4653.3
 STANDARD DEVIATION = 1204.2
 STANDARD ERROR = 695.2
 95% UCL = 6069.5
 PASS

8) Luminosidade

Pontos a medir (mínimo)	Leitura [Lux]	Resultado
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
Média	-	-
Aceitação	-	-
Valor mínimo recomendado	-	-

Impressão da Contagem de Partículas

CORED DATA

UNIT=
 ALLOCATION= 2 #SAMPLES = 3
 PROGRAM=
 ID= ANTE SALA 17/11/09
 SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
 TIME 0.5 75.0 FLOW
 15:00:19 100210 4657 49.5
 ID= P2 17/11/09
 SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
 TIME 0.5 75.0 FLOW
 15:01:07 69120 2666 49.5
 ID= P3 17/11/09
 SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
 TIME 0.5 75.0 FLOW
 15:01:54 90204 4835 49.5

Folha	3 de 3
Data	17/11/2009



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Cliente: Faculdade de Engenharia de Alimentos
Sector: Área Limpa
Sala: Vestiário

Testes a realizar

	A realizar
1) Vazão e Trocas de ar / hora	X
2) Diferencial de Pressão	X
3) Contagem Eletrônica de Partículas	X
4) Temperatura e Umidade do Ar	X
5) Teste de Recuperação	-
6) Integridade de Filtros Absolutos	X
4) Nível de Ruído	-
5) Luminosidade	-

Medidas da Sala

	Dimensão [m]		Nº Leituras (mínimo)
Largura	2,00		
Comprimento	1,46		
Altura	2,48		
Área	2,92		2
Volume	7,24		

2) Diferencial de Pressão

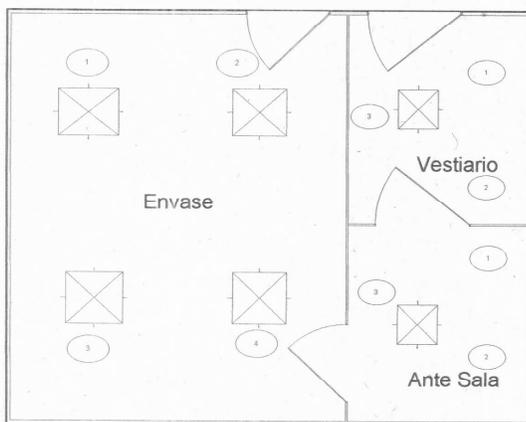
Sala	Positiva	Negativa	ΔP [mmca]	Especificado	Resultado
Vestiário		PI Processamento	1,38	-	Conforme
Ante Câmara		Vestiário	0,03	-	Conforme

1) Vazão e Trocas de Ar

Difusor	Vazão	Projeto	Resultado	ΔP [mmca]
1	196	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-

Variação admitida [%]	-
Especificado	-
Vazão mínimo admitido	-
Vazão [m³/h]:	196,00
Vazão máximo admitido	-
Volume da sala [m³]:	7,24
Trocas de ar m³/hora	27,07
Especificado	-
Área da sala [m²]:	2,92
Trocas de ar m³/hora	67,12
Especificado	-

Observações
Sem observações



Desenho da Sala

Folha	1 de 3
Data	17/11/2009

Avaliação da Sala
Conforme
Técnico
N.º Alberto / Lucas
Cliente
Sr. Claudio



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Sala: Ante Sala
 N° de Pontos: 3
 N° de pessoas: 1
 Estado: Repouso

3) Contagem Eletrônica de Partículas

Pontos	Partículas/m ³	
	0,5 µm	5 µm
1	105422	3448
2	142506	5582
3	86044	3766
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-
26	-	-
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	-	-
37	-	-
38	-	-
39	-	-
40	-	-
41	-	-
42	-	-
Soma	333.972	12.798
Leituras	3	3
Média	111.324	4.266
Desvio	28.690	1.151
Erro	16.564	664
UCL	159.360	6.193
Solicitado	-	-
K 95%	2,90	2,90

Classe da Área:	ISO	Solicitado	Resultado
			8

Folha	2 de 3
Data	17/11/2009

4) Temperatura e Umidade

Pontos	Temperatura	Umidade
	[°C]	[%]
1	18,3	50,8
2	18,3	50,8
3	18,3	50,8
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-
26	-	-
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	-	-
37	-	-
38	-	-
39	-	-
40	-	-
41	-	-
42	-	-
Mín. Solicitado	-	-
Média	18,30	50,80
Máx. Solicitado	-	-
Resultado	-	-

Observações



CERTIFICAÇÃO DE ÁREA LIMPA

Cliente: Faculdade de Engenharia de Alimentos
Setor: Area Limpa
Sala: Vestiário

5) Teste de Recuperação

	Classe Encontrada	Classe Superior
ISO	8	ISO
Início		
Término		
Tempo total		
Aceitação		

6) Integridade de Filtros Absolutos

Filtro	Leitura	Resultado	Concentração [µg / lt.]
1	0,0015	Conforme	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-

Leitura Máxima [%] 0,01
 Eficiência [%] 99,99

8) Luminosidade

Pontos a medir (mínimo)		
Ponto	Leitura [Lux]	Resultado
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
Média	-	-
Aceitação	-	-

Valor mínimo recomendado

Impressão da Contagem de Partículas

STORF A

UNIT= CCL
 #LOCATIONS = 3 #SAMPLES = 3
 PROGRAM=

ID= VESTIARIO 17/11/09
 SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
 TIME 38.5 35.8 31.4
 15:10:27 145422 3448 39.5

ID= P2 17/11/09
 SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
 TIME 8.5 35.8 FLOW
 15:11:15 142586 5582 49.5

ID= P3 17/11/09
 SAMPLE VOL= 1.0CF COUNTS/CM
 TIME 38.5 35.8 FLOW
 15:12:08 86844 3768 49.5

7) Nível de Ruído

Pontos a medir (mínimo)		
Ponto	Leitura [dBA]	Resultado
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
Média	-	-
Aceitação	-	-

Valor máximo recomendado

Observações

ISO 14644-1 REPORT

UNIT= CCL
 ISO CLASS 8 (AT 0.5 µM)
 17/11/09 15:13:17
 START 17/11/09 15:10:27
 END 17/11/09 15:12:08

PROGRAM= SAMPLE VOLUME = 1.0CF
 SIZE = >= 0.5µM

ID	#SAMPLES	AVERAGE COUNTS	AVERAGE CONC/CM
VESTIARIO	1	2965.8	185422.2
P2	1	4888.8	142586.7
P3	1	2428.8	86844.4

MEAN OF AVERAGES = 111324.4
 STANDARD DEVIATION = 28649.1
 STANDARD ERROR = 16.64.2
 95% UCL = 153168.8

PASS

ISO 14644-1 REPORT

UNIT= CCL
 ISO CLASS 8 (AT 5.0 µM)
 17/11/09 15:13:16
 START 17/11/09 15:10:27
 END 17/11/09 15:12:08

PROGRAM= SAMPLE VOLUME = 1.0CF
 SIZE = >= 5.0µM

ID	#SAMPLES	AVERAGE COUNTS	AVERAGE CONC/CM
VESTIARIO	1	97.0	3448.9
P2	1	157.0	5582.2
P3	1	106.0	3768.9

MEAN OF AVERAGES = 4266.7
 STANDARD DEVIATION = 1158.5
 STANDARD ERROR = 664.2
 95% UCL = 6192.9

PASS

Folha	3 de 3
Data	17/11/2009

Anexo VIII- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 23/02/10
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 072/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0058.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMA ASSÉPTICO PARA LEITE LONGA VIDA EM EMBALAGEM FLEXÍVEL INSTITUCIONAL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Claudio Fernandes Cardoso

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/02/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/02/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Desenvolver um sistema asséptico piloto para leite longa vida em embalagens flexíveis institucionais do tipo “Bag-in-Box” (laminado flexível de polietileno de baixa densidade e poliéster metabolizado) visando atender a demanda atual das indústrias de leite pasteurizado; Verificar o desempenho do sistema piloto através de identificação e monitoramento sistêmico de pontos de controle do processo; Estimar a vida útil do produto através de testes de esterilidade comercial e de estabilidade, bem como análise sensoriais e físico-químicas do produto; Avaliar a adequação do sistema de embalagem com relação à vida útil do produto.

III - SUMÁRIO

Serão utilizados 400 litros de leite para cada processamento. O leite recepcionado, da ordenha do dia, será imediatamente processado e embalado, sob condições assépticas, e este armazenamento a temperatura ambiente por até 60 dias. Serão processados, em dias diferentes 4 lotes de leite. Os parâmetros do processamento estão definidos no item Esterização e Homogeneização. As diferentes amostras de leite longa-vida embaladas em “Bag-in-Box” serão avaliadas por uma equipe de 50 provadores, não treinados, consumidores habituais de leite UHT, através de testes de aceitação utilizando escala hedônica estrutural mista de 9 pontos. Será usada um ficha de avaliação. As amostras serão apresentadas monodicametes em copos de plásticos de 30ml a uma temperatura na faixa de 10° a 15°C. As avaliações serão realizadas em diferentes fazes do período de estocagem, conforme recomendação da ASTM.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de projeto de doutorado muito bem escrito e estruturado, com objetivos claros e metodologia adequada, utilizando-se de tecnologia já disponíveis no Departamento de Tecnologia de Alimentos/UNICAMP. Não oferece risco ao sujeito, desde que este não tenha alergia a leite. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequadamente redigido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 2 -

Anexo IX- Certificado de irradiação das embalagens.

		COMPANHIA BRASILEIRA DE ESTERILIZAÇÃO Rod. Dom Pedro I, Km 89,5 - Bairro Ponte Alta Jarinu - SP - Caixa Postal 149 - CEP 13240-000 Tel/Fax: 4417-1344 - www.cbesa.com.br			
CERTIFICADO DE IRRADIAÇÃO DE PRODUTOS CERTIFICATE FOR IRRADIATION TREATMENT					
Nº SCH.CI.0041.10					
Certificamos que o(s) produto(s) abaixo descrito(s) foram tratados por energia ionizante (raios gama - Co ⁶⁰) conforme solicitação da Empresa:			We certify that the product listed below has been treated by Ionizing Radiation (gamma rays - Co ⁶⁰) as solicited by the Company:		
SCHOLLE LTDA			CNPJ: 004.059.495/0001-85		
NOTA FISCAL DO FABRICANTE OWNER INVOICE		001315/3		DATA DATE	
29/01/2010					
ORDEM DE SERVIÇO SERVICE ORDER		SCH.OS.0016.10		DATA DO PROCESSO PROCESS DATE	
31/01/2010					
CÓDIGO/ CODE	PRODUTO/ PRODUCT	LOTE/ BATCH	QUANTIDADE/ QUANTITY	UNIDADE/ UNITY	DOSE MÍNIMA/Kg MINIMUM DOSE/Kg
300049	BS PLST 0002L AVHM 800/800R CR		1650,000	PC	
					
OBSERVAÇÕES/NOTE					
Dose Ref.: 16,25 kGy. Dose Min.: 15,11 kGy. Dose Max.: 31,36 kGy.				LOTE: B003561-001	
UNIDADE DE DOSE ABSORVIDA - kGy (QUILOGRAY)					
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL: FERNANDO REICHMANN AUTHORIZED OFFICER:					
				FGQ 186 REV. 04	