

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

**Utilização do bioteste com esporos de *Bacillus subtilis*
na avaliação da integridade asséptica de embalagens
flexíveis esterilizáveis.**

Por
Celso Duarte Carvalho Filho
(Engenheiro Agrônomo)

Orientadora: Prof^a Pilar Rodriguez de Massaguer

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por CELSO DUARTE CARVALHO FILHO e aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de abril de 1996.

Campinas, SP
Abril, 1996.

Campinas, 08 de abril de 1996
PROFa.DRa. PILAR R. DE MASSAGUER
Presidente da Banca

Pilar R. de Massaguer

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	C253u
V.º	1
N.º	27596
ANO	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/05/96
N.º CFD	

CM-00087592-7

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

C253u

Carvalho Filho, Celso Duarte

Utilização do bioteste com esporos de *Bacillus subtilis* na avaliação da integridade asséptica de embalagens flexíveis esterilizáveis / Celso Duarte Carvalho Filho. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Pilar Rodriguez de Massaguer.

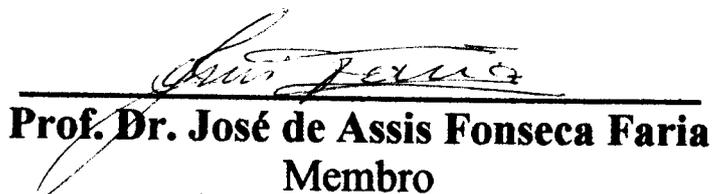
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Bioteste. 2. *Microfuros. 3. *Purê de banana. 4. *Bolsas esterilizáveis. 5. *Bacillus subtilis*. I. Rodriguez de Massaguer, Pilar. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

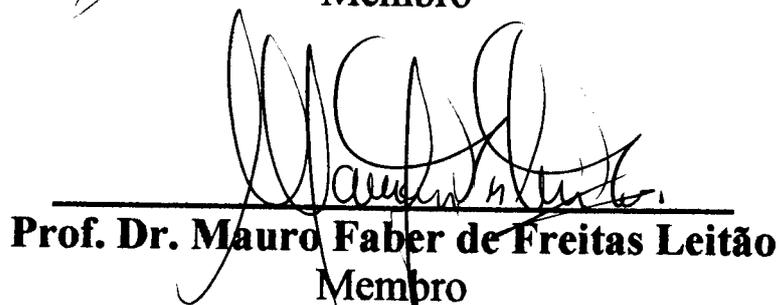
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
Membro



Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Membro

Prof. Dr. José Luiz Perreira
Membro

Campinas, _____ de _____ de 1996.

... " Partir para minha mais longa travessia, e, mesmo que ela só durasse esse único dia, eu havia escapado do maior perigo de uma viagem, da forma mais terrível de naufrágio: não partir "...

Amyr Klink

Dedico este trabalho :

*À minha esposa
À minha filha
À minha mãe
À minha sogra*

AGRADECIMENTOS

- À Profª. Drª. Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação, apoio e incentivo durante todo trabalho.
- À toda minha família pela paciência e carinho “injetado” durante esta jornada de dedicação e sacrifícios.
- Aos engenheiros Silvio Alves Ortiz e Lea de Oliveira e a técnica Christiane, do Centro de Tecnologia de Embalagem do ITAL, pelas orientações e colaborações na realização dos ensaios de desempenho das embalagens.
- Ao Engº Emersom da Pauletti pela ajuda recebida na realização do teste eletrolítico com as bolsas esterilizáveis.
- À Toyo Seikan Kaisha Ltd. pela doação das bolsas esterilizáveis.
- Aos membros do Departamento de Agricultura e Zootecnia da Faculdade de Agronomia do Médio São Francisco, Universidade do Estado da Bahia, pelo incentivo e constante apoio dispensado, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.
- À CAPES pelo apoio financeiro.
- Ao amigo e professor Miguel Fascio da Universidade Federal da Bahia que teve uma importância vital na minha decisão em fazer pós-graduação.
- Aos colegas: Augusto, Aurea, Cida, Fernando e à todos do Laboratório de Termobacteriologia pela amizade e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.
- Aos funcionários: Cláudio, Sr. Raimundo e Adalto, responsáveis pelo funcionamento da caldeira, e Valdeci pela ajuda no processamento do purê de banana.
- Um agradecimento especial aos amigos: Marcelo, Rosinha e Homero, pela amizade, alegria e pelo "alto astral" mantido durante as etapas mais difíceis desta minha conquista.

SUMÁRIO

Sumário	i
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vii
Lista de quadros	ix
Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii

1. INTRODUÇÃO.....1

2. OBJETIVOS4

2.1. OBJETIVO GERAL.....4

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....4

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....5

3.1. PURÊ DE BANANA: COMPOSIÇÃO E TECNOLOGIA 5

3.2. EMBALAGEM 6

3.2.1. Embalagens flexíveis esterilizáveis.....6

3.3. OTIMIZAÇÃO DA TERMOSSOLDAGEM 8

3.4. PROCESSAMENTO DAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS (B.E.) 10

3.4.1. Características do suporte de confinamento das bolsas 13

3.4.2. Volume máximo de enchimento 15

3.4.3. Influência da quantidade de ar residual dentro das bolsas 15

3.5. TESTES USADOS PARA DETECÇÃO DE VAZAMENTOS..... 17

3.5.1. Bioteste..... 17

3.5.2. Teste Eletrolítico..... 21

3.5.3. Outros testes..... 21

3.5.3.1. Método do corante fluorescente..... 22

3.5.3.2. Método de pressurização com gás Hélio..... 22

3.6. CARACTERÍSTICAS DO *B. subtilis* 23

3.7. UTILIZAÇÃO DO <i>Clostridium butyricum</i> COMO MICROORGANISMO ALVO DO PROCESSO	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. ALIMENTO UTILIZADO	27
4.1.1. Processamento do purê de banana	27
4.1.2. Medida da viscosidade	29
4.1.3. Determinação da carga microbiana inicial do purê de banana.....	29
4.2. EMBALAGEM	30
4.3. ADAPTAÇÃO DA AUTOCLAVE PARA PROCESSAR B.E.	30
4.3.1. Calibração dos termopares	31
4.3.2. Distribuição de temperatura dentro da autoclave	32
4.4. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A TERMOSSOLDAGEM DAS B. E.	36
4.5. ENSAIOS DE DESEMPENHO DAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS.....	37
4.5.1. Acondicionamento das amostras antes do ensaio	37
4.5.2. Avaliação visual da área de selagem.....	38
4.5.3. Verificação da ocorrência de fusão.....	38
4.5.4. Determinação da resistência das B.E. à delaminação.....	39
4.5.5. Determinação da resistência da termossoldagem à tração	39
4.5.6. Determinação da resistência das B.E. à pressão interna	40
4.5.7. Determinação da quantidade de ar residual dentro das bolsas.....	41
4.6. PROCESSAMENTO TÉRMICO DAS B.E.	42
4.6.1. Estabelecimento do valor de F requerido	42
4.6.2. Condições e variáveis dos processos térmicos aplicados.....	44
4.6.3. Resistência térmica do <i>Cl. butyricum</i> em purê de banana pH 4,6.....	45
4.6.3.1. Microrganismo	45
4.6.3.2. Produção de esporos.....	45
4.6.3.3. Quantificação da suspensão de esporos	47
4.6.3.4. Teste de crescimento no alimento.....	47
4.6.3.5. Ensaio do estabelecimento da resistência térmica do <i>Cl. butyricum</i> 18851 no purê de banana	47
4.6.4. Penetração de calor nas B.E.	48
4.6.5. Ensaio de esterilidade comercial.....	51
4.7. PREPARAÇÃO DOS MICROFUIROS	51
4.7.1. Enchimento das B.E.	53
4.8. METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i>	53

4.9. BIOTESTE COM ESPOROS DE <i>B. subtilis</i>	53
4.9.1. Ensaio de penetração do <i>B. subtilis</i> através dos microfuros formados em bolsas antes do processamento	55
4.9.2. Aplicação do bioteste em bolsas pós-processo	56
4.9.2.1. Confirmação do crescimento bacteriano	57
4.10. MEDIÇÃO DOS MICROFUFOS PELO MICROSCÓPIO	57
4.11. CONFIRMAÇÃO DOS MICROFUFOS PELO TESTE ELETROLÍTICO	58
4.12. RESUMO DA METODOLOGIA APLICADA NO BIOTESTE DE BOLSAS ESTERILIZÁVEIS	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO PURÊ DE BANANA	61
5.1.1. Determinação da viscosidade do purê de banana	61
5.1.2. Ensaio de determinação da carga microbiana inicial do purê de banana	65
5.2. OTIMIZAÇÃO DA SELADORA	65
5.2.1. Determinação do tempo de solda	65
5.2.2. Determinação do vácuo aplicado no fechamento das bolsas e do ar residual remanescente	67
5.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE DESEMPENHO DAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS ANTES E DEPOIS DO PROCESSO TÉRMICO	68
5.3.1. Aparência visual das soldas das bolsas	68
5.3.2. Determinação da presença de fusão na região de termossoldagem das bolsas esterilizáveis	69
5.3.3. Determinação da resistência das bolsas à delaminação	69
5.3.4. Determinação da resistência da termossoldagem à tração	70
5.3.5. Determinação da resistência das B.E. à pressão interna	71
5.4. ENSAIOS DE DISTRIBUIÇÃO DE CALOR NA AUTOCLAVE	72
5.5. ENSAIOS DE PENETRAÇÃO DE CALOR NAS B.E.	81
5.6. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DO <i>Clostridium</i> <i>butyricum</i> 18851 EM PURÊ DE BANANA pH 4,6	82
5.6.1. Crescimento do <i>Cl. butyricum</i> no purê de banana	82
5.6.2. Produção de esporos	83
5.6.3. Contagem da suspensão de esporos	83
5.6.4. Resistência térmica do <i>Cl. butyricum</i> 18851	83
5.6.5. Comparação da resistência térmica do <i>Cl. butyricum</i> com a do <i>Cl. botulinum</i> para o purê de banana com pH 4,6	91

5.7. MEDIÇÃO DOS MICROFUROS.....	93
5.8. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO <i>Bacillus subtilis</i> NO PURÊ DE BANANA.....	97
5.9. ENSAIOS DE PENETRAÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> EM MICROFUROS DE BOLSAS ESTERILIZÁVEIS ANTES DE SEREM TERMOPROCESSADAS.....	97
5.10. ENSAIOS DE PENETRAÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. subtilis</i> EM BOLSAS ESTERILIZÁVEIS PROCESSADAS TERMICAMENTE.....	98
5.11. CONFIRMAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>B. subtilis</i>	101
5.12. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO BIOTESTE COM O TESTE ELETROLÍTICO.....	101
5.13. HISTÓRIA TÉRMICA E LETALIDADE DOS PROCESSOS TÉRMICO APLICADOS NAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS.....	102
5.14. RESULTADOS DO ENSAIO DE ESTERILIDADE COMERCIAL...	103
6. CONCLUSÕES.....	106
7. REFERÊNCIAS BIBILOGRÁFICAS.....	108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fluxograma utilizado no processamento do purê de banana.....	28
FIGURA 2 - Disposição das bolsas individuais nas bandejas e a localização dos termopares no ensaio de distribuição de calor	34
FIGURA 3 - Detalhe dos blocos de bandejas, usados no processamento das bolsas esterilizáveis, montadas com espaçadores de 80 mm entre si.....	35
FIGURA 4 - Detalhe dos blocos de bandejas, usados no processamento das bolsas esterilizáveis, montadas com espaçadores de 40 mm entre si.....	35
FIGURA 5 - Dimensões recomendadas para o corpo-de-prova ASTM (1990).....	40
FIGURA 6 - Ensaio para determinação do ar residual das bolsas.	42
FIGURA 7 - Fixação e localização do termopar dentro da bolsa e o fio de aterramento.....	51
FIGURA 8 - Desenho esquemático da formação dos microfuros e localização da área da selagem que receberá a suspensão de <i>B. subtilis</i>	52
FIGURA 9 - Aparelho usado para determinação eletrolítica dos microfuros	59
FIGURA 10 - Fluxograma da metodologia aplicada na pesquisa.....	60
FIGURA 11 - Relação entre viscosidade aparente e velocidade de rotação para o purê de banana determinadas em três diferentes temperaturas	62
FIGURA 12 - Comportamento reológico do purê de banana em três diferentes temperaturas	63
FIGURA 13 - Variação da viscosidade aparente com a temperatura, no intervalo de velocidade de rotação média (30rpm)	64
FIGURA 14 - Gráfico comparativo dos tempos de subida ("come-up") obtidos dos ensaios de distribuição de temperatura realizados na ALLPAX no processamento de bolsas esterilizáveis	74
FIGURA 15 - Média das temperaturas por posição dos termopares usados no processamento de bolsas esterilizáveis (posições: frente/direita - frente/meio - centro)	77
FIGURA 16 - Média das temperaturas por posição dos termopares usados no processamento de bolsas esterilizáveis (posições: frente/direita - centro - fundo).....	78

FIGURA 17 - Estabilidade da temperatura na autoclave usando 7 blocos de bandejas no processamento de bolsas esterilizáveis (posições: frente/direita - centro e fundo).....	79
FIGURA 18 - Estabilidade da temperatura na autoclave usando 7 blocos de bandejas no processamento de bolsas esterilizáveis (posições: frente/direita - frente/meio e centro).....	80
FIGURA 19 - Resistência térmica do <i>Clostridium butyricum</i> 18851 a 92°C em purê de banana natural pH 4,6.....	87
FIGURA 20 - Resistência térmica do <i>Clostridium butyricum</i> 18851 a 95°C em purê de banana natural pH 4,6.....	88
FIGURA 21 - Resistência térmica do <i>Clostridium butyricum</i> 18851 a 98°C em purê de banana natural pH 4,6.....	89
FIGURA 22 - Valor de z do <i>Clostridium butyricum</i> 18851 em purê de banana natural pH 4,6.....	90
FIGURA 23 - Foto ampliada do microfuro formado com o fio de níquel-cromo de 97µm de diâmetro, ainda preso na área de selagem.....	94
FIGURA 24 - Foto ampliada do microfuro obtido com a retirada do fio de níquel cromo de 97µm de diâmetro da área de selagem.....	95
FIGURA 25 - Foto ampliada da seção transversal da área de selagem das bolsas esterilizáveis, onde se visualizam as camadas que constitui a estrutura do laminado.....	96
FIGURA 26 - História térmica do processamento de bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.....	104
FIGURA 27 - Gráfico da taxa letal da bolsa de aquecimento mais lento do processo II.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo dos ensaios realizados para avaliar o efeito do espaço entre blocos de bandejas na distribuição da temperatura dentro da autoclave.....	33
TABELA 2 - Condições de processo usadas nos ensaios de penetração de calor realizados em bolsas esterilizáveis contendo 130g de purê de banana	49
TABELA 3 - Determinação da viscosidade aparente do purê de banana em viscosímetro rotacional Brookfield LVT	61
TABELA 4 - Variação do índice do comportamento reológico do purê de banana com a temperatura.....	63
TABELA 5 - Ensaio de resistência à tração (Kgf/25mm), realizado a partir de amostras obtidas de bolsas vazias seladas na MINIVAC CV-18.....	66
TABELA 6 - Teste de estouro realizado em bolsas vazias seladas na MINIVAC CV-18	66
TABELA 7 - Condições selecionadas para otimizar a termossoldagem das bolsas esterilizáveis vazias.....	67
TABELA 8 - Condições selecionadas para otimização do vácuo aplicado nas bolsas esterilizáveis, contendo 130g de purê de banana, e com o tempo de solda de 5,67 segundos (escala 4 da seladora).....	68
TABELA 9 - Ensaio de resistência à delaminação da camada interna das bolsas seladas na MINIVAC CV-18 antes e depois do processo térmico	70
TABELA 10 - Ensaio de resistência térmica à tração da termossoldagem de bolsas seladas na MINIVAC CV-18, com o tempo de solda de 5,67 seg., antes e depois de serem processadas termicamente	71
TABELA 11 - Ensaio de pressão interna aplicado nas bolsas seladas com 25mmHg de vácuo, com tempo de solda de 5,67 seg., antes e depois de serem processadas termicamente	72
TABELA 12 - Resultados obtidos do ensaio I de penetração de calor em bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.....	81
TABELA 13 - Resultados obtidos do ensaio II de penetração de calor em bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.....	82
TABELA 14 - Resultados obtidos do ensaio III de penetração de calor em bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.....	82

TABELA 15- Valores de D a 92°C do <i>Cl. butyricum</i> em purê de banana pH 4,6.....	84
TABELA 16 - Valores de D a 95°C do <i>Cl. butyricum</i> em purê de banana pH 4,6.....	84
TABELA 17 - Valores de D a 98°C do <i>Cl. butyricum</i> em purê de banana pH 4,6.....	84
TABELA 18 - Valores médios de D usados no cálculo de z do <i>Cl. butyricum</i> 18851 em purê de banana natural.....	85
TABELA 19 - Comparação dos valores de D do <i>Cl. butyricum</i> em purê de banana pH 4,6 com valores obtidos em literatura	86
TABELA 20 - Comparação da composição do purê de banana com o molho de tomate com queijo usado no trabalho de XEZONES e HUTCHINGS (1965) para o cálculo dos valores de D do <i>Clostridium botulinum</i> tipo A	91
TABELA 21 - Comparação dos valores de Fo obtidos pelo DORIC 245A com os valores de F calculados pelo método de PATASHINIK (1953)	92
TABELA 22 - Comparação dos diâmetros dos fios usados na formação dos microfuros, com o diâmetro do furo medido pelo banco metalográfico	93
TABELA 23 - Resultados do poder de penetração dos esporos de <i>B. subtilis</i> em bolsas antes do processo	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Composição de alguns laminados mais utilizados para acondicionamento de alimentos termoprocessados.....	08
QUADRO 2 - Condições estabelecidas para o processamento das bolsas esterilizáveis na autoclave ALLPAX.....	44
QUADRO 3 - Parâmetros diferenciais da distribuição de temperatura com utilização de 7 blocos de bandejas para as posições frente/direita (FD) - frente/meio (FM) - centro(C)	75
QUADRO 4 - Parâmetros diferenciais da distribuição de temperatura com utilização de 7 blocos de bandejas para as posições frente/direita (FD) - fundo (FU) - centro(C)	76
QUADRO 5 - Ensaio I usando esporos de <i>B. subtilis</i> no bioteste (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) em bolsas pós-processo - contagem 48 horas	98
QUADRO 6 - Ensaio II usando esporos de <i>B. subtilis</i> no bioteste (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) em bolsas pós-processo - contagem 48 horas	99
QUADRO 7 - Ensaio III usando esporos de <i>B. subtilis</i> no bioteste (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) em bolsas pós-processo - contagem 48 horas	99
QUADRO 8 - Ensaio IV usando esporos de <i>B. subtilis</i> no bioteste (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) em bolsas pós-processo - contagem 48 horas	99
QUADRO 9 - Ensaio V usando esporos de <i>B. subtilis</i> no bioteste (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) em bolsas pós-processo - contagem 48 horas	100
QUADRO 10 - Ensaio VI foi avaliada a contaminação das bolsas pela água de resfriamento (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) - contagem 48 horas	100
QUADRO 11 - Resumos dos ensaios de penetração de <i>B. subtilis</i> em bolsas depois de serem termoprocessadas	101
QUADRO 12 - Resultados do teste eletrolítico aplicado às bolsas esterilizáveis depois de serem termoprocessadas	102

ABREVIATURAS

RTD = "resistance temperature detectors" - detector de temperatura por resistência.

D = tempo em minutos a uma temperatura T que reduz o número de microrganismos (células ou esporos) em 90%.

z = é o incremento da temperatura que ocasiona uma redução de 10 vezes no valor de D.

TDT = tempo, em minutos, a uma determinada temperatura, suficiente para destruir todas as células ou esporos presentes numa suspensão.

F₀ = letalidade em minutos a 121,1°C (z=10°C).

F = é o tempo de processo equivalente em minutos a uma determinada temperatura de referência para um valor selecionado de z.

N₀ = número inicial de microrganismos resistentes críticos por unidade.

N_f = ponto final do processo de preservação, número de microrganismos sobreviventes por unidade.

EVOH = etileno vinil álcool

PVDC = policloreto de vinilideno

PET = poliéster

Al = folha de alumínio

PP = polipropileno

NA = náilon

min = minuto

V = volts

seg = segundo

UFC = unidades formadoras de colônias.

Kpa = Kilo Pascal

ppm = partes por milhão

B = bloco

Bs = bolsa

P = processo

ppm = partes por milhão

NMP = Número Mais Provável

MIG = "mercury-in-glass" - termômetro de referência

centipoise = 10^{-3} N. sm²

N = Newton

fc = parâmetro do efeito da temperatura do resfriamento

fh = parâmetro do efeito da temperatura do aquecimento

jc = fator de atraso (lag) do resfriamento

jh = fator de atraso (lag) do aquecimento

Letras Gregas

μA = microâmpere

μm = micrômetro

τ = tensão de cisalhamento

γ = taxa de deformação

η_a = viscosidade aparente

RESUMO

Este trabalho teve por finalidade avaliar a integridade asséptica da selagem de topo das bolsas esterilizáveis, composta de um laminado de polipropileno (70 μ m), folha de alumínio (9 μ m), náilon (15 μ m) e poliéster (12 μ m) através de bioteste com esporos de *Bacillus subtilis* e, também, estabelecer o processo térmico adequado para produzir purê de banana comercialmente estéril nestas embalagens, processadas em autoclave por imersão total em água quente com sobrepressão. O produto selecionado foi purê de banana natural, variedade "nanica" (*Musa cavendish*, Lamb.) com pH 4,6 - 4,7 embalado (130g) em bolsas esterilizáveis de 130 x 170mm. Microfuros de diversos diâmetros foram intencionalmente formados nestas bolsas através de fios de níquel-cromo colocados na área de selagem de topo. Após autoclavagem, os fios foram retirados das embalagens e estas foram submetidas assepticamente a um contato direto com uma suspensão de esporos da referida bactéria durante 1 hora. Foi analisado o poder de penetração dos esporos através de diferentes diâmetros de microfuros formados pelos fios na área de selagem de topo das embalagens (diâmetros dos fios : 32, 48, 79 e 97 μ m). O bioteste foi aplicado em bolsas cheias antes e após o processo térmico do purê a 115°C. A penetração e crescimento do *B. subtilis* foi confirmada por ensaios bioquímicos e subcultura em meio agar nutriente, com prévia incubação das bolsas a 30°C por 7 dias. Estas embalagens foram posteriormente submetidas ao teste eletrolítico para confirmação dos microfuros detectados. O processo térmico adequado para o purê de banana, previamente inativado enzimaticamente (97°C por 5 min.), foi de 7,5 min. a 115°C equivalente a um Fo de 0,64 min., verificado pelo método geral e ensaios de esterilidade comercial. Foi notado que o processo térmico favoreceu a penetração dos esporos através de microfuros de menor diâmetro, pois enquanto que o bioteste detectou microfuros \geq 79 μ m com 87,5% de penetração antes do processo, o mesmo teste detectou penetração em microfuros \geq 48 μ m de diâmetro com 53,8% de penetração em bolsas testadas após o processo. O teste eletrolítico só foi capaz de detectar microfuros formados com fios de 79 μ m de diâmetro em 69,23% das amostras. Em ensaios realizados antes e depois do processo térmico não foi detectada penetração em bolsas com microfuros formados com fios de 32 μ m .

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the integrity of the top sealing area of retortable pouches formed by a laminate of polypropylene (70 μ m), aluminum foil (9 μ m), nylon (15 μ m) and polyester (12 μ m), using *Bacillus subtilis* spores as a biotest and also to establish the proper thermal process in order to produce commercially sterile banana puree, packed in pouches processed in a full water-immersion retort. The selected product was banana puree (130g), variety "nanica" (*Musa cavendish*, Lamb.), pH 4.6 - 4.7, packed in 130 x 170mm retortable pouches. Microholes of different diameters were intentionally made with nickel-chrome threads placed in the top seal area. After sterilization, the threads were withdrawn from the seals and the packages were tested using the spore test. A suspension of *B. subtilis* spores was aseptically left on the top seal for 1 hour. The capacity of the spores to penetrate through different microholes diameters (32, 48, 79 and 97 μ m) was evaluated. The biotest was carried out before and after processing the banana puree at 115 $^{\circ}$ C. *Bacillus subtilis* penetration and growth was confirmed by biochemical tests and subculture in nutrient agar after incubation of the pouches at 30 $^{\circ}$ C for 7 days. The tested packages were, latter, submitted to eletrolitic test for microholes confirmation. The proper thermal process for banana puree, previously bleached (97 $^{\circ}$ C for 5 min.), was 7,5 min. at 115 $^{\circ}$ C equivalent to an Fo of 0,64 min., confirmed by the general method evaluation and commercial sterility tests. It was noted that heat processing favored the penetration of spores at lower microholes sizes: while the spore test detected microholes of $\geq 79\mu$ m with 87,5% of penetration before processing, the same test detected penetrations through microholes $\geq 48\mu$ m with 53,8% penetration after processing. Eletrolitic test was only able to detect microholes formed with 79 μ m diameter threads, showing presence of microholes in 69,23% of the tested samples. No penetration was detected in pouches with microholes formed with 32 μ m tested before or after heat processing.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação instintiva do homem em fazer reservas necessárias à sua sobrevivência, leva-o a uma busca incessante ao domínio de novas técnicas que possam prolongar a vida útil dos alimentos com segurança e qualidade.

Hoje, considerando-se a extrema rapidez da evolução dos hábitos da sociedade de consumo, onde as pessoas buscam alimentos nutritivos e de pronta utilização, as bolsas esterilizáveis (B.E.) ou "retort pouch" (R.P.) estão, a cada dia, ganhando espaço no mercado de embalagens destinadas a produtos termoprocessados com maior vida-de-prateleira.

Os custos de transporte e distribuição de alimentos congelados, associados a problemas de disponibilidade energética, distância percorrida até o mercado varejista e a deficiência de infraestrutura na rede de conservação destes produtos colocam as bolsas esterilizáveis em situação vantajosa quando comparadas à tradicional lata, embalagens de vidro e produtos congelados. A incorporação da mulher ao trabalho profissional, dedicando pouco tempo no preparo de comidas tradicionais, também ajuda a promover, a médio e curto prazo, mudanças nos hábitos alimentares. Estas tendências despertam as indústrias nacionais para um melhoramento nas embalagens e no sistema de distribuição de seus produtos.

Este tipo de embalagem apresenta algumas vantagens sobre a lata e as embalagens de vidro, dentre elas: menor peso do conjunto produto/embalagem, diminuindo os custos com transporte; requer menor espaço na estocagem de embalagens vazias; a vida-de-prateleira de um produto embalado em B.E. é tão longa quanto a dos produtos congelados; apresenta uma qualidade igual ou superior a produtos conservados pelo frio; a interação produto/embalagem é menor do que na lata; fácil abertura; requer um tempo de preparação para o consumo imediato menor que os alimentos congelados e menor quantidade de energia gasta tanto para a sua fabricação quanto no processo de esterilização.

Em se tratando de uma embalagem destinada à alimentos, o item relacionado à quantidade de energia requerida no processamento é muito importante. No caso das bolsas, além de reduzir os custos na sua fabricação, permite-se obter um produto final de melhor qualidade, pois devido à facilidade e rapidez com que o calor penetra através de suas finas paredes, ocorre uma diminuição do tempo de processo. Segundo HEINTZ (1980), esta economia no ciclo de cozimento dos alimentos pode chegar a 40% ou mais. Estas bolsas são embalagens flexíveis de multicamadas, constituídas, principalmente, de polipropileno (PP) na camada interna, que propicia melhores condições de termossoldagem; uma camada intermediária com folha de alumínio (Al), que funciona como barreira à luz, umidade, oxigênio e microrganismos; uma camada de náilon (NA) e uma camada externa de poliéster (PET), que confere resistência e facilidade de impressão na embalagem.

O princípio básico de uma embalagem esterilizável é que a mesma deve proporcionar proteção ao alimento contra qualquer tipo de penetração de microrganismos. Quando esta embalagem é submetida diretamente ao processo de esterilização, a eficiência deste princípio deve ser seguramente checada, principalmente quando a mesma for processada utilizando a água como meio de aquecimento e resfriamento, o que é a prática mais comum para este tipo de embalagem.

Geralmente, nas etapas de resfriamento e manuseio pós-processo é que mais ocorre a contaminação de produtos embalados termoprocessados, através de possíveis defeitos provenientes da fabricação dos materiais que constituem as B.E. ou possíveis microfuros existentes na área de selagem, formados a partir da contaminação desta região pelo próprio produto na hora do enchimento, por condensação do vapor do alimento que é embalado à quente, por falhas na otimização da seladora ou, também, por falhas na otimização da contra pressão durante o processamento. Sendo assim, a utilização de água não tratada no resfriamento do processo poderá promover a contaminação das embalagens através de possíveis defeitos existentes nas mesmas, propiciando a penetração de microrganismos e conseqüente contaminação do alimento.

Vários métodos são utilizados na avaliação da integridade asséptica das embalagens, dentre eles o bioteste é o que melhor representa a realidade de contaminação, pois o teste se baseia na penetração de uma determinada bactéria através dos defeitos existentes na embalagem. Neste trabalho será utilizado o bioteste com uma suspensão de esporos de *B. subtilis*. Esta é uma metodologia nova e ainda não empregada nem referenciada em trabalhos publicados no Brasil, que, até o

momento, apenas um trabalho (ORTIZ, 1986) foi reportado utilizando o bioteste na avaliação da integridade de bolsas esterilizáveis, entretanto, foi utilizada uma suspensão de células viáveis de *Enterobacter aerogenes*.

O bioteste com esporos de *B. subtilis* apresenta algumas vantagens em relação à suspensão de *E. aerogenes*, tais como: facilidade de manipulação, estabilização da suspensão quando comparada com células viáveis e, principalmente, por apresentar maior sensibilidade na detecção de microfuros, pois, devido a seu menor tamanho, tem maior poder de penetração em microfuros com diâmetros muito pequenos. Sendo assim, o emprego do bioteste com suspensão de esporos de *B.subtilis*, na avaliação da integridade das B.E., irá determinar, com mais precisão, fatores críticos que podem comprometer as bolsas no decorrer do processo de esterilização, no manuseio pós-processo e/ou no transporte das mesmas até a mesa do consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho procura estabelecer parâmetros simples e práticos na determinação da integridade asséptica de bolsas esterilizáveis com a utilização do bioteste através de uma suspensão de esporos de *B.subtilis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar o menor diâmetro do microfuro, intencionalmente formado na selagem de topo da embalagem, capaz de ser detectado pelo método do bioteste, usando uma suspensão de esporos de *B. subtilis*.

Determinar as condições de processo das bolsas flexíveis de 130 x 170mm, na autoclave rotativa Allpax, para produzir um purê de banana microbiologicamente estável.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi feita até dezembro de 1995. Para facilitar o acompanhamento da literatura sobre o tema, esta revisão foi subdividida nos seguintes itens: características do purê de banana, da embalagem e do *Bacillus subtilis*, otimização da termossoldagem, processamento das bolsas, testes para detecção de vazamentos das bolsas esterilizáveis e aspectos sobre a utilização do *Clostridium butyricum* como microrganismo alvo do processo.

3.1. PURÊ DE BANANA: COMPOSIÇÃO E TECNOLOGIA

Segundo DE MARTIN *et al.* (1990) a banana consumida, crua ou processada, é um alimento altamente energético (cerca de 100 calorias por 100g de polpa), cujos hidratos de carbono (em torno de 22%) são facilmente assimiláveis. Contém vitaminas C, A, B₁ e B₂, e pequenas quantidades de D e E, e uma maior percentagem de potássio, fósforo, cálcio e ferro, quando comparada com a maçã ou laranja.

A banana verde contém um alto teor de amido, que se situa em torno de 20%, o que durante a maturação, se converte pelos enzimas (amilase) em açúcares com predominância dos redutores (glicose e frutose) encontrados na proporção de 8 a 10% da polpa, e de sacarose com 10 a 12%, além de outros açúcares presentes em menores quantidades. A percentagem de amido na banana completamente madura é muito baixa, situando-se em torno de 0,5 a 2%.

Considerando estas características, juntamente com a importância do aproveitamento dos excedentes de produção não exportáveis e não comercializáveis da fruta "in natura", o purê de banana merece atenção especial dentre os diversos produtos obtidos da banana, pois serve como matéria prima para a elaboração de um grande número de produtos, tais como: néctares, doces de massa, geléias, sorvetes, iogurtes, bolos, pudins, gelatinas e outros.

O purê de banana geralmente é comercializado em embalagens flexíveis de tamanho institucionais, conhecidas como "Bag-in-Box", e pequena quantidade em embalagens metálicas para o varejo, CHIQUITA BRAND (1994). A vantagem da utilização de embalagens não metálicas para o acondicionamento deste tipo de produto pode ser confirmado por estudos realizados por SEKHAR *et al.* (1991), pois foi demonstrado que produtos com um conteúdo rico em nitrato, como é o caso do purê de banana, são considerados como aceleradores potencial de corrosão da camada de estanho das latas. Neste trabalho eles usaram B.E. de poliéster / folha de alumínio / polipropileno e latas com uma camada de estanho como embalagens para o acondicionamento do purê. Após 8 semanas de estocagem, a uma temperatura de 25 - 30°C, ficou evidenciado uma redução do conteúdo de nitrato no produto enlatado, conseqüentemente, devido à participação na corrosão da camada de estanho. Entretanto, o conteúdo de nitrato do produto embalado nas B.E. não foi alterado no final das 8 semanas, indicando assim, que este tipo de produto pode ser seguramente embalado nestas bolsas.

Segundo CHIQUITA BRAND (1994) o pH do purê de banana da variedade nanica está em torno de 4,7 a 5,2, sendo perfeitamente enquadrado na faixa de alimentos de baixa acidez, que requerem um processamento térmico acima de 100°C.

YOKOYA e CRUVINEL (1969) realizaram uma pesquisa onde foi feito um estudo microbiológico de diversas variedades de bananas colhidas nas diversas regiões do Estado de São Paulo, como: Santos, Biguá, Registro e na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), em relação à incidência das bactérias que causam problemas à industrialização. O número total de bactérias encontrado foi da ordem de 3×10^5 por grama, número de bactérias esporogênicas ácido tolerantes de 10 a 300 por grama e o número de bactérias termófilas de 2 a 70 esporos por 100g do produto.

3.2. CARACTERÍSTICAS DAS EMBALAGENS

3.2.1. Embalagens flexíveis esterilizáveis

Os primeiros experimentos realizados com a finalidade de utilização das bolsas esterilizáveis, para conservação de alimentos, foram promovidas pelo exército norte

americano, com o objetivo de desenvolver uma embalagem mais simples e prática para as rações militares LAMPI (1977).

Na mesma época foram iniciadas pesquisas na Europa e Japão, onde este tipo de embalagem tomou um grande impulso na utilização comercial, LAMPI (1977). O início que marcou o lançamento das bolsas esterilizáveis no mercado de alimentos foi na comercialização de molho condimentado.

No Brasil, as pesquisas com as referidas embalagens destinadas ao mercado de alimentos, iniciou-se em 1979 com o projeto "Processamento de Alimentos em Embalagens Flexíveis Esterilizáveis", desenvolvido pelo Centro de Tecnologia de Embalagens de Alimentos (CETEA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP.

Este Centro desenvolveu a partir de 1981 vários projetos, dentre eles, o de "Desempenho de embalagens flexíveis para alimentos termoprocessados, quando submetidos à simulação de manuseio e transporte", ORTIZ (1986).

Segundo o CETEA (1981), as bolsas mais utilizadas pelo mercado civil consumidor tem as seguintes dimensões: 125 x 175mm, que são utilizadas na conservação de porções individuais com até 180g de alimentos prontos para consumo, e as embalagens de 200 x 250mm, que são denominadas institucionais, empregadas para alimentos semi-prontos e utilizadas em restaurantes industriais com aproximadamente 1000g de peso líquido.

De acordo com LOPEZ (1987), a aprovação final das B.E., para a conservação de alimentos de baixa acidez, foi concedida somente em 1977 pela "Food and Drug Administration - FDA". Segundo LAMPI (1977), estas bolsas devem ser construídas com materiais inertes e atóxicos; baixa permeabilidade a gases e umidade; baixa propriedade hidrofílica; devem ser aprovadas pela FDA; e ter resistência a óleos e gorduras e outros alimentos; resistência física a impactos e abrasão e proporcionar uma perfeita termossoldagem, mantendo assim, a hermeticidade após o tratamento térmico por calor úmido a 121°C durante 20 a 40 minutos.

Atualmente, existe uma grande variedade de laminados sendo utilizados na fabricação destas bolsas: o mais comum é constituído de poliéster/folha de alumínio/polipropileno e existe também as B.E. somente plásticas, onde a folha de alumínio é substituída por copolímeros de etileno e álcool vinílico (EVOH) ou

copolímeros de vinilideno (PVDC), ambos com propriedade de alta barreira. O Quadro 1 mostra a constituição de alguns laminados usados para alimentos termoprocessados.

Quadro 1 - Composição de alguns laminados mais utilizados para acondicionamento de alimentos termoprocessados.

TIPO DE EMBALAGEM	COMPOSIÇÃO DO MATERIAL
- B.E. com folha de alumínio	*12µm poliéster/ 7-9µm folha de alumínio/ 70µm de polipropileno.
	*12µm poliéster/ 15µm náilon/ 9µm de folha de alumínio/ 70µm polipropileno.
- B.E. sem folha de alumínio	*15µm náilon/ 70µm polipropileno.
	*12µm poliéster/ 15µm policloreto de vinilideno(ou etileno vinil álcool)/50µm polipropileno.

FONTE: YAMAGUCHI (1990).

Bolsas esterilizáveis produzidas pela Toyo Seikan do tipo " hiRP-F " composta de : 12µm de poliéster / 15µm de náilon / 7µm de folha de alumínio / 50 de polipropileno são opacas (barreira à luz) e permeabilidade nula em relação à água e oxigênio (TOYO SEIKAN, 1994).

Sendo assim, a escolha da composição e o tamanho ideal destas embalagens devem ser definidas pela natureza do alimento a ser embalado, vida-de-prateleira e custo para a sua fabricação, além dos resultados obtidos nos testes de avaliação da qualidade destas embalagens, tais como: resistência da termossoldagem à tração, resistência à delaminação e resistência à pressão interna.

3.3. OTIMIZAÇÃO DA TERMOSSOLDAGEM

A termossoldagem pode ser definida como a fusão da área interna de embalagens plásticas flexíveis pelo uso de calor e pressão, ou seja, é um processo no qual dois materiais soldáveis são unidos.

Na indústria de alimentos os métodos de termossoldagem mais utilizados são a barra aquecida e o impulso elétrico. Segundo OLIVEIRA (1995) a opção pelo método de termossoldagem depende de diferentes fatores, tais como: tipo de material a ser termosoldado, capacidade e formato da embalagem, velocidade da linha de produção e custo.

O processo de fechamento por barra aquecida consiste, comumente, na utilização de pares de barras de alumínio ou aço, que são mantidas a uma temperatura constante durante todo o ciclo da termossoldagem. Atualmente, a substituição de uma das barras metálicas por borracha de silicone vem sendo adotado com bastante êxito nestes equipamentos, pois a mesma garante maior uniformidade da pressão ao longo da superfície de fechamento.

As seladoras que utilizam o impulso elétrico na termossoldagem, são providas de uma resistência elétrica plana que é fixada ao longo de um dos mordentes. Quando estes mordentes se fecham sobre a embalagem, aplica-se automaticamente uma corrente elétrica através da resistência aquecendo-a e promovendo o fechamento da embalagem.

Segundo GUEDES *et al.* (1984) a determinação das condições ótimas de soldagem é muito importante para evitar que ocorram prejuízos, tais como: perda do produto embalado, das embalagens, do tempo de operação das máquinas de soldagem e das horas trabalhadas pelos operários.

Variações na temperatura, pressão e no tempo podem reduzir sensivelmente a resistência da solda. Existem duas maneiras de determinar estas condições: soldar o material pela máquina de produção, variando temperatura, pressão e tempo, ou determinar estas variáveis através de uma seladora de laboratório, onde nem sempre os valores obtidos podem ser diretamente transferidos à máquina industrial. Esta dificuldade na transferência para uma escala industrial, deve-se a uma série de fatores, como a tensão da bobina, formato da mandíbula e área de contato do filme com a matriz selante, que não ocorrem em máquinas de escala piloto.

CARDELLI (1992) utilizou na sua pesquisa uma seladora à vácuo (Selovac CV-60) para selagem de bolsas de 125 x 175mm. As mesmas foram colocadas dentro da câmara de vácuo inclinadas 30° e seladas por "impulso elétrico" sob vácuo de 20 pol. de mercúrio (67 KPa abs). A seladora utilizada era de escala de laboratório e sua otimização foi feita através de tentativas de combinação dos parâmetros que fornecem as condições ótimas de termossoldagem, entretanto, a termossoldagem conseguida não foi satisfatória, pois, apresentou rugas e bolhas visualmente detectadas, sendo necessário a realização de mais duas selagens seguida da primeira.

Através de uma comunicação pessoal com técnicos da Toyo Seikan Kaisha (1995), fabricantes das B.E. que serão usadas nesta pesquisa, sugeriram o uso da

termossoldagem do tipo impulso elétrico a qual indicaram algumas vantagens em relação ao de barra aquecida, tais como: selagem estável, sem apresentar deformações na área selada; menor consumo de energia elétrica, pois não existe a necessidade de se manter um aquecimento contínuo nas mandíbulas e possibilita o ajuste do tempo de selagem através de um controle de tempo de contato. Eles recomendaram uma faixa de temperatura para termossoldagem em torno de 200 - 220°C e um tempo de ciclo de termossoldagem de 1,5 - 2,0 segundos.

3.4. PROCESSAMENTO DAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS

Água aquecida com vapor e com sobrepressão de ar e mistura de ar/vapor, são os dois meios de aquecimento comumente utilizados na esterilização de alimentos de baixa acidez, contidos em embalagens de vidro e, recentemente, em embalagens flexíveis e semi-rígidas, tal como as bolsas flexíveis esterilizáveis e bandejas plásticas termoestáveis. Estes dois métodos de sobrepressão possuem em comum a capacidade de manter uma pressão maior do que a pressão dentro das B.E. durante o processamento. Este procedimento é necessário no período de aquecimento, para evitar a expansão dos gases dentro das bolsas e o retardo na transferência de calor, e durante o período de resfriamento, para proteger a integridade das embalagens, pois, como a pressão interna das bolsas passa a ser maior que a pressão do meio, esta providência evita um possível estouro das bolsas.

Processos de imersão em água quente com sobrepressão são os processos mais comuns utilizados para bolsas esterilizáveis. O uso de sistemas de vapor/ar no processamento de B.E. ainda sofre muitas restrições, pois existe a possibilidade da formação de zonas frias dentro da autoclave, produzindo um ambiente não homogêneo devido às falhas na mistura de ar com o vapor.

Quando o alimento é processado utilizando a água com sobrepressão, o coeficiente de transferência de calor pode ser um fator limitante. De acordo com CARDELLI (1992) a prática de se agitar a água, geralmente sendo feita através da injeção de ar comprimido junto ao vapor, favorece a transferência de calor superficial, pois como o calor transferido pela água é calor sensível, sua temperatura tende a diminuir ao circular sobre as embalagens com alimentos.

McGINNIS (1986) utilizando uma autoclave horizontal, marca FMC, detectou que a transferência de calor de superfície é dependente da localização do produto

dentro da bandeja, bem como do nível das bandejas. O coeficiente máximo de transferência de calor superficial foi mencionado, nesta pesquisa, juntamente com a localização do nível mediano das bandejas.

Geralmente o processamento de B.E. não utiliza autoclaves agitadas, ou seja, o processamento é feito de forma estática, sendo assim, a circulação do meio de aquecimento é extremamente importante para garantir uma perfeita transferência de calor para as embalagens. O meio de aquecimento deve transferir calor para a superfície do produto a uma taxa suficientemente alta para que a velocidade de aquecimento no ponto crítico dependa apenas das propriedades térmicas, tamanho e forma das partículas do alimento. Daí, a condição principal para se obter sucesso no processamento de embalagens flexíveis esterilizáveis está na perfeita adaptação do suporte de confinamento para B.E. na autoclave, pois a conservação do limite de espessura máxima destas bolsas durante todo o processamento e a fácil circulação do meio de aquecimento através de espaços livres, irão garantir a integridade das bolsas, assim como, assegurar que o produto receba o valor de esterilização requerido.

Como as B.E. são termoprocessadas geralmente à temperaturas elevadas, as áreas de selagem destas embalagens tornam-se vulneráveis à rupturas devido ao aumento da pressão interna provocado pelos gases residuais contido nos alimentos. Desta forma, para melhor controle da integridade destas bolsas faz-se necessário, além da boa qualidade do laminado e da perfeita termossoldagem, a adaptação da autoclave para conter a expansão máxima destas embalagens e o emprego de contra pressão de ar durante o processamento para evitar explosão das mesmas.

Caso esta expansão máxima não seja controlada, haverá uma modificação do ponto de aquecimento mais lento dentro da bolsa, tornando assim, o processo inválido para as condições pré estabelecidas. Neste caso, não dá para assegurar uma letalidade mínima no ponto crítico de aquecimento mais lento da embalagem.

Muitos trabalhos tem sido feitos com o intuito de estabelecer as condições ideais de processamento térmico de bolsas esterilizáveis. A FDA (1981) tem recomendado uma pressão total de ar de 193 Kpa (103 Kpa devido a temperatura de vapor de água e 90 Kpa de ar sobrepressão), utilizando água a 121°C.

LAMPI (1979) afirma que: se a quantidade de ar residual possa ser mantida a níveis baixos, nenhuma contrapressão será necessário, entretanto, como medida de segurança, deve-se atuar com 20,7 Kpa a 69 Kpa de sobrepressão acima da pressão

correspondente à temperatura de ajuste, para assegurar uma imobilização das bolsas e prevenir uma possível expansão durante o termoprocessamento.

Parâmetros críticos para o processamento de alimentos de baixa acidez em "retort pouch" foram estabelecidos pela FDA (1981), tais como:

1) Tamanho das B.E. - O tamanho exato das bolsas é muito importante no estabelecimento das condições de processamento, pois seu tamanho determinará a capacidade de contenção do alimento, além da maneira mais adequada de controle da sua expansão máxima e disposição no sistema de confinamento, durante o tratamento térmico.

2) Características de aquecimento do produto - Para produtos que apresentem características condutivas e que estão sendo processados em B.E., orientadas horizontalmente, a localização correta dos termopares é no centro geométrico da bolsa.

3) Peso líquido de enchimento - B.E. cheias acima do seu volume máximo tolerável apresentarão dificuldades na termossoldagem, com a contaminação da área de selagem, podendo sofrer danos na sua estrutura, com a formação de vincos, e serão prejudicadas no aquecimento do seu ponto mais frio.

4) Ar residual - A quantidade máxima aceitável de ar residual dentro das bolsas vai depender do seu tamanho e do processo térmico que serão submetidas. O excesso de ar dentro das bolsas pode alterar os valores de esterilização e poderá provocar explosão das mesmas.

5) Configuração do suporte de confinamento - Deve promover condições ótimas de circulação do meio de aquecimento através das embalagens, para garantir os valores de esterilização pré estabelecidos, e limitar a expansão máxima destas embalagens.

6) Meio de aquecimento - Pode-se usar no processamento de B.E. uma mistura de vapor/ar ou água quente com sobrepressão, sendo que, a mistura de vapor/ar irá reduzir, consideravelmente, os tempos de subida da temperatura ("come-up time") e resfriamento, entretanto, o mais comum é a utilização de água quente com sobrepressão.

A FDA também sugere que sejam realizados ensaios de distribuição de calor no meio de aquecimento e de penetração de calor em bolsas com alimentos sob as mesmas condições de processo.

As B.E. são termoprocessadas em tempos significativamente menores que as tradicionais latas de folhas-de-flandres. LAMPI (1979) comparou o processamento de B.E. com latas num mesmo processo para um $F_0 = 5.2$ min. e observou que as latas necessitaram de 35 minutos contra somente 10 minutos das bolsas para atingirem a letalidade desejada. Isto é atribuído ao fato de que as bolsas quase não oferecem resistência térmica ao aquecimento do produto, pois, devido ao seu perfil plano, o aquecimento do centro geométrico se dá muito mais rapidamente que na lata. Segundo o mesmo autor, esta vantagem permite que a distribuição do F_0 do centro da embalagem para o exterior não seja maior que 0,2 da unidade do F_0 .

3.4.1. Características do suporte de confinamento das bolsas

Os materiais mais comumente utilizados na fabricação destes suportes são o alumínio, o aço inox e o polipropileno. O alumínio possui uma maior condutividade térmica que o aço inox, contra uma maior resistência mecânica apresentada pelo aço, e o polipropileno, que é superior aos outros dois, apresenta uma grande desvantagem de ser muito caro.

PFLUG (1964) foi quem primeiro adaptou uma autoclave para o processamento de bolsas esterilizáveis. Foi utilizada uma autoclave vertical, escala piloto, a uma temperatura de processo de 116°C , com misturas de vapor/ar ou água quente sob uma pressão manométrica de 23psi (158KPa). As bolsas foram confinadas verticalmente num suporte de alumínio de chapa maciça, deixando um espaçamento de 19,0mm para a expansão máxima das bolsas. O processamento de bolsas confinadas em chapas não perfuradas e na posição vertical, atualmente não é recomendada, pois impede a circulação do meio de aquecimento e dificulta a localização do ponto mais frio da embalagem.

Em seguida, YAMANO & KOMATSU (1969) adaptaram uma autoclave vertical, também de escala piloto, para processar bolsas com misturas de vapor/ar ou água quente com sobreprensão de ar. Quando foi usada a água como meio de aquecimento, o ar foi injetado junto com o vapor e a pressão máxima de uso da autoclave foi de 198KPa. O estudo utilizou bolsas de 135 x 200mm confinadas numa

prateleira construída com chapa de alumínio de 1,5mm de espessura, com capacidade de até 120 embalagens e 30mm para a expansão máxima das bolsas. A partir deste estudo, novas pesquisas foram realizadas procurando definir uma distância máxima entre as prateleiras para garantir uma expansão máxima das bolsas.

Nesta linha de pesquisa, PETERSON & ADAMS (1983) trabalharam com uma autoclave, escala de laboratório, com capacidade para 8 bolsas de tamanho institucional (304,8 x 381 x 25,4mm) utilizando vapor/ar ou água quente com sobrepressão de ar. As bolsas foram confinadas horizontalmente sobre 4 prateleira de aço inoxidável, com 1,6mm de espessura e 40% de área aberta para circulação da água. A espessura máxima permitida para as bolsa foi de 25,4mm. Os ensaios foram realizados a 121°C com 172KPa de sobrepressão.

Num dos primeiros trabalhos realizados no Brasil com B.E., ORTIZ (1986) utilizou uma autoclave horizontal, descontínua, estática, contendo água quente com sobrepressão de ar para o processamento de 150 bolsas de 130 x 170mm. Estas foram confinadas horizontalmente em bandejas de aço inox perfurada, com 1,5mm de espessura, permitindo uma expansão máxima das bolsas de 20mm. Neste estudo foi empregada uma pressão parcial de ar comprimido de 50KPa para uma temperatura de processo de 100°C.

RAMASWAMY *et al.* (1991) usou em seus experimentos uma autoclave horizontal de uma cesta, tipo cascata com água aquecida. Nesta autoclave foram colocadas 8 bandejas de 810 x 810mm, com uma área livre entre bandejas de 102mm para circulação do meio de aquecimento, e carregadas com blocos de policarbonato ("tijolos"), para simular embalagens com alimentos, apresentando as seguintes dimensões: 100mm x 150mm x 20mm.

HALEY (citado por CARDELLI, 1992) apresentou o funcionamento sobre uma autoclave rotativa de escala piloto, marca ALLPAX, no processamento de bolsas contendo alimentos. Esta autoclave foi programada para trabalhar com água quente com sobrepressão de vapor nas faixas de 100° - 130°C e de (0 -241 KPa), processadas em forma estática e na posição vertical.

CARDELLI (1992) trabalhou com uma autoclave vertical, descontínua, estática utilizando como meios de aquecimento vapor puro, misturas de vapor/ar e água quente com uma sobrepressão de ar igual a das misturas vapor/ar. Foram montadas 10 prateleiras circulares de aço inox e perfuradas, com 1,2mm de espessura e com 75% de

área livre para passagem do fluido de aquecimento. Em cada prateleira foram colocadas três embalagens de 127 x 178mm (poliéster / folha de alumínio / polipropileno), com 160g de suspensão de bentonita a 10%, deixando 20mm de separação entre elas para favorecer a circulação do meio de aquecimento e limitar a expansão máxima das bolsas. Cada meio de aquecimento foi testado a 105^o, 113^o e 121^oC a uma pressão manométrica na faixa de: 33 a 71 KPa para 105^oC; 75 a 125 KPa para 113^oC e 126 a 191 KPa para 121^oC.

Através destes trabalhos, pode-se concluir que as experiências no processamento de bolsas tem avançado significativamente, e que os fatores críticos de processo destas embalagens, tais como: tipo de material dos suportes, sua disposição, bem como a expansão máxima proporcionada às bolsas, são muito importantes e devem ser perfeitamente controlados.

3.4.2. Volume máximo de enchimento

O volume máximo do produto por bolsa dependerá das características do alimento, da capacidade de contenção da embalagem e do tipo de equipamento usado na termossoldagem das mesmas. O excesso de produto nas bolsas poderá causar deformações no laminado e comprometer a integridade das embalagens (com a formação de vincos). Além do mais, uma possível contaminação da área de selagem pelo alimento poderá provocar falhas no fechamento das mesmas.

Cada fabricante especifica a capacidade máxima de acondicionamento de suas embalagens, existindo B.E. de porção individual (130 a 180g) e de porção institucional (300 a 1000g). No caso das bolsas da TOYO SEIKAN, de tamanho 130 x 170mm, a capacidade recomendada é de 180g.

3.4.3. Influência da quantidade de ar residual dentro das bolsas

Segundo LAMPI (1977) existem muitas razões para remover os gases residuais das B.E., tais como: proteção da integridade da embalagem, transferência de calor uniforme durante o processamento, estabilidade do alimento, facilidade na detecção de possível contaminação por microrganismos que produzem gás e melhor ajuste das bolsas nas embalagens secundárias.

BERRY (1983) identificou vários fatores críticos para o processamento das B.E.. Embora muitos fatores fossem similares aos que afetam o processamento de latas, o efeito do ar residual difere consideravelmente quando se trata de bolsas esterilizáveis. Uma mudança significativa no volume total, pode resultar numa expansão térmica dos sólidos, líquidos e dos gases residuais, podendo causar sérios danos às embalagens, devido à natureza flexível do material.

TSUTSUMI (1974) sugeriu que um volume máximo de ar residual, na faixa de 10ml dentro das bolsas, fosse aceitável, pois não iria interferir na transferência de calor nem provocaria estouro das mesmas durante o processamento térmico.

LAMPI (1979) considera também que valores menores que 10ml de gases residuais não oferecem problemas ao processamento das bolsas. Entretanto, se níveis acima de 20ml de ar forem detectados nas bolsas a serem processadas, principalmente nas de porção individual, então, deve-se aumentar o tempo de processo, pois o ar residual atuará como isolante térmico dentro das embalagens.

Nas especificações da TOYO SEIKAN KAISHA (1994), fabricantes das bolsas esterilizáveis que serão usadas nesta pesquisa, a recomendação do volume máximo tolerável de ar residual está em torno de 5ml por bolsa de 13mm de espessura. Taxas de ar residual acima deste limite, pode causar efeitos adversos na transmissão de calor, além de possibilitar a explosão das mesmas, durante o processamento.

No trabalho de ORTIZ (1986), que utilizou uma termoseladora de barra aquecida marca SENTINEL (*Packaging Industries Group, Inc, USA*) para fechamento de bolsas esterilizáveis de porção individual, foi encontrado uma média de 1,2ml de ar residual, com intervalo de variação de 0,5 a 3,0ml. Esta determinação foi feita através do método destrutivo da proveta graduada invertida, descrito por GUEDES *et. al.* (1984).

Sendo assim, é muito importante para o sucesso do processamento a remoção de tais gases, muito embora, a FDA (1981) sugere, mas não exige, o controle de registro do volume de gases residuais contidos dentro das bolsas.

3.5. TESTES USADOS PARA DETECÇÃO DE VAZAMENTOS DE BOLSAS ESTERILIZÁVEIS

Muitos testes tem sido propostos para avaliar a integridade das B.E. contra possíveis defeitos dos materiais que compõem o laminado ou para avaliar a qualidade da selagem, tais como: pressão crítica de rompimento, resistência à tração e resistência à delaminação. Contudo, estes testes não são capazes de identificar e/ou confirmar microfuros que possam ocorrer nestas bolsas. Sendo assim, é importante destacar os principais métodos empregados na detecção de microfuros em bolsas esterilizáveis.

3.5.1. Bioteste

Procedimentos com bioteste, há muito tempo tem sido usados para avaliar fatores que afetam a construção e a integridade de fechamento das embalagens rígidas metálicas.

Atualmente, este método de detecção de vazamento tem sido também aplicado às embalagens flexíveis, sendo que, a maior diferença entre embalagens rígidas e as flexíveis (B.E.), é que esta última, selada à vácuo, não tem espaço livre ("head space") no seu interior, daí, os microfuros presentes nestas bolsas podem ser bloqueados pelo próprio alimento contido no seu interior.

O princípio do bioteste se baseia em indicar a penetração de uma determinada bactéria para o interior de uma embalagem pelo ponto de vazamento. Em relação às bolsas, esta penetração se dá devido às falhas na fabricação deste material, por selagem defeituosa ou por suposto abuso físico sofrido desde o processamento até a distribuição final ao consumidor. Outro fator que favorece a esta penetração é o fato da pressão interna da embalagem ser negativa, decorrente do vácuo.

O trabalho pioneiro na utilização do bioteste para a avaliação da integridade de bolsas esterilizáveis foi desenvolvido por MAUNDER *et al.* (1968), onde os mesmos desenvolveram um aparelho, "Biotester", para detectar danos na integridade de embalagens flexíveis. O invento consistiu, basicamente, de bandejas de alumínio feitas para acomodação das bolsas que ficavam imersas em um tanque contendo a suspensão de células de *Enterobacter aerogenes*. Para facilitar a penetração das bactérias através dos microfuros, eles improvisaram câmaras de ar distribuídas ao redor das embalagens, onde as mesmas sofriam controle alternado de pressurização e despressurização para

promover uma ação de flexibilização das bolsas e do alimento. Cada bioteste durava em média 15 min, e aproximadamente 30 ciclos alterando a pressão das câmaras de ar. Para verificar a eficiência do bioteste, as embalagens utilizadas neste trabalho tinham dimensões de 114,3 x 177,8mm, cheias com "chicken-ala-king" e foram furadas com agulha de costura nº 14 em vários lugares com diâmetros variando de 33 a 160µm. A concentração da suspensão de *E. aerogenes* foi de 20×10^6 células/ml. Finalmente, os autores concluíram que o bioteste deveria ser incluído em qualquer programa de teste de integridade para as embalagens flexíveis, como passo final na detecção de microfuros.

Em 1979, MICHELS and SCHRAM, utilizaram o bioteste com uma suspensão de *Enterobacter aerogenes* ($>10^8$ células/ml) para checar a integridade de B.E.. O objetivo principal da pesquisa foi estudar o efeito do manuseio, da água de resfriamento e da secagem das bolsas esterilizáveis sobre a contaminação pós processo. Eles usaram B.E. de 130 X 170mm (*Toyo Seikan, Japan*) que foram cheias com 150ml de caldo peptona-extrato de levedura e foram submetidas a três tipos de manuseio após o descarregamento da autoclave: 1) As B.E. úmidas foram retiradas das bandejas por um operador sem proteção nas mãos, e para acentuar os efeitos adversos, as embalagens foram esfregadas entre as mãos e incubadas a 30°C por uma semana; 2) As bolsas foram descarregadas por um operador munido de luvas esterilizadas e as bolsas úmidas foram secas com ar quente, em seguida, foram esfregadas entre as mãos de um outro operador, colocadas em embalagens secundárias cartonadas e incubadas a 30°C por uma semana; 3) As bolsas úmidas foram esfregadas entre as mãos de um operador, depois foram secas com ar quente e passadas para uma embalagem secundária e incubada a 30°C por uma semana. Como conclusão ficou estabelecido que o manuseio de B.E. pós-processadas e ainda úmidas não pode ser considerado como um procedimento aceitável na indústria de alimentos, a menos que precauções especiais sejam tomadas, tais como: manuseio através de luvas esterilizadas, uso de água clorada no resfriamento ou secagem imediata das embalagens após o processo.

ANEMA & SCHRAM (1980) utilizaram o bioteste para determinar os níveis de contaminação de vários tipos de embalagens, flexíveis e semi-rígidas termoprocessáveis, decorrente de um manuseio inadequado pós processamento. No trabalho, também foi verificada a concentração mínima de células viáveis necessária para não influenciar nos resultados do bioteste. As embalagens flexíveis foram furadas, em cada lado, com uma agulha de 100µm de diâmetro, e mantidas por 30 minutos numa suspensão do bioteste usando diferentes concentrações de *Enterobacter aerogenes* como microrganismo indicador. As bolsas não sofreram nenhum tipo de

esforço mecânico, e as que foram imersas em suspensões menores que 5×10^6 células/ml, depois de incubadas por uma semana a 30°C , não mostraram reprodutibilidade de resultados quanto à detecção de microfuros. Sendo assim, as suspensões com concentração acima de 10^6 células/ml foram as recomendadas para este teste.

Num trabalho realizado por PUT *et. al.* (1980), utilizando o bioteste na avaliação da integridade de latas convencionais, foi observado um aumento da contaminação para as latas testadas que continham produtos com baixa viscosidade. Ficou também evidenciado a relação de motilidade do microrganismo teste com as taxas de contaminação das embalagens testadas. Neste estudo foram usadas a *Enterobacter aerogenes*, como microrganismo que apresentava motilidade, e a *Hafnia alvei* que não apresentava motilidade, sendo que a contaminação foi significativamente alta quando a *Enterobacter aerogenes* foi usado no teste.

Seguindo uma metodologia bastante similar à de Maunder, ORTIZ (1986) empregou o bioteste como uma das principais formas de avaliação do desempenho de embalagens flexíveis termoprocessáveis; entretanto, as mesmas foram avaliadas após serem submetidas à simulação de manuseio e transporte. As embalagens flexíveis, de $130 \times 170\text{mm}$, sofreram flexões alternadas através de um dispositivo de ação mecânica quando imersas em uma suspensão concentrada de *E. aerogenes*, com uma média final de $1,2 \times 10^6$ UFC/ml. Após a conclusão de cada ensaio, todas as embalagens foram incubadas a 35°C durante 10 dias e os produtos simuladores utilizados foram: um meio de cultura líquido (caldo lactose) e um meio semi-sólido (carboximetil celulose de sódio). Diferentes parâmetros foram analisados para identificar as amostras onde houveram penetração da bactéria, dentre eles: o estufamento das embalagens, alteração na composição gasosa do espaço livre, acidificação do meio, aumento da turbidez do meio, exame microscópico direto e teste de esterilidade do meio de cultura. Foram testados vários tipos de bolsas, dentre as bolsas testadas, destacaram-se duas que continham folha de alumínio no seu laminado (uma de fabricação nacional e outra japonesa). As nacionais apresentaram alta incidência de defeitos graves nas regiões próximas às termossoldagens, principalmente quando submetidas aos tratamentos de vibração e queda. Segundo o autor, estas bolsas são mais susceptíveis a dobras e víncos. Constatou-se também, que o meio semi-sólido ofereceu maior proteção ao material flexível quando submetidos aos abusos físicos e mecânicos, sugerindo assim, que este meio tem uma maior capacidade de absorção dos impactos sofrido pela embalagem.

Outro trabalho bastante interessante foi o de AHVENAINEN *et al.* (1992) que investigaram a dependência da penetração de *E. aerogenes* sobre o diâmetro do microfuro e viscosidade do alimento embalado. Neste trabalho foram usados potes de poliestireno de alto impacto (volume de 115ml) cheios com alimentos de diferentes viscosidades, como: leite, agar, molho e sopa de carne. Estes potes foram esterilizados por irradiação gama (γ) e furadas no fundo com uma agulha fina, variando o diâmetro de 5 a 100 μ m. O tamanho do microfuro foi medido em um microscópio com um aumento de 120 vezes e uma escala na ocular. O bioteste aplicado utilizou uma suspensão de *E. aerogenes* com aproximadamente 10^7 UFC/ml, onde os potes foram colocados em um incubador agitador a 30°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, os potes foram limpos e incubados a 30°C por 1 a 6 semanas e, a seguir, as amostras foram tiradas para confirmação do crescimento bacteriano, usando tubos de Durham e meio verde brilhante bile. Para confirmação, as amostras positivas foram passadas para placas de Petri sobre meio de Levine. Verificou-se que a probabilidade de penetração foi alta para alimentos de baixa viscosidade, como o leite, e também para microfuros com diâmetros maiores, próximos de 100 μ m.

Desde então, todos os trabalhos sobre bioteste utilizaram a *E. aerogenes* como a bactéria indicadora de danos provocados às B.E.. Foi aí que, em 1993, WIRTANEN *et al.* compararam o bioteste de imersão, que utilizava uma suspensão de *E. aerogenes*, com uma suspensão de esporos de *B. subtilis* na avaliação da integridade de embalagens flexíveis termoprocessadas, justificado por apresentar menor tamanho e facilidade de serem encontrados em qualquer ambiente. Outra modificação foi a avaliação de microfuros localizados na área de selagem, pois até então, os furos eram feitos nos lados das bolsas. As bolsas utilizadas foram à base de polipropileno e etileno vinil álcool, como camada barreira, cheias com 200ml de purê de batata e autoclavadas. Neste estudo os microfuros foram feitos com fios de tungstênio de 50 μ m ou 100 μ m de diâmetro que foram colocados na área de selagem, antes da selagem, e retirados das embalagens após o processamento térmico. Os diâmetros dos microfuros foram medidos e confirmados por um teste eletrolítico (Microhole tester), baseado no fato que a condutância elétrica do material isolante de uma embalagem é drasticamente alterada por um pequeno furo. As bolsas com microfuros pré fabricados, foram ensaiadas utilizando o método de imersão e o esporo teste. No bioteste de imersão, com *E. aerogenes*, foi usada uma concentração de 10^7 UFC/ml e as embalagens foram incubadas a $24\pm 1^\circ\text{C}$ por 60 min., e, em seguida, as bolsas foram limpas e incubadas a 30°C por 6 ou 20 dias. Quando utilizaram o esporo teste, com *B. subtilis*, a suspensão contendo cerca de 10^6 esporos/ml foi pipetada no prolongamento remanescente acima da área de selagem, e deixada por 30 min. a $24\pm 1^\circ\text{C}$. A confirmação do crescimento

da *E. aerogenes* foi feita em tubos contendo meio de caldo verde brilhante bile (Difco) pela produção de gás em tubos de Durham, e para *B. subtilis* as amostras foram cultivadas em agar sangue e observada as hemólises ao redor das colônias para resultados positivos. Os resultados da pesquisa demonstraram que quando o diâmetro do microfuro foi menor do que 100 μ m, o esboro teste teve maior sensibilidade na detecção destes defeitos quando comparados ao teste de imersão, concluindo assim, que a utilização de *B. subtilis* é perfeitamente indicada neste tipo de teste.

3.5.2. Teste Eletrolítico

Este teste serviu para confirmação dos microfuros das embalagens processadas. O método basea-se no fato que a condutância elétrica de embalagens constituídas de materiais isolantes é drasticamente alterada pela presença de pequenos defeitos. AXELSON *et al.* (1990) utilizaram bolsas plásticas de poliestireno e o menor furo que conseguiram detectar, na embalagem, foi de 8 μ m de diâmetro, porém, sua exatidão foi reduzida para furos com comprimento maior que 1 mm. Os autores constataram que se um furo tiver 10 mm de comprimento, este deverá ter um diâmetro maior do que 3 μ m para ser detectado. Os autores trabalharam nas seguintes condições: concentração eletrolítica de NaCl de 1%, uma temperatura de 25°C, um amperímetro com exatidão de 0,01 μ A e uma voltagem de 10V em corrente contínua. Ficou também evidenciado que o uso da corrente contínua é melhor que a alternada, pois evita o fenômeno da polarização. No caso de se utilizar bolsas contendo folha de alumínio na sua estrutura, deve-se tomar cuidado na realização do ensaio, pois com o mínimo de contato do eletrodo com este metal será formada uma ponte galvânica dando resultados falso-positivo.

3.5.3. Outros testes

Além do bioteste, outros métodos de detecção de vazamentos em embalagens flexíveis estão sendo estudados e recomendados para avaliação da integridade destas bolsas, como as modificações propostas por GILCHRIST *et al.* (1989) na utilização dos métodos do corante fluorescente e do teste do gás hélio para este tipo de embalagem.

Apesar de serem mais usados para alimentos enlatados, estes dois métodos foram modificados para identificação de microfuros nas B.E. Os autores usaram bolsas

de 165 x 216mm. e 305 x 356mm. Em algumas bolsas os microfuros foram feitos com um raio laser, produzindo furos com diâmetros na faixa de 17 a 81 μ m, e em outras foi usada uma agulha de inox de 0,1mm de diâmetro, produzindo furos com 22 a 175 μ m de diâmetro.

3.5.3.1. Método do corante fluorescente - Embora nenhum método que utiliza corante fluorescente tenha sido mencionado na literatura para ser usado na localização de vazamento de B.E., ele tem sido frequentemente usados nas indústrias (W.R. Cole - FDA citado por GILCHRIST, 1989). Este método consiste em cortar o fundo de uma bolsa, esvaziar seu conteúdo, adicionar uma solução de corante fluorescente (100ml de trietileno glicol, 300ml de água, 15g de glicerina, 3g de triton x-100 e 3g de sódio fluorescente), selar a área cortada e colocar pesos sobre as embalagens para forçar a passagem do corante, através dos furos, indicando assim a resença ou não do microfuro e sua localização.

3.5.3.2.- Método de pressurização com gás hélio - Este método foi proposto inicialmente para detectar vazamentos de microfuros em embalagens metálicas, GILCHRIST *et al.* (1985). Com as modificações descritas neste trabalho, o teste consiste no corte do fundo de uma B.E., o esvaziamento do conteúdo, a adição de areia seca (para melhorar a estrutura das bolsas e evitar o colapso das suas paredes), executar uma nova selagem na área cortada e então as bolsas são colocadas em tanque de pressurização com gás hélio. O tanque é pressurizado a 207 Kpa por 30min. só depois as bolsas são furadas com uma seringa para que possa ser retirada uma amostra de gás do seu interior e depois injetada em um cromatógrafo a gás para ser analisada. Neste mesmo trabalho de adaptação dos métodos de detecção de microfuros para as B.E. os dois métodos foram comparados com o bioteste que utilizou a bactéria *Escherichia coli*, e as principais conclusões foram:

- os menores tamanhos de microfuros medidos pelos testes foram: 3 μ m para o método do gás hélio e 20 μ m para o método do corante com o emprego do raio laser na formação dos microfuros.

- e obedecendo uma ordem decrescente de maior sensibilidade na identificação de microfuros, observou-se: o método do gás hélio > bioteste > método do corante fluorescente.

- o método do corante fluorescente foi capaz de localizar o ponto de vazamento, enquanto os outros dois apenas confirmam o defeito.

Através dos trabalhos citados no item 3.5, pode-se concluir que o bioteste que utiliza uma suspensão de esporos de *B. subtilis* é prático e apresenta melhor sensibilidade quando comparado com uma suspensão de *E. aerogenes* (WIRTANEN, 1993), pois o tamanho do esporo é menor que a célula de *E. aerogenes* e facilita a penetração em microfuros menores, como consequência, apresenta uma melhor determinação destes defeitos. Além disso, esta metodologia não necessita de equipamentos sofisticados, como cromatógrafos à gás, nem mesmo o consumo de produtos caros como é o caso do gás hélio.

3.6. CARACTERÍSTICAS DO *B. subtilis*

A escolha do uso de uma suspensão de esporos de *B. subtilis* para avaliar a integridade asséptica de embalagens, principalmente as flexíveis esterilizáveis, é devido, principalmente, ao pequeno tamanho dos esporos, sua estabilidade biológica quando comparada à uma suspensão de células viáveis e sua ubiquidade, ou seja, facilidade de ser encontrado em qualquer ambiente.

Segundo CLAUS and BERKELEY (1986) e GORDON (1973), as principais características para identificação das 71 linhagens de *B. subtilis* são:

- **Tamanho** - Geralmente de 0,7 - 0,8 μm por 2,0 - 3,0 μm , Gram positivo, apresentando motilidade.
- **Forma do esporo** - Elipsoidal ou cilíndrico, central ou paracentral.
- **Temperaturas de crescimento** - Temperaturas máximas de 45 $^{\circ}$ a 55 $^{\circ}$ C e temperaturas mínimas de 5 $^{\circ}$ a 20 $^{\circ}$ C, sendo a temperatura ótima em torno de 28 a 40 $^{\circ}$ C.
- **Reações positivas**- Catalase; Voges-Proskauer; crescimento em 7% de NaCl; crescimento em pH de 5,0 - 8,0; produz ácido a partir de glicose, arabinose, xilose (4 linhagens negativas) e manitol; hidrólise de amido; utilização de citrato como fonte de carbono; redução de nitrato a nitrito; decomposição da caseína; Gram; motilidade.

- **Reações negativas** - crescimento anaeróbio; reação em meio de gema de ovo com produção de pigmento preto a partir de glicose (4 linhagens positivas) e a partir de tirosina (1 linhagem positiva); hidrólise de hipurato; utilização de propionato; decomposição de tirosina.

Na pesquisa realizada por SANTOS (1994), que utilizou *B. subtilis* var. *niger* (*globigii*) como indicador de esterilidade por óxido de etileno, foi mencionado que as características mais importantes e diferenciadoras desta cepa foram: a não produção de ácido a partir da xilose e a produção de pigmento preto a partir da tirosina.

GALLO (1989) numa pesquisa feita para determinar a microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica, preparou uma chave para classificação de *Bacillus* do Grupo I, na qual ficaram definidas as principais provas bioquímicas, tais como: Reações positivas: redução do nitrato; arabinose; citrato; crescimento a 40°C; crescimento em 7% NaCl; Gram e Catalase. Reações negativas: crescimento em anaerobiose.

3.7. UTILIZAÇÃO DO *Clostridium butyricum* COMO MICRORGANISMO ALVO DO PROCESSO

O *Clostridium butyricum* é uma bactéria esporulada anaeróbica que possui atividade metabólica através da fermentação de açúcares, amido e pectina dos alimentos, resultando na produção de ácido butírico, CO₂ e H₂, que provoca estufamento das embalagens.

A presença desta bactéria tem sido constatada com mais frequência, na deterioração de alimentos meio ácidos (pH 5,3 - 4,5) e ácidos (pH 4,5 - 3,7), tais como: tomate, pêra, abacaxi, figo e outros frutos, onde a grande quantidade deste microrganismo, presente na matéria-prima, pode tornar ineficiente o processo térmico pré-estabelecido.

MORDVINOVA *et. al.* (1984) trabalhou com a determinação da resistência térmica de esporos de *Cl. butyricum* em suco de tomate com pH entre 4,1 - 4,7. Foram empregadas três temperaturas neste estudo: 80, 85 e 90°C, sendo que o valor de *z* ficou na faixa de 9 - 10 °C.

A resistência térmica de esporos de *Cl. butyricum* também foi estudada por TOYODA *et.al.* (1990) a partir do isolamento de queijo Gouda. A suspensão de esporos usada na pesquisa tinha uma concentração de 10^5 esporos/ml e foram obtidos os seguintes valores de D para 100, 110 e 120°C : 0,91; 0,12 e 0,045min.. Utilizando a regressão linear para os valores de log de D, foi encontrado o valor de $z = 15,3^\circ\text{C}$. Os meios usados na determinação da resistência térmica foram : M/15 fosfato (pH 7,0) ou leite desnatado (pH 6,5).

O efeito do pH na resistência térmica do *Cl. butyricum* foi trabalhado por MORTON *et.al.* (1990), onde foram testadas três linhagens obtidas do *Centers for Disease Control* (CDC, Atlanta/USA): uma linhagem não toxigênica (87-409), isolada da deterioração de amoras, e duas isoladas de casos suspeitos de botulismo infantil (5262 e 5520), entretanto, ficou comprovado que as mesmas eram linhagens toxigênicas de *Cl. butyricum*. Para a linhagem não toxigênica o valor de D foi determinado em suco de tomate com pH 4,8 nas seguintes temperaturas: 204, 208 212, 216 220 e 224°F, ficando com o valor de z em torno de 15,3°F. Os valores de D obtidos para as linhagens toxigênicas (5262 e 5520), em suco de tomate (pH 4,7), foram determinadas a partir das seguintes temperaturas: 167,5; 170; 172,5; 175 e 177,5°F, tendo como valores de z : 8,7°F e 8,5°F, respectivamente.

Devido a grande variabilidade de valores de resistência relativa z encontrados na literatura, é de extrema importância a determinação da resistência térmica do microrganismo no produto que se deseja trabalhar, pois devido ao comportamento específico de cada linhagem aliada às diferentes composições dos alimentos estudados, estes valores passam a ser empregados somente em processos que envolvam estes produtos ou outros bastantes similares.

Em 1977 LEITÃO *et al.* estudaram a resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 e *Clostridium sporogenes* PA 3679 em purê de banana natural (pH 4,7). O trabalho foi desenvolvido visando obter subsídios para melhor definir as condições de esterilização do produto. Os testes foram efetuados transferindo-se 0,2g da amostra inoculada (purê de banana asséptico/suspensão de esporos) para tubos de Pyrex (150mm de comprimento x 4mm de diâmetro externo x 3mm de diâmetro interno) os quais foram fechados a chama e aquecidos em banho de óleo com temperatura controlada. O parâmetro utilizado na avaliação da resistência térmica dos microrganismos foi o valor D determinado nas temperaturas de 105, 109 e 113°C, usando o purê de banana com pH natural, e o valor D calculado a 113°C para purês com pH de 5,3 , 5,7 e 6,6, visando avaliar a influência do pH na resistência

térmica do *B. stearothermophilus*. Os seguintes valores foram encontrados para *B. stearothermophilus*: $D_{105^{\circ}\text{C}} = 9,0$ min, $D_{109^{\circ}\text{C}} = 5,3$ min, e $D_{113^{\circ}\text{C}} = 3,1$ min, sendo o valor de $z = 17^{\circ}\text{C}$. No caso do *Clostridium* PA 3679 os resultados foram : $D_{100^{\circ}\text{C}} = 34,5$ min, $D_{105^{\circ}\text{C}} = 8,5$ min e $D_{113^{\circ}\text{C}} = 1,8$ min, sendo $z = 10^{\circ}\text{C}$. Quanto a influencia do pH na resistência térmica dos esporos do *B. stearothermophilus*, ficou evidenciada uma acentuada elevação desta resistência com o aumento do pH, como mostra os seguintes valores: $D_{113^{\circ}\text{C}}$ de 3,1 , 7,6 , 11,3 , 12,1 min em pH 4,7 , 5,3 , 5,7 e 6,6, respectivamente. Estes valores de resistência relativa ao calor z determinados em purê de banana natural, quando comparados com valores determinados para estes microrganismos em outros alimentos, foram mais elevados, entretanto, estes autores não indicaram as razões destes resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Campinas, São Paulo. Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais que foram utilizados, seguindo uma ordenação baseada no desenvolvimento da pesquisa.

4.1. ALIMENTO UTILIZADO

O alimento processado nas B.E. foi um purê de banana, livre de qualquer conservante químico. O mesmo foi preparado a partir de frutos da variedade nanica (*Musa cavendish*, Lamb.), por ser a mais cultivada na região de Campinas, de fácil aquisição e por ser o cultivar que apresenta melhores características de forma, tamanho, aroma e sabor. Outros fatores importantes na escolha do purê de banana, como parte do objeto deste trabalho, foi seu custo extremamente baixo, quando comparado a um meio de cultura utilizado como um simulador de alimento, além de sua característica de consistência adequada para este tipo de embalagem.

4.1.1. Processamento do purê de banana

O purê de banana foi preparado na planta piloto da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, e seguiu as seguintes etapas:

Inicialmente, os cachos adquiridos, em fase de desenvolvimento conhecida como 3/4 gorda (36mm), ficaram acondicionados em caixas, que geralmente são usadas no transporte dos mesmos, e expostos à temperatura ambiente até adquirir uma coloração amarela uniforme, indicando assim, o grau de maturação normalmente conhecido como ponto 6 (totalmente amarelo) de acordo com o Banana Ripening Manual (1956), DE MARTIN *et. al.* (1990).

A primeira etapa do processamento foi a lavagem dos frutos, em banho de imersão com água clorada, com 5 - 10 ppm de cloro livre, para a redução da carga microbiana e das impurezas mais grosseiras.

Em seguida, os frutos foram descascados manualmente e submetidos a uma seleção, na qual os defeitos apresentados foram removidos e os frutos que apresentassem sérias danificações foram eliminados. Em seguida estes frutos foram cortados no sentido longitudinal e sofreram um branqueamento (98°C por 5 minutos) para promover uma inativação enzimática. Antes de ser embalado e processado termicamente, foi medido o pH .

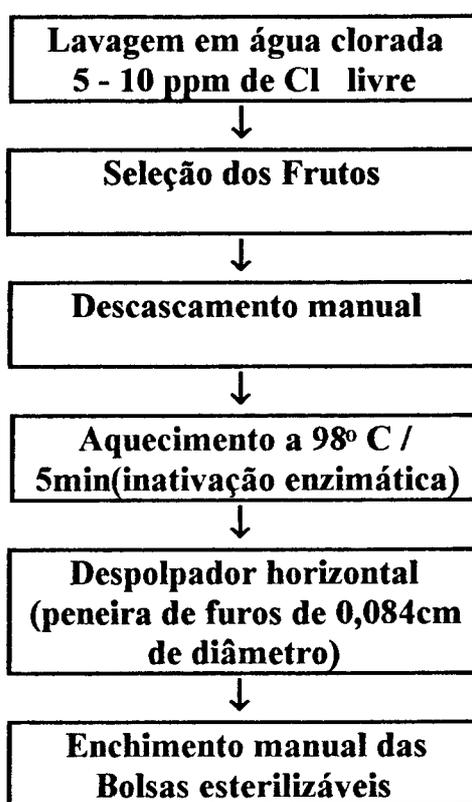


Figura 1 - Fluxograma utilizado no processamento do purê de banana.

Decorrido o tempo do branqueamento, os frutos passaram por um despoldador horizontal, com peneira de furos de 0,84mm de diâmetro, para eliminação de fibras e das pequenas sementes dos frutos, e logo depois o purê foi embalado manualmente nas bolsas, através da utilização de um saco usado em confeitarias (Fig. 1). Este sistema foi adotado para evitar a contaminação da área de selagem das bolsas com o purê de banana, e não comprometer o fechamento das mesmas.

4.1.2. Medida da viscosidade

As características reológicas do alimento foram determinadas por meio da variação de sua viscosidade aparente, em função da taxa de deformação e da característica como um fluido não-newtoniano, em três diferentes temperaturas.

Foi usado um viscosímetro rotacional BROOKFIELD (*Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts USA*), modelo LVT, para determinar a variação da tensão de cisalhamento (τ) e da viscosidade aparente (η_a) em função da taxa de deformação aplicada ($\dot{\gamma}$). Essa determinação foi realizada a 30, 45 e 75°C, com a utilização de um banho termostático para a estabilização destas temperaturas. Para este tipo de produto foi usado a haste ("spindle") LV4 e, através da variação da velocidade de rotação, foram obtidas as leituras no viscosímetro pelos fatores de conversão tabelados para esta haste.

4.1.3. Determinação da carga microbiana inicial do purê de banana

A determinação da população inicial de microrganismos existente no purê de banana, antes de ser processado, é de grande importância para o estabelecimento das condições de processamento do alimento.

O purê de banana foi preparado com o mesmo procedimento que foi utilizado no bioteste com bolsas esterilizáveis, e foram efetuadas contagens, em cinco repetições, dos grupos de bactérias mais prováveis de contaminação neste tipo de produto, tais como:

1) Mesófilos aeróbios - Foi retirada uma amostra do purê, 10 gramas, e foram suspensas em 90ml de água destilada estéril. A partir daí foram preparadas diluições sucessivas até 10^{-5} e foram passadas para placas de Petri, em duplicata e profundidade, 1,0 ml de cada diluição em agar padrão para contagem (PCA - "plate count agar"). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e em seguida efetuada a contagem YOKOYA (1970).

2) Mesófilos esporulados anaeróbios - Foi retirada uma amostra do purê, 10 gramas, e foram suspensas em 90ml de água destilada estéril. A partir daí foram preparadas diluições sucessivas até 10^{-5} que foram aquecidas a 60°C durante 20

minutos, para eliminação das formas vegetativas, e passadas para placas de Petri, em duplicatas e profundidade, no meio thermoacidurans agar, SILVA (1995) e YOKOYA (1970). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37° C por 24-48 horas.

3) Termófilas esporuladas aeróbias - Foi retirada uma amostra de 10g de purê e diluídas até 10⁻⁵. Foram utilizados dois métodos: YOKOYA (1970) que sugere um aquecimento prévio do produtos a 60°C durante 20 min., para eliminação das formas vegetativas, e SEGMILLER e EVANCHO (1992) que recomenda um choque térmico de 88°C por 5 min. que também serve para ativar os esporos. O produto foi então diluído, as diluições foram transferidas para placas de Petri, com dextrose-triptona-agar (DTA), 1,0 ml de cada diluição em duplicatas e profundidade, e incubadas a 55°C por 48 horas .

4.2. EMBALAGEM UTILIZADA

A embalagem utilizada nesta pesquisa foi uma bolsa esterilizável para porção individual, de tamanho 130 x 170mm, multilaminar com polipropileno 50µm camada interna, camada intermediária de folha de alumínio 7µm, camada externa de náilon 15 µm e poliéster 12µm, produzida pela TOYO SEIKAN (*Toyo Seikan Kaisha, Ltda - Japan*). Estas embalagens passaram por testes que avaliaram a qualidade do laminado e da termossoldagem, antes e após serem processadas, dentre estes testes destacam-se: avaliação visual da área de termossoldagem, verificação da ocorrência de fusão, resistência à delaminação, resistência da termossoldagem à tração e resistência à pressão interna, segundo normas da ASTM.

4.3. ADAPTAÇÃO DA AUTOCLAVE PARA PROCESSAR B.E.

A autoclave utilizada neste estudo para processar as bolsas, foi uma Allpax de imersão total, escala piloto (*ALLPAX Products, InCl, USA*) contendo uma cesta, rotativa, horizontal, descontínua, operada por um microcomputador (IBM PS/2) e que utiliza água quente com sobrepressão de vapor como meio de aquecimento. Os controles foram monitorados e alterados automaticamente pelo programa "Control View" (*Allen Bradley - USA*).

O sistema consistiu de dois tanques: de estocagem, onde a água foi pré-aquecida, e de trabalho, onde foi feito o processamento. A fase de aquecimento do tanque de trabalho subdividi-se em três etapas: esterilização I , onde se dá a transferência da água pré-aquecida do tanque de estocagem para o tanque de trabalho;

esterilização II, que representa a etapa de desaeração do tanque de trabalho e a estabilização da temperatura e pressão desejadas; esterilização III, etapa de esterilização do produto. O resfriamento também ocorre em três etapas: resfriamento I, retorno da água quente para o tanque de estocagem e entrada da água fria no tanque de trabalho; resfriamento II, etapa onde a pressão estabelecidas cai até a pressão atmosférica; resfriamento III, esfriamento final do produto até atingir a temperatura de retirada das embalagens.

O processamento das bolsas foi realizado de maneira estática (sem agitação) na temperatura de ajuste de 115°C com 158 Kpa de sobrepressão, através da injeção de ar comprimido, e por imersão em água aquecida com vapor.

Para o confinamento das B.E., foi colocado no interior do cesto no tanque de trabalho da autoclave (com 800mm de comprimento x 600mm de largura x 580mm de altura), um conjunto de bandejas confeccionadas em aço inox perfurado; com 2,0mm de espessura; 565mm de largura x 700mm de comprimento; 48% de área aberta, para permitir a circulação do meio de aquecimento, entre elas, e suportar o peso das bolsas sem sofrer deformações, e furos redondos com 8mm de diâmetro dispostos na forma hexagonal.

Nestas bandejas, dispostas horizontalmente, existiam divisórias de aço inox reguláveis, com 2mm de espessura e 10mm de altura, que serviram para separar e conter as B.E., sem interferir na circulação do meio de aquecimento.

Algumas alterações no funcionamento da autoclave também foram realizadas, como a substituição da bomba d 'água existente por uma de maior capacidade (7,5 C.V.; 220V.; motor trifásico; com fluxo de água de 19,5 - 22 m³/h.), que foi a responsável pela entrada da água de resfriamento no tanque de trabalho. O objetivo desta troca foi reduzir o tempo de resfriamento do produto quando processados em bolsas esterilizáveis.

4.3.1. Calibração dos termopares

Segundo PFLUG (1992), a imprecisão de 1°C na leitura da temperatura, determinada no processo térmico, poderá resultar num erro do valor de Fo calculado em torno de 26%. Este erro poderá ser acima ou abaixo da temperatura real,

dependendo das necessidades de calibração de cada termopar. Sendo assim, este ensaio é de suma importância para a confiabilidade dos resultados.

Foram usados, para medida de temperatura, termopares de agulha do tipo "T" (cobre/constantan) protegidos por uma capa de aço inoxidável (*Ecklund Custom Thermocouples, USA*) e que foram ligados à uma unidade de aquisição de dados DORIC 245 A (*Beckman Ind., USA*), que apresenta uma precisão de 0,1°C, através de fios de extensão de cobre-constantan, diâmetro de 0,80mm (*Honeywell InCl, USA*). Estas agulhas conectadas aos fios através de conectores tipo C-10 (*Ecklund Custom Thermocouples, USA*), foram vedadas com fita "teflon" para evitar entrada de água.

O conjunto com 16 termopares, fios de extensão e aparelho medidor de temperatura, foi calibrado posicionando os termopares dentro da autoclave, sob água quente com sobrepressão de 158 Kpa, para as seguintes temperaturas: 100, 105, 110, 115 e 120°C. Como padrão, foram utilizados dois termopares flexíveis, tipo "T" (cobre e constantan), de diâmetro de 0,127mm (*Omega Engineering, USA*) previamente calibrado em banho de óleo contra um termômetro padrão (*Incotherm Termômetros, Ltda, Brasil*), segundo norma recomendada pela ASTM E 220-86 (ASTM, 1987).

Os 16 termopares de agulha, juntamente com dois termopares flexíveis calibrados no banho de óleo, foram fixados num dispositivo de calibração CARDELLI (1992) e PFLUG (1992), de modo que as juntas de medição dos termopares ficassem o mais próximo possível do ponto central onde foram fixados os termopares flexíveis de referência. Este dispositivo, construído a partir do corpo de uma lata de diâmetro 94mm e altura de 114mm com furos de diâmetro de 14mm, foi depois fixado no centro do cesto da autoclave e os dados de temperatura foram obtidos de 1 em 1 minuto, durante um período de 30 minutos, após o tempo de subida e estabilização da temperatura.

Com os dados obtidos, foram determinadas as equações de calibração para cada termopar, que foram usadas posteriormente para o ajuste das temperaturas dos ensaios seguintes.

4.3.2. Distribuição de temperatura dentro da autoclave

O exato conhecimento das zonas de aquecimento mais lento, tanto para embalagens como para a autoclave, é necessário para a determinação dos parâmetros

de processamento térmico de cada produto e de cada embalagem, PARK *et. al.* (1990) e RAMASWAMY *et. al.* (1991).

O objetivo deste ensaio foi avaliar a influência das modificações realizadas no interior da autoclave através da introdução de um sistema de confinamento para processar B.E., e da variação do espaçamento entre bandejas, onde foi observado a homogeneidade das temperaturas dentro da autoclave, usando a água quente com sobrepressão como meio de aquecimento.

As bandejas projetadas para a acomodação das bolsas esterilizáveis foram montadas com espaçadores de 20 mm, distância recomendada para a conservação do limite da espessura máxima de expansão das mesmas PFLUG (1964); ORTIZ (1986) e CARDELLI (1992). O conjunto formado por 2 bandejas, com espaçadores entre elas, contendo bolsas cheias de água e termopares, foi denominado de bloco. Estes blocos foram separados através de espaçadores de 40 e 80 mm para avaliar o efeito na variação do espaço na circulação da água de aquecimento (Fig.3 e 4).

Foram realizados quatro ensaios com 115 e 121°C, como temperatura de ajuste, e 158 Kpa de sobrepressão, para simular as condições utilizadas no processamento das bolsas contendo o alimento, como mostra na Tabela 1.

Tabela 1- Resumo dos ensaios realizados para avaliar o efeito do espaço entre blocos de bandejas na distribuição da temperatura dentro da autoclave.

ENSAIO	ESPAÇO ENTRE BLOCOS (cm)	QUANTIDADE E DE BOLSAS	PROCESSO		BLOCOS COM TERMOPARES
			T(°C)	P (KPA)	
I	8	7	115	158	B1 - B4
II	8	7	121	158	B1 - B4
III	4	7	115	158	B1-B3-B5-B7
IV	4	7	121	158	B1-B3-B5-B7

Inicialmente, foram usados 04 blocos bandejas, espaçados 80 mm entre si, onde foram distribuídos os 16 termopares de agulha, previamente calibrados, e as bolsas contendo água, segundo as posições estabelecidas na Figura 2. Os termopares foram fixados nas bandejas por meio de barbante, evitando um contato direto da junta de medida dos mesmos com a chapa de aço, e os dados de temperatura foram obtidos da mesma maneira já descrita no item sobre calibração dos termopares. Em seguida, foi

testado um espaçamento menor entre os blocos de bandejas (40 mm), visando um maior aproveitamento da capacidade máxima do sistema de confinamento dentro do cesto no tanque de trabalho da autoclave. Nesta configuração, foram colocados termopares nos blocos B1, B3, B5 e B7 para leitura das temperaturas.

Duas formas de apresentação dos dados foram utilizadas para a interpretação da performance da temperatura dentro da autoclave: a primeira foi a determinação da uniformidade da temperatura do meio de aquecimento, com relação às temperaturas médias por localização dos termopares no sistema de confinamento/autoclave, para identificação dos pontos frios, e a segunda foi a estabilidade da temperatura da autoclave, obtida através das temperaturas médias obtidas a cada intervalo de tempo durante o processo. Estes dois procedimentos já vem sendo usados em vários estudos de distribuição de temperatura em diversos tipos de autoclave RAMASWAMY *et.al.* (1991); TUNG *et. al.* (1990); PARK *et. al.* (1990) e CAMARGO (1995) .

O tempo de subida, a temperatura do termômetro padrão (MIG) e do RTD do tanque de trabalho também foram registradas.

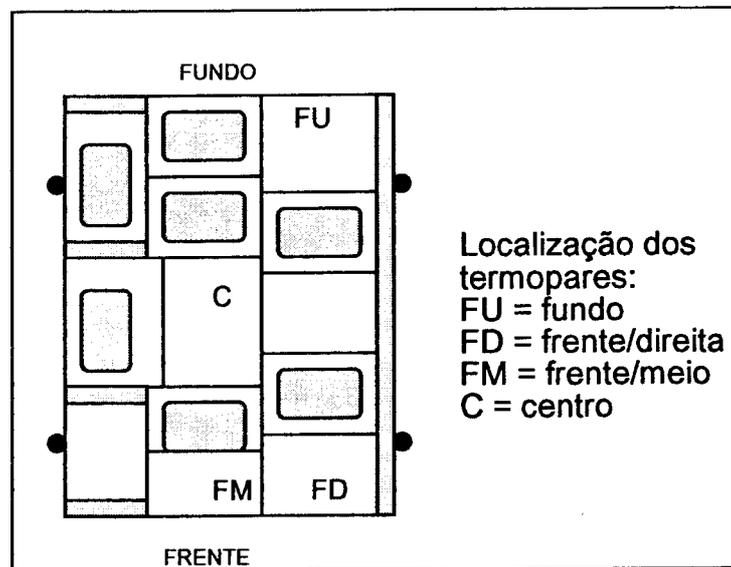


Figura 2 - Disposição das bolsas individuais nas bandejas e a localização dos termopares no ensaio de distribuição.

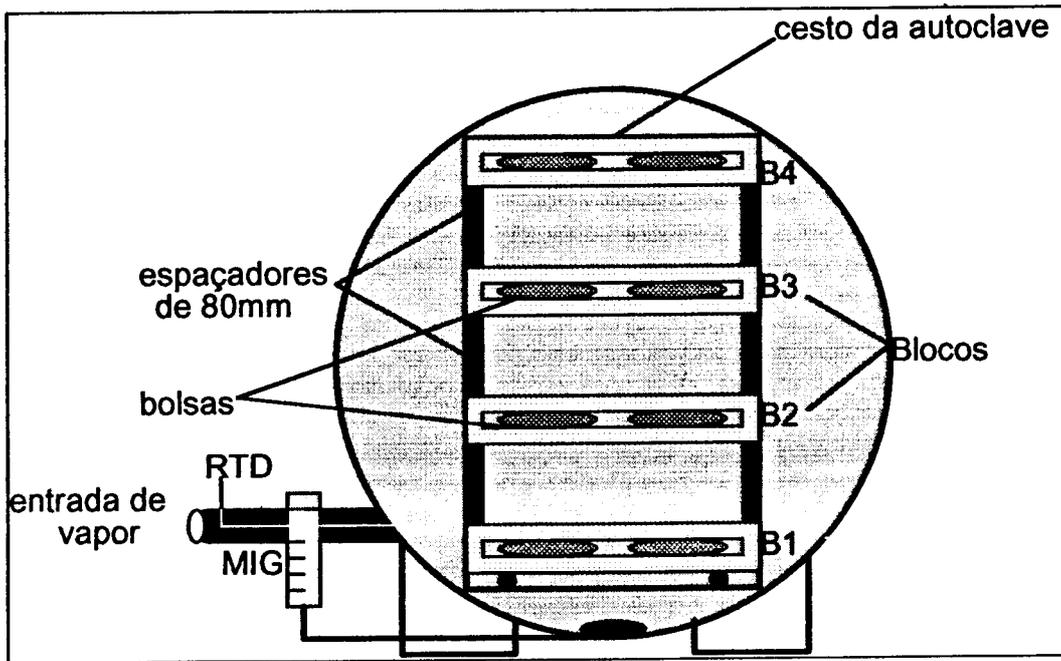


Figura 3 - Detalhe dos blocos de bandejas, usados no processamento das bolsas esterilizáveis, montados com espaçadores de 80 mm entre si.

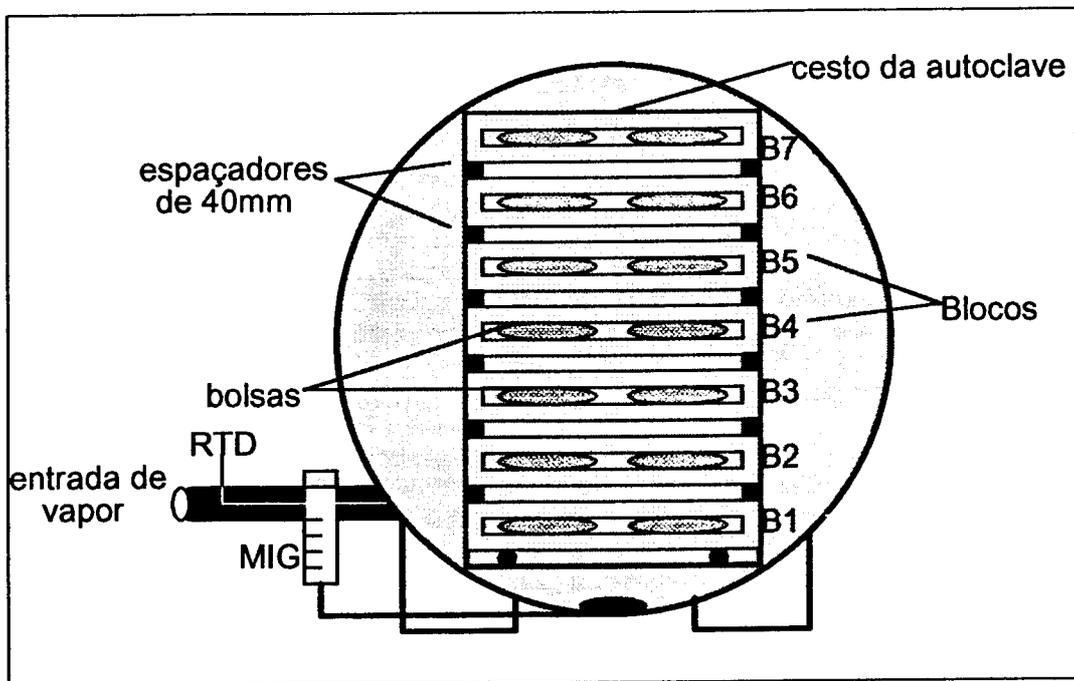


Figura 4 - Detalhe dos blocos de bandejas, usados no processamento das bolsas esterilizáveis, montados com espaçadores de 40 mm entre si.

4.4. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A TERMOSSOLDAGEM DAS B..E.

A seladora selecionada para executar o fechamento das bolsas pré-formadas neste trabalho foi de escala de laboratório, Minivac CV 18 (*SELOVAC Ind. e Comércio, Ltda, Brasil*). Esta possui um sistema de selagem que funciona à base de impulso elétrico, onde apenas um mordente contém a resistência elétrica plana, com 4mm de largura, e o outro um mordente constituído de borracha de silicone. Possui também uma bomba de vácuo com uma vazão nominal de 20m³/h que promove a retirada do ar de dentro da embalagem. Neste sistema o mordente com a resistência é aquecido até a temperatura do material a ser soldado e, logo em seguida, pressionadas sobre as embalagens por um determinado tempo. Este equipamento possui também mecanismos de variação do controle do vácuo e do tempo de termossoldagem das embalagens, constituído de uma escala numérica determinada pelo fabricante.

A otimização da seladora foi baseada num ensaio em que foram variados os tempos de termossoldagem e os valores obtidos do vácuo aplicado, correspondentes à escala numérica existente no painel.

A seguinte metodologia foi adotada para a otimização da termossoldagem:

1) Inicialmente foi tomado o tempo mínimo e o máximo de funcionamento da resistência que promoveu a selagem das bolsas, ou seja, o tempo de contato que o mordente pressionou a embalagem na execução da termossoldagem. A partir do tempo mínimo, a avaliação do fechamento das bolsas foi feita visualmente e foram seladas 17 bolsas para cada tempo de termossoldagem, sendo 10 bolsas utilizadas nos ensaios de pressão interna; 3 para verificação da termossoldagem à resistência de tração e 4 para a resistência à delaminação, conforme descrito anteriormente no item 4.2.. Estes tempos foram variados até quando o limite máximo da seladora foi atingido, ou seja, quando apresentou danos visualmente detectados na área de selagem das bolsas.

O controle do tempo de solda da seladora resume-se a uma escala numérica, determinada pelo fabricante, que variou de 1 a 10. Estes testes foram feitos até a escala 5, pois acima deste nível existiu uma limitação do próprio equipamento. Estas escalas corresponderam aos seguintes tempos de solda: escala 1 = não houve selagem; escala 2 = 3,24 segundos; escala 3= 5,0 seg.; escala 4= 5,67 seg. e escala 5= 5,67seg.

2) Determinada a escala ótima de termossoldagem foi, então, feito uma variação na escala do controle do vácuo da seladora, através de um botão de ajuste existente no painel da mesma, e foi acompanhado pela leitura direta de um vacuômetro também fixado neste painel. Neste ensaio foram seladas 10 bolsas, contendo purê de banana, para cada variação crescente na escala numérica, existente no painel da seladora, que controla o vácuo, variando de 1 a 10. Foram testadas somente as escalas de 1 a 4 pois, devido a característica do produto e da posição em que as bolsas foram seladas, a partir da escala 4 o purê de banana foi expulso da embalagem. Estas escalas corresponderam aos seguintes valores de vácuo aplicado: escala 1= 5 mmHg; escala 2= 20 mmHg; escala 3= 25 mmHg e escala 4= 27 mmHg.

Após a selagem, estas embalagens foram avaliadas quanto à quantidade de ar residual remanescente, através da metodologia descrita no item 4.3.5., e também quanto à contaminação da área de selagem pelo alimento.

Como resultado final da otimização da termossoldagem, foi considerada a sobreposição dos valores obtidos da resistência da termossoldagem à tração; a avaliação visual da área selada, observando enrugamentos e falhas; a resistência da pressão interna e a quantidade de ar residual existente dentro das bolsas após o fechamento.

4.5. ENSAIOS DE DESEMPENHO DAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS

Definida as condições de selagem para as bolsas, foram aplicados testes para avaliar a qualidade do material e da termossoldagem executada.

4.5.1. Acondicionamento das amostras antes dos ensaios.

O objetivo principal foi promover um equilíbrio das amostras às condições ambientais, principalmente temperatura e umidade relativa, a fim de que se possa obter uma padronização dos resultados.

Foi adotado o procedimento A da ASTM D618 (1977), que estabelece a condição 40/23/50, ou seja, acondicionamento durante 40 horas, a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $50 \pm 5\%$ de umidade relativa.

4.5.2. Avaliação visual da área de selagem

Na área de selagem das bolsas foram observados problemas de enrugamento pelo calor ou irregularidades superficiais, tais como: bolhas e rugas, logo após o fechamento de todas as bolsas utilizadas nos ensaios do bioteste, antes e depois de serem processadas.

Na avaliação da termossoldagem, foi realizada segundo padrões indicados pela FDA (1981) e aplicado uma escala modificada, proposta por OLIVEIRA & ALVES (1992), onde diferentes graus são atribuídos à aparência da área de selagem das bolsas. Considerando o grau G2 como limite de aceitação para a obtenção de selagens herméticas, foi adotada a seguinte classificação:

Grau 1 (G1) : nenhuma alteração visível.

Grau 2 (G2) : pequeno enrugamento pelo calor em até 50% da extensão da termossoldagem.

Grau 3 (G3) : pequeno enrugamento pelo calor e/ou irregularidades superficiais em 50 a 100% da extensão da termossoldagem.

Grau 4 (G4) : médio enrugamento pelo calor e/ou irregularidades superficiais em toda a extensão da termossoldagem e perda do brilho.

Grau 5 (G5) : acentuado enrugamento pelo calor e/ou irregularidades superficiais em toda a extensão da termossoldagem e perda de brilho.

4.5.3. Verificação da ocorrência de fusão

Quando existe uma perfeita união da camada interna das superfícies a serem soldadas, pode-se dizer que a termossoldagem foi satisfatória, ou seja, houve fusão das superfícies e a mesma é caracterizada pela impossibilidade de se distinguir os materiais.

Para se ter a certeza deste fenômeno, observou-se através do método de tracionamento do material, se a região da termossoldagem de topo das bolsas sofria uma quebra e delaminação da camada interna ou se era possível identificar as superfícies internas da selagem, indicando ausência de fusão. Esta verificação foi feita em todas as amostras, obtidas de bolsas antes e depois de serem processadas, avaliadas pelo teste de resistência da termossoldagem à tração.

4.5.4. Determinação da resistência das bolsas à delaminação

O objetivo deste ensaio foi medir a força necessária para separar o componente interno, polipropileno, da camada de alumínio existente na estrutura da bolsa.

Seguindo os procedimentos normatizados pela ASTM (1990) e descritos por PADULA *et al.* (1989), foram ensaiados cinco corpos-de prova, com 25,4mm de largura e cerca de 200mm de comprimento para cada amostra obtida antes e depois do processo. A delaminação dos primeiros 50mm foi iniciada com pinças e após a utilização do solvente tricloroetileno, pois o mesmo facilita a separação inicial das camadas para uma melhor fixação nas garras do dinamógrafo de tração INSTRON (*Instron Universal Testing Instruments, USA*) modelo 4301, do Instituto de Tecnologia de Alimentos/CETEA. Neste aparelho, além do sistema de fixação do corpo-de-prova, foram utilizadas células de carga de 49N, uma velocidade constante de 50mm/min e uma distância de tracionamento de 300mm. Os componentes separados pelo solvente foram fixados nas garras do aparelho e mantidos num ângulo de 90 graus entre a linha de aplicação da força e a extremidade não delaminada.

4.5.5. Determinação da resistência da termossoldagem das B.E. à tração

A determinação da resistência mecânica da termossoldagem das bolsas, foi feita no Instituto de Tecnologia de Alimentos/CETEA, através da medida de sua resistência à tração. Neste ensaio foram usados pelo menos dez corpos-de-prova, provenientes de bolsas antes e depois de serem processadas, normas da ASTM (1990) e descrição feita por PADULA *et al.* (1989), que tiveram as dimensões apresentadas na Figura 5, um dinamógrafo de tração INSTRON com células de carga de 98,1 N, garras pneumáticas para fixação das amostras e velocidade de tração constante de 300mm/min. Estas amostras foram fixadas no dinamógrafo de tração de modo que a termossoldagem

ficasse posicionada no centro da distância entre as garras para não comprometer os resultados.

Para cada corpo-de-prova, foi calculada a resistência da termossoldagem, com a média das resistências para as dez amostras ensaiadas e a posição e o tipo de ruptura mais frequentes. Este ensaio também foi aplicado na otimização da termossoldagem que serviu para avaliar o efeito na variação do tempo da solda aplicada para o fechamento das bolsas.

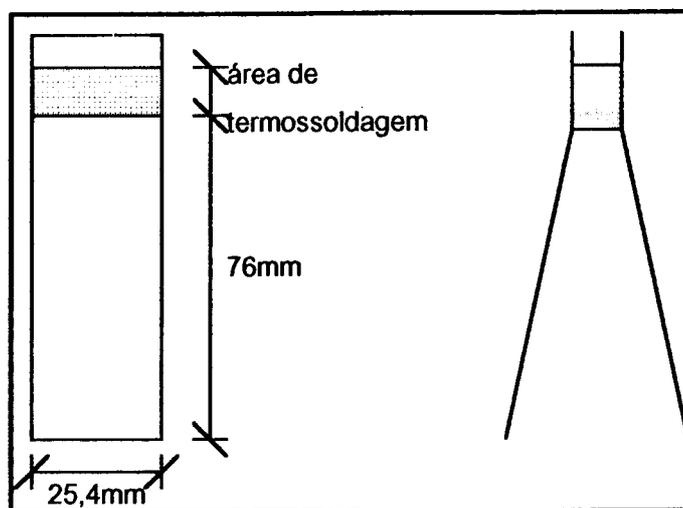


Figura 5 - Dimensões recomendadas para o corpo-de-prova ASTM (1990).

4.5.6. Determinação da resistência das B.E. à pressão interna.

Este ensaio fornece informações sobre possíveis falhas do material e/ou termossoldagem, quando a embalagem for submetida a pressões internas decorrentes do aumento da temperatura do produto durante o tratamento térmico.

Existe também a possibilidade de detectar problemas localizados, como pontos mais fracos na soldagem, que através dos ensaios de resistência à tração, estes defeitos não poderão ser identificados.

Neste ensaio foi aplicado o método de pressão crescente que é o mais indicado para a definição das condições ótimas da termossoldagem. Este método utiliza um sistema hidráulico de aumento de pressão que determina a capacidade máxima de suporte das embalagens até que ocorra sua ruptura. Foram testadas tanto as termossoldagens feitas pelo fabricante (fundo) como as de fechamento final das bolsas (topo). Este teste foi aplicado para bolsas antes e depois de serem submetidas ao processamento térmico e também na otimização da seladora.

Foram utilizadas 10 amostras (bolsas) abertas na câmara de contenção de um Hydrostatic Pouch Tester (*Reynolds Metals Company, USA*) modelo PT - 1 tipo HPBT, do Instituto de Tecnologia de Alimentos/CETEA. Nesta câmara, as bolsas foram colocadas em contato direto com um bico injetor, localizado entre as duas mandíbulas de vedação, que injeta água para dentro das embalagens até provocar o estouro. A pressão máxima suportada por estas embalagens foi lida num manômetro com precisão de 13,8 Kpa e capacidade de 689,6 Kpa.

4.5.7. Determinação da quantidade de ar residual dentro das bolsas

O objetivo deste ensaio foi quantificar o ar residual dentro das bolsas após a selagem à vácuo.

Seguindo metodologia realizada por SHAPPEE e WERKOWSKI (1972) e descrita por PADULA *et al.* (1989); GUEDES *et. al.* (1984) e WEINTRAUB *et. al.* (1989), as embalagens seladas foram submersas e abertas num recipiente com água e o gás contido no seu interior foi coletado através de funil, cuja a haste estava dirigida para cima e dentro de uma proveta volumétrica invertida completamente cheia de água. Foram testadas 10 bolsas para cada nível de vácuo aplicado no fechamento das mesmas. A leitura do volume de ar residual, proveniente da embalagem, foi feita diretamente na proveta (Fig.6).

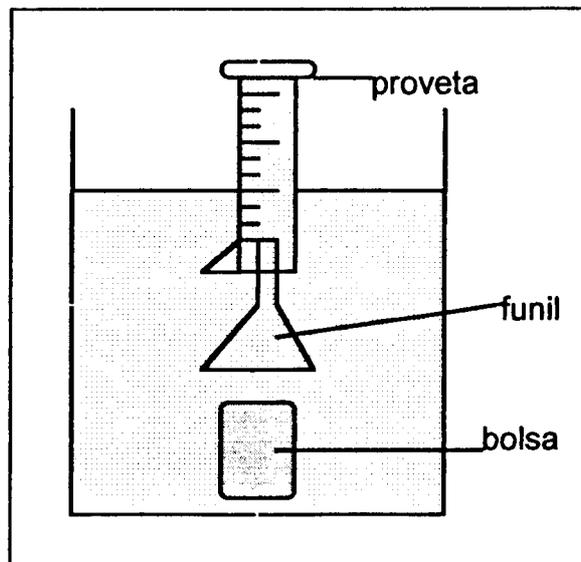


Figura 6 - Ensaio para determinação do ar residual das bolsas.

4.6. PROCESSAMENTO TÉRMICO DAS B.E.

4.6.1. Estabelecimento do valor F requerido

Para se estabelecer as melhores condições de processamento das bolsas esterilizáveis, e visando obter um purê de banana microbiologicamente estável, foram de fundamental importância a realização dos testes de penetração de calor, no conjunto bandeja / embalagem / alimento, e a determinação da resistência térmica do microrganismo alvo do processo.

Inicialmente, tentou-se estabelecer o valor de F_0 requerido. Com os valores de N_0 , carga microbiana inicial do purê de banana determinada antes de ser embalado (descrito no item 4.1.3.), e a determinação do valor da resistência térmica (D) do microrganismo escolhido como alvo do processo (*Clostridium butyricum*), foi calculado este valor, através da Equação 1.

$$F = D (\log N_0 - \log N_f) \quad (1)$$

onde, D é o número de reduções decimais; N_0 é o número de microrganismos existentes no purê de banana, antes de ser embalado; N_f é a população final depois do processo, ou seja, a probabilidade de um esporo viável sobreviver por embalagem.

No entanto, após a obtenção dos resultados da resistência térmica do *Cl. butyricum* no purê de banana, observou-se que esta era inferior à resistência estimada para o *Cl. botulinum*. Como o purê de banana está situado na faixa limite de pH (4,6) para alimentos de baixa acidez, tornando-o favorável ao crescimento do *Cl. botulinum*, achou-se prudente usar o *Cl. botulinum* como alvo do processo.

Para esta determinação foi aplicada uma redução logarítmica nos esporos (Log No - Log Nf) de 12D segundo o critério de PFLUG (1990), ou seja, a probabilidade (Nf) de sobrevivência de um esporo viável de *Cl. botulinum* por embalagem processada foi de 10^{-9} , considerando o $No = 10^3$. O valor de D foi calculado a partir da Equação 2 PFLUG (1985), para uma temperatura de processo de 115°C e um produto com pH = 4,6.

$$\text{Log } F_{250}^{\circ F} = \text{Log } 12D = 11,544 + 0,897\text{pH} - 0,0573\text{pH}^2 - 0,0586T \quad (2)$$

onde: $4,6 \leq \text{pH} \leq 6,0$ e $220^{\circ F} \leq T \leq 255^{\circ F}$

Sabe-se que a resistência térmica dos microrganismos é inerente a cada produto testado. O valor calculado, conforme Equação 2, serviu apenas de comparação com a resistência térmica do *Cl. butyricum*.

Foi também determinado o valor de F_{250} para o purê de banana com pH 4,6 e processado a 121,1°C (250°F) pela Equação 2. Este recurso facilitou a programação do aquisitor de dados utilizado (DORIC 245 A), que forneceu os valores de letalidade integrada com frequência de 30 em 30 segundos até se chegar ao valor de F_{250} requerido de 0,64min., para estas condições estabelecidas. No momento em foi registrada esta letalidade pelo DORIC 245A, a fase de aquecimento foi interrompida e foi então iniciada a fase de resfriamento. A letalidade integrada do processo, somente considerou a fase de aquecimento, deixando a letalidade da fase de resfriamento como segurança do mesmo.

4.6.2. Condições e variáveis dos processos térmicos aplicados

Os parâmetros estabelecidos para o processamento térmico das bolsas esterilizáveis na autoclave ALLPAX, encontram-se no Quadro 2. O plano experimental de uso das bolsas esterilizáveis utilizadas nos 6 processos são os seguintes:

- 46 bolsas com fios de 97 μ m de diâmetro colocados na selagem de topo;
- 42 bolsas com fios de 79 μ m de diâmetro colocados na selagem de topo;
- 36 bolsas com fios de 48 μ m de diâmetro colocados na selagem de topo;
- 30 bolsas com fios de 32 μ m de diâmetro colocados na selagem de topo;
- 22 bolsas processadas sem fios na selagem de topo;
- 06 bolsas com furos feitos por fios de 97 μ m de diâmetro na selagem;
- 06 bolsas com furos feitos por fios de 79 μ m de diâmetro na selagem;
- 06 bolsas com furos feitos por fios de 48 μ m de diâmetro na selagem;
- 06 bolsas com furos feitos por fios de 32 μ m de diâmetro na selagem;
- 18 bolsas com termopares para calcular a letalidade durante o processo;
- 30 bolsas usadas no ensaio de esterilidade comercial.

Quadro 2 - Condições estabelecidas para o processamento das bolsas esterilizáveis na autoclave ALLPAX.

	TEMPERATURA (°C)		PRESSÃO (Kpa)		RPM	TEMPO (seg.)	CESTO 1=V - 0=H
	Rampa (3°C/seg.)	Ajuste	Rampa (34,5/seg.)	Ajuste			
PREPARO		118,0		172,0			
STER I		116,0			0,0		0
STER II	25,0	116,0	103,0	158,0	0,0	261	0
STER III	20,0	116,0	103,0	158,0	0,0	4200	0
COOL I			3,5	124,0	0,0		0
COOL II		45,0	55	19,0	0,0	480	0
COOL III		40,0			0,0	300	0
DRENO		100,0		0,0			
	Temp. Rampa	3	Pres. Rampa	34,5			
	Tempo Base	seg	Tempo Base	seg			

STER = fases de aquecimento; COOL = fases de resfriamento; posição de processo do cesto (V=vertical e H=horizontal)

4.6.3. Resistência térmica do *Cl. butyricum* em purê de banana

Inicialmente, o microrganismo escolhido como indicador da esterilização do purê de banana foi o *Cl. butyricum*, pois trata-se de uma bactéria do grupo dos anaeróbios butíricos mesófilos, não proteolíticos, mas que causam, com mais frequência, deterioração dos alimentos meio ácidos e ácidos a partir da fermentação de açúcares, amido e pectina. Como o purê de banana natural possui um pH entre 4,5 e 4,7 e é rico em carboidratos, este microrganismo encontrou um substrato ideal para seu desenvolvimento.

Como os valores de resistência térmica obtidos para o *Cl. butyricum* apresentaram-se mais baixo que o *Cl. botulinum*, resolveu-se adotar, posteriormente, o *Cl. botulinum* como o microrganismo indicador da esterilização do produto.

4.6.3.1. Microrganismo

A linhagem utilizada nesta pesquisa foi a 18851 de *Clostridium butyricum* obtida do Laboratório de Higiene e Sanitização, da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, derivada da linhagem proveniente da *Centers for Disease Control* (CDC, Atlanta/USA).

4.6.3.2. Produção de esporos

Três métodos foram utilizados e avaliados na produção de esporos do *Cl. butyricum* 18851. Os dois primeiros foram inoculados em: dextrose-triptona-agar (Difco) modificado, contendo 0,1% de fosfato de potássio e 0,1 % de sulfato de manganês, e o meio Keener (4g de mel; 4g de extrato de levedura; 4g de extrato de malte; 14g de agar / 1 litro de água destilada) segundo MORTON *et. al.* (1990), onde foram inoculados 0,1ml de uma suspensão de células viáveis e incubadas anaerobicamente a 30^oC em jarras Gaspak por duas semanas. O outro método empregado foi uma modificação proposta para o *Cl. butyricum* baseado nos trabalhos de TOWNSEND (1939); Reed *et.al.* (1951), citado por PFLUG (1990) e MAGALHÃES (1992) para esporulação do *Clostridium pasteurianum*. Este método é baseado numa série de transferências progressivas de uma suspensão de células, que são cultivadas até se conseguir uma esporulação abundante.

O método consistiu das seguintes etapas:

- 1) Preparou-se um tubo com 10ml de meio de infusão de fígado (DIFCO), que passou por processo de exaustão (retirada do ar por aquecimento), e foi acrescentado 1,0ml de inóculo, sendo incubado a 30°C/24 horas.
- 2) A partir deste primeiro tubo foram preparados 3 tubos com 10ml (cada) de meio de infusão de fígado estéril, sendo acrescentado em cada tubo 1 prego de ferro não galvanizado, além de 2,0ml da suspensão obtida do tubo da etapa 1, e foram incubados a 30°C/24 horas.
- 3) Mais 3 tubos foram preparados na sequência. Cada um recebeu 10ml de meio de infusão de fígado estéril, 1 prego de ferro não galvanizado, 2,0ml da suspensão do tubo da etapa 2 e também foram incubados a 30°C/24 horas.
- 4) Nesta etapa foram preparados 3 erlenmeyers de 250ml, cada um contendo 50ml de meio de infusão de fígado estéril, 5 pregos de ferro não galvanizados e 10 ml das suspensões dos tubos provenientes da etapa 3, que foram incubados a 30°C/24 horas.
- 5) Na última etapa foi preparado 1 erlenmeyer de 3000 ml com 2000 ml de meio de infusão de fígado, 12 pregos de ferro não galvanizados e 150ml de suspensão proveniente dos 3 erlenmeyers da etapa 4. O mesmo foi incubado a 32°C / 1 semana e depois a 28°C / 2 semanas.

Todos os tubos e erlenmeyers foram estratificados com VASPAR estéril e a colocação dos pregos teve como objetivo abaixar o potencial de oxiredução do meio.

A suspensão resultante da última etapa foi filtrada em algodão estéril e centrifugada a 10.000 rpm / 12 min. em centrífuga refrigerada, com 5 repetições. No final de cada centrifugação, a suspensão foi avaliada por um microscópio ótico, através da metodologia de coloração de esporos, (FIELDS, 1975). A massa de esporos resultante foi resuspendida em 50 ml de água destilada estéril e estocada em frasco com pérolas de vidro estéril a 4°C.

Segundo MAGALHÃES (1992), esta série de transferências progressivas, até se atingir um volume expressivo, induz uma esporulação sincronizada e abundante, pois traz um grande número de células para a maturidade e eventual esporulação quase ao mesmo tempo.

4.6.3.3. Quantificação da suspensão de esporos

A partir da suspensão de esporos obtida anteriormente foi feita sua quantificação em cada ensaio de determinação da resistência térmica realizado (No). A suspensão foi diluída até 10^{-10} e foi transferida para tubos com meio fluido tioglicolato, aplicando a técnica do NMP, série de três tubos. Estes tubos, já contendo a suspensão de esporos, foram aquecidos a $60^{\circ}\text{C}/10\text{min}$. MORTON *et. al.* (1990), para ativação térmica dos esporos, e em seguida foram selados com VASPAR estéril e incubados a 30°C por 2 - 7 dias.

4.6.3.4. Teste de crescimento no alimento

Este teste serviu para avaliar a capacidade de crescimento do *Cl. butyricum* no purê de banana na forma natural (pH 4,6). Para o preparo do purê de banana, foram aplicadas as etapas já descritas no item 4.1.1. Em seguida, foram preparados 15 tubos com 15ml de purê, que foram esterilizados a $121^{\circ}\text{C} / 15 \text{ min}$.

Estes tubos passaram por processo de exaustão e 10 dos 15 contendo o purê de banana receberam 0,5ml da suspensão inicial de esporos, ativadas a $60^{\circ}\text{C}/10\text{min}$., sendo, então, estratificados com VASPAR estéril, incubados a 30°C e observados diariamente por 10 a 15 dias. Os 5 tubos que não receberam o inóculo, também foram selados com VASPAR estéril e serviram como controle negativo. A produção de gás no produto indicou o crescimento da bactéria.

4.6.3.5. - Ensaio de estabelecimento da resistência térmica do *Cl. butyricum* 18851, no purê de banana

Foi utilizado o método do NMP em tubos de diluição, com rosca, com série de três tubos. Os testes feitos com esporos de *Cl. butyricum* 18851 partiram de uma amostra com 9,0 ml de purê de banana estéril inoculado com 1,0 ml da suspensão de esporos, correspondendo a um inóculo de aproximadamente $2,15 \times 10^6$ esporos/g de purê.

Após a homogeneização do produto inoculado, foi transferido assepticamente 0,5 ml para tubos Pyrex 13x100mm, com rosca, e feito um aquecimento destes tubos

em banho de óleo de temperatura controlada e com agitação produzido pela *Precision Scientific, USA*.

O valor D utilizado como parâmetro de resistência térmica, foi determinado para as temperaturas de 92, 95 e 98°C, com duas repetições para cada temperatura, em quatro tempos diferentes. A determinação da população inicial (No) foi seguida de forma idêntica ao item 4.6.1.3.

O cálculo do valor de D foi efetuado através da Equação 3, a cada tempo/temperatura, e depois foi calculado o valor de D médio de cada temperatura. A determinação do valor da resistência relativa z foi efetuado por regressão linear de log D vs. temperatura, onde a recíproca negativa da inclinação, calculada por regressão, foi considerado como sendo o valor de z.

$$D = \frac{t}{\text{Log}N_o - \text{Log}N_f} \quad (3)$$

onde t = tempo (min.); Log No = logaritmo da população inicial de esporos e Log Nf = logaritmo da população de sobreviventes.

A contagem da população inicial (No) e dos esporos sobreviventes (Nf) foi feita em NMP, série de três tubos, usando meio fluido tioglicolato e com incubação a 30°C durante 7 dias, conforme descrito no item 4.6.3.3.

Para se verificar o tempo necessário para a amostra de purê de banana atingir a temperatura desejada, atraso térmico, foram aquecidos, a 95 e 98°C, tubos das mesmas dimensões contendo purê de banana, onde foi introduzido um fio de cobre-constantan de 0,127mm de diâmetro, para aquisição dos dados de temperatura, e o tempo foi registrado no momento em que se atingiu a temperatura de ajuste.

4.6 4. Penetração de calor nas bolsas esterilizáveis

O objetivo deste ensaio foi determinar a taxa de aquecimento, taxa de resfriamento e fatores de atraso do processamento do purê de banana em B.E.

processadas a 115°C em água com sobrepressão. Foi também avaliada a influência na variação da pressão e da rampa de queda da pressão no resfriamento (fase de resfriamento I), como mostra a Tabela 2. Com a troca da bomba responsável pela entrada de água no tanque de trabalho, houve a necessidade da realização deste ensaio para avaliar a velocidade de resfriamento do produto que foi processado. As embalagens contendo 130g de purê de banana foram dispostas horizontalmente sobre as bandejas, num total de 6 bolsas, localizadas na região onde o conjunto autoclave/bandejas apresentou aquecimento mais lento, determinado pelo ensaio de distribuição de temperatura dentro da autoclave. As bolsas confinadas tiveram um espaço livre de 20mm para sua espessura máxima de expansão, e iniciaram o processamento com uma temperatura inicial de 30°C.

A Tabela 2 mostra as condições que foram feitos os ensaios de penetração de calor em bolsas esterilizáveis de 130 x 170mm de tamanho, contendo 130g de purê de banana, na autoclave Allpax.

Tabela 2 - Condições de processo usadas nos ensaios de penetração de calor realizados em bolsas esterilizáveis contendo 130g de purê de banana.

PARÂMETROS OBSERVADOS	ENSAIO I	ENSAIO II	ENSAIO III
Temperatura inicial das bolsas (°C)	32	28	27
Temperatura da água de aquecimento (°C) ¹	116,3	116,8	116,2
Temperatura da água de resfriamento (°C) ²	24	25,5	26
Pressão na fase resfriamento I (Kpa)	138	124	110
Rampa de pressão resfriamento I (Kpa/seg.)	0,4	0,7	0,7
Tempo de subida ("come-up time") (min.)	5:40	5:50	5:50
Sobrepressão durante a fase STER III (Kpa)	158	158	158
Tempo de processo (min.)	30	6,5	7,0
% de abertura da válvula de entrada d'água	50	50	50

¹Média da temperatura dentro da autoclave obtida a partir de 4 termopares em contato com a água.

²Temperatura da água medida antes da entrada do tanque de trabalho.

Para medir a temperatura dentro de cada bolsa foi utilizado um termopar tipo " T "de agulha de 11,4 cm (*Ecklund Custom Thermocouples, USA*) que foram introduzidos nas bolsas por meio de uma prensa-gaxeta de latão (*Stuffing box for pouches, Ecklund Custom Thermocouples, USA*) instalado na solda de fundo das

mesmas, através de um furo de 6 mm, com arruelas de vedação em ambos os lados das bolsas (CARDELLI, 1992).

A junta sensitiva do termopar foi fixada no centro geométrico da bolsa, usando um suporte de "teflon", em forma de cruz, que foi colado numa das paredes da bolsa (MASSAGUER *et. al.* 1992), com 20mm de altura, a qual foi a mesma espessura máxima permitida para a expansão das bolsas. Os termopares foram aterrados com um fio de cobre para evitar interferências nas leituras de temperatura, (PETERSON e ADAMS, 1983), conforme Fig.7.

A penetração de calor foi medida nas bolsas 1 a 6, instaladas sobre o bloco de bandeja 7 (topo). A medida do meio de aquecimento foi feita com dois termopares situados nas laterais, um no topo e um embaixo do cesto da autoclave. A temperatura da água de resfriamento foi medida na entrada do tanque de trabalho. Foi utilizada a capacidade máxima de confinamento para as B.E., ou seja, 7 blocos de bandejas, onde nos blocos que não continham bolsas com termopares foram preenchidos com bolsas cheias de água, para simular a carga total de processamento.

Foram também registrados: dados de tempo de subida da temperatura de ajuste; temperaturas do tanque de trabalho, medida pelo RTD; temperaturas do termômetro padrão (MIG) e os pesos das bolsas, cheias com purê de banana, antes e depois de cada processo. Para a determinação da frequência de medida das temperaturas, foi assumido o critério de PFLUG (1975) que considera que o intervalo de medida de temperatura deverá ser 1/10 da taxa de aquecimento do produto, ou seja, de 0,1fh. Tomando-se como referência o trabalho de CARDELLI (1992), que encontrou um fh médio 8,4 min. para bolsas de 125 x 175mm de tamanho e contendo uma suspensão condutiva de bentonita 10%, adotou-se uma frequência de aquisição de 0,5min.

Os dados de tempo e temperatura foram adquiridos até 1°C de diferença, com relação à temperatura de processo e seguidos os mesmos procedimentos do item de calibração dos termopares. Para cada ensaio foi construído um gráfico de história térmica com as temperaturas do meio de aquecimento e das temperaturas lidas dentro das bolsas versus tempo, onde foram indicados o tempo de subida, o tempo de processo e o tempo de resfriamento. Para cada bolsa foi calculado o valor da letalidade desejada, (F_0), através da leitura direta no aquisitor de dados DORIC 245 A, previamente programado para esta função, e pelo método geral descrito por PATASHNIK (1953).

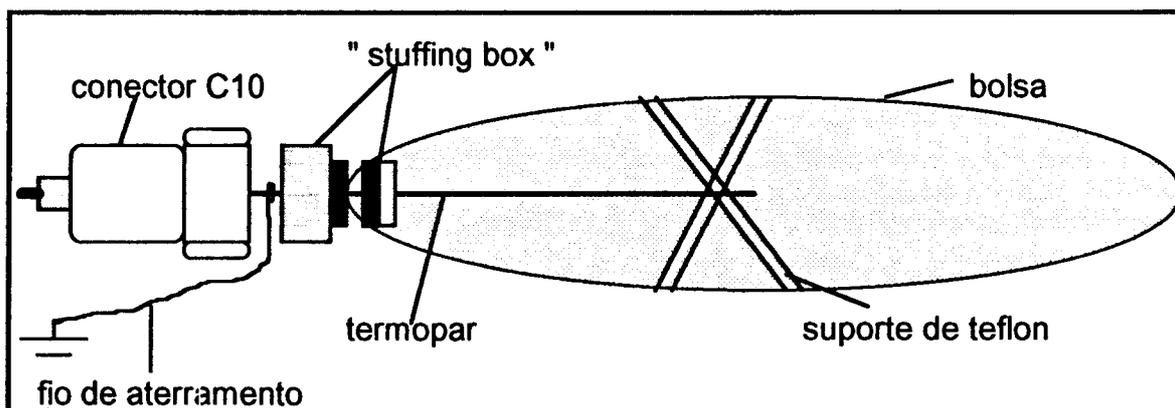


Figura 7 - Fixação e localização do termopar dentro da bolsa e o fio de aterramento.

4.6.5. Ensaio de esterilidade comercial

Este ensaio foi realizado com o objetivo de se verificar se o processamento térmico aplicado foi eficiente, nas condições previamente estabelecidas, até atingir o F requerido do processo.

Após o processamento térmico, as B.E. foram incubadas a 37°C por 10 dias, para que se pudesse verificar a ocorrência de possíveis alterações, tais como: vazamentos, modificações nas características sensoriais e, principalmente, estufamento das embalagens. Antes e após o período de incubação, foi feita a medida do pH e observação microscópica.

4.7. PREPARAÇÃO DOS MICROFUROS

Os microfuros foram feitos com fios de níquel-cromo (80% níquel e 20% cromo) Nikrothal 80 (*Kanthal Brasil,Ltda*), por resistirem bem a altas temperaturas (em torno de 1200°C), nos seguintes diâmetros: 32 - 48 - 79 - 97µm. Estes fios foram colocados transversalmente na área de selagem de topo das bolsas (um microfuro em cada bolsa conforme mostra Figura 8), e só depois as bolsas foram cheias com o purê de banana e seladas a vácuo para serem processadas.

Após a esterilização, os fios foram puxados cuidadosamente com uma pinça da área de selagem, numa câmara de fluxo laminar, e imediatamente as embalagens foram postas em contato com a suspensão de esporos de *B. subtilis* conforme descrito anteriormente.

Foram também testadas bolsas processadas com os furos abertos durante o processo para checar a resistência das embalagens quando processadas com estes defeitos, e avaliar a possibilidade de penetração de qualquer microrganismo presentes na água de resfriamento.

Outro teste realizado foi a determinação da capacidade de penetração dos esporos de *B.subtilis*, através da área de selagem de topo sem a retirada dos fios. Este ensaio permitiu avaliar se houve uma perfeita união entre os fios e as superfícies internas da bolsa onde foram colocados e selados.

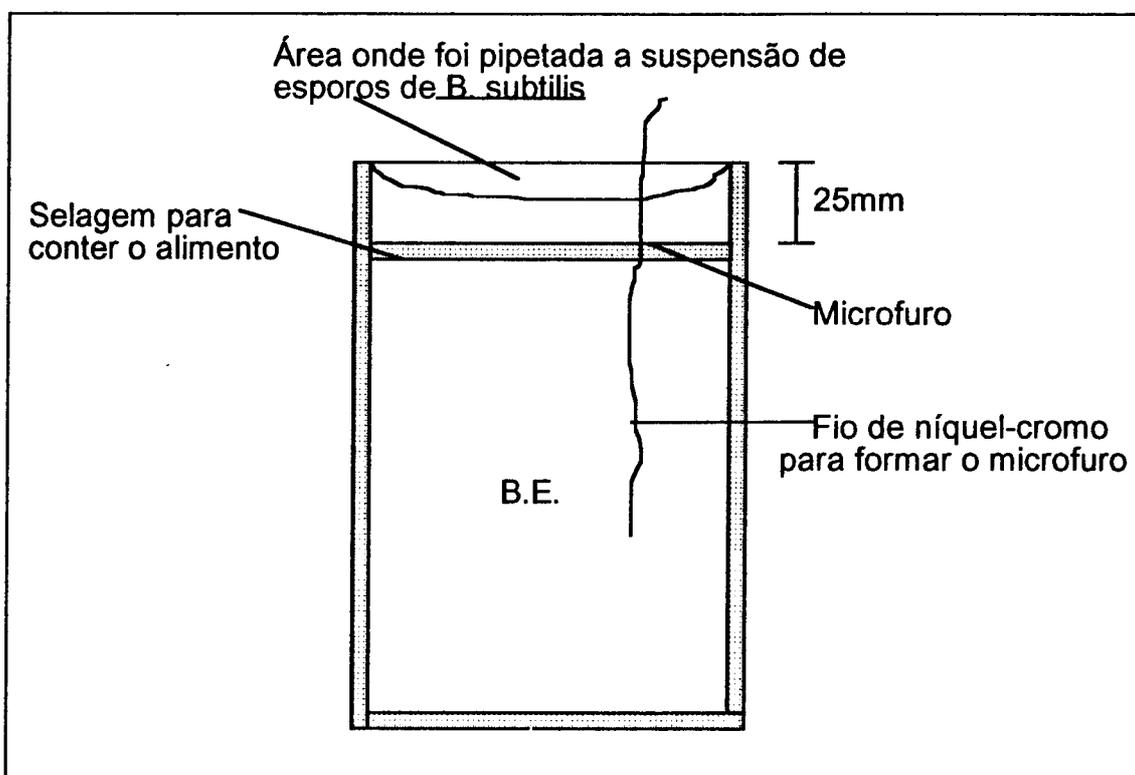


Figura 8 - Desenho esquemático da formação dos microfuros e localização da área da selagem que recebeu a suspensão de *B. subtilis*.

Como mostra a Figura 8, foi deixado um espaço de 25mm acima da selagem de topo para colocar a suspensão de esporos de *B. subtilis*.

4.7.1. Enchimento das B.E.

O enchimento das bolsas com o purê de banana foi conseguido, manualmente, através da utilização de um saco para confeitaria, produzido pelas *Indústrias Kappaz S.A/ Brasil*, que foi colocado na "boca" da embalagem, funcionando como um dosador.

Estas bolsas foram apoiadas numa grade metálica e pesadas (130g de purê cada uma) com a adição crescente e cuidadoso do produto para evitar a contaminação da região de termossoldagem antes da selagem. Com a redução do espaço interno das bolsas, consequência da formação da área em que foi pipetada a suspensão de esporos (ver Fig. 8), o enchimento e posterior fechamento das bolsas só foi conseguido com 130g de purê de banana, pois acima deste peso o produto seria expulso da embalagem no ato da selagem.

4.8. METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DE *B. subtilis*

Os métodos utilizados para produzir esporos de indicadores biológicos devem ser relativamente simples e utilizar meios facilmente preparados que produzam uma alta porcentagem de esporos com alta resistência ao calor.

Inicialmente a suspensão de esporos de *B. subtilis* disponível no Laboratório de Termobacteriologia foi previamente avaliada quanto à possibilidade de estar contaminada, através do método de coloração de Gram e coloração de esporos e, posteriormente, quantificada em placas com agar nutriente para, então, proceder o ajuste na concentração da suspensão que foi utilizada no bioteste.

O método que foi usado para produção e quantificação de esporos de *B. subtilis* foi desenvolvido pelo laboratório de Termobacteriologia da FEA/UNICAMP sendo extremamente simples, prático e de baixo custo, consistindo das seguintes etapas:

1- Esporulação - Inicialmente foi preparado o meio de agar nutriente com 5ppm de sulfato de manganês e 50 ml do mesmo foi dispensado em garrafas de 290 ml de capacidade e esterilizadas a 121°C/15min. Logo após a esterilização, as garrafas foram inclinadas e deixadas à temperatura ambiente e usadas no dia seguinte. Foram inoculados 2,0 ml da suspensão de esporos (10^9 esporos/ml suspensão mãe existente) em cada garrafa, que foram agitadas

lateralmente para favorecer o espalhamento da suspensão na superfície. Em seguida as garrafas foram incubadas inclinadas a 30°C por 48 horas.

2- Coleta de esporos - A cada garrafa foi adicionado 5ml de água estéril, movimentada lateralmente até desprender do fundo a cultura e, com a ajuda de uma bagueta estéril, cuidadosamente foi passada sobre o meio para facilitar o desprendimento. Depois a suspensão resultante foi coletada e distribuída em tubos de centrifuga, previamente estéreis, e procedido a limpeza.

3- Limpeza dos esporos :

a) A suspensão foi centrifugada a 2.700 rpm por 12min., sob refrigeração, e retirado o sobrenadante para eliminar os resíduos do meio. A massa de esporos foi resuspendida, com o adição de 5ml de água estéril, e avaliada sua concentração através de microscópio ótico, empregando o método de coloração de esporos.

b) Repetiu-se o item a, por no mínimo de 5 vezes até que a observação microscópica dos esporos, após a coloração, indicasse eliminação dos restos de células vegetativas.

c) Após a aplicação das centrifugações, foi ajustado o pH da suspensão de esporos até 11,0 e adicionado 0,3mg de lisozima/ml de suspensão. A lise das células ocorre quase imediatamente após a adição da lisozima STUMBO (1973). Em seguida, foi repetido o item a e observado o percentual de esporos apresentado no campo ótico do microscópio.

d) Por fim, o volume da suspensão foi completado até 100ml, com água destilada estéril, acondicionada em um frasco estéril contendo pérolas de vidro e estocada a 4°C.

4 - Quantificação da suspensão:

a) Foi retirado 1ml da suspensão de esporos e procedido a diluição da suspensão até 10^{-10} . Em seguida, foram passadas para placas de Petri as últimas 4 diluições, em duplicata e profundidade, em meio agar nutriente,

incubando-as a 30°C por 24 - 48 horas. Não houve a necessidade da realização de choque térmico para ativação da suspensão.

4.9. BIOTESTE COM ESPOROS DE *B. subtilis*

Antes da aplicação do bioteste com esporos de *B. subtilis* nas bolsas esterilizáveis, contendo purê de banana (pH 4,6), foi avaliada a possibilidade de crescimento desta bactéria no referido alimento. Foram preparados 15 tubos com 10ml purê de banana/tubo e esterilizados à 121°C/15 min. Deste total, 10 foram inoculados com 1,0 ml da suspensão de esporos de *B. subtilis* e 5 serviram como controle negativo de crescimento e esterilidade. Nos tubos positivos foram feitas as seguintes provas bioquímicas de identificação: Gram; catalase; Voges-Proskauer; reação de nitrato; hidrólise de amido; ácido a partir de xilose.

4.9.1. Ensaio de penetração do *B.subtilis* através dos microfuros formados em bolsas antes do processamento.

O objetivo deste ensaio foi avaliar a capacidade de penetração dos esporos de *B.subtilis* nos microfuros formados na área de selagem das B.E., e depois comparar com as bolsas testadas após o processamento térmico, avaliando assim, o efeito da temperatura e pressão aplicadas sobre os defeitos formados nas bolsas.

Foram testados microfuros formados na selagem de topo a partir de fios de níquel-cromo com os seguintes diâmetros: 48 - 79 - 97µm. As bolsas contendo os fios foram autoclavadas a 121°C/15min., depois preenchidas com 130g/bolsa de purê de banana estéril (121°C/15min), em câmara de fluxo, e seladas a vácuo.

As bolsas, imediatamente após a selagem, foram apoiadas verticalmente na câmara de fluxo laminar e foram pipetadas 5ml/bolsa da suspensão de esporos de *B. subtilis* (concentração de 10⁶ esporos/ml), obtida no item 4.8, na área de prolongamento da embalagem formada acima da selagem de topo. Logo após a colocação da suspensão os fios foram retirados das bolsas e as mesmas permaneceram por 60 min. dentro da câmara de fluxo. Para evitar qualquer contaminação ambiental, que não fosse a provocada pelo *B. subtilis*, as bolsas foram cobertas com um laminado estéril composto de plástico e alumínio. Decorrido o tempo de contato com a

suspensão, a mesma foi retirada da área de selagem e as bolsas foram incubadas a 30°C por 7 dias.

Foram utilizadas as seguintes quantidades de bolsas neste ensaio: 8 bolsas com furos formados a partir de fios de 97µm de diâmetro; 8 com furos a partir de fios de 79 µm de diâmetro; 7 com furos a partir de 48µm de diâmetro e 8 bolsas sem fios (controle). Todas as bolsas, inclusive as que não continham fios na área de selagem foram testadas com o bioteste de esporos de *B.subtilis*.

Decorrido o prazo de 7 dias, foram coletadas, próximo ao microfuro formado, amostras de 10g / bolsa ensaiada que foram passadas para placas de Petri, em duplicatas, somente a primeira diluição. Neste ensaio foi utilizado Petrifilm para contagem padrão (PCA), pela praticidade e rapidez na confirmação do crescimento bacteriano. As placas de Petrifilm, consideradas positivas, foram as que apresentaram pontuações avermelhadas, indicando assim, a presença do microrganismo através da reação com o indicador Tetrazolium contido no meio.

A confirmação bioquímica do *B. subtilis* foi feita a partir das colônias isoladas em tubos de agar nutriente, das placas positivas, que foram submetidas às seguintes provas: Voges-Proskauer; reação de nitrato; hidrólise de amido; ácido a partir de xilose; catalase; reação de Gram.

4.9.2. Aplicação do bioteste em bolsas pós-processo.

Após o preparo da suspensão de esporos, esta foi diluída até uma concentração de 10⁶ esporos/ml e pipetada na área de prolongamento da embalagem, formada acima da selagem do topo das bolsas, aproximadamente 5ml/bolsa (Fig.8). Após o processo térmico, as embalagens que receberem a suspensão de esporos foram acomodadas verticalmente em um suporte metálico por 60 minutos, à temperatura ambiente e dentro de uma câmara de fluxo laminar, e cobertas com um laminado estéril (de plástico e alumínio) para evitar qualquer contaminação ambiental que não fosse a intencionalmente provocada.

Foram utilizadas as seguintes quantidades de bolsas no ensaio com o bioteste: 24 bolsas com furos formados a partir de fios com 97µm de diâmetro; 26 bolsas com furos formados a partir de fios com 79µm; 26 bolsas com furos formados a partir de fios com 48µm; 18 bolsas com furos formados a partir de fios com 32µm. Para as

bolsas controle (sem furos) foram testadas 22. Foram também testadas com o bioteste bolsas com os fios mantidos na área de selagem após serem processadas, sendo: 22 bolsas com fios de 97 μ m de diâmetro; 16 bolsas com fios de 79 μ m; 10 bolsas com fios de 48 μ m e 12 bolsas com fios de 32 μ m de diâmetro.

Em seguida, a suspensão de esporos foi retirada da área que foi pipetada e as embalagens foram incubadas a 30°C por 7 dias.

4.9.2.1. Confirmação do crescimento bacteriano

Decorrido o prazo de incubação, foram colhidas amostras do purê de banana de todas as bolsas ensaiadas pelo bioteste, próximo ao microfuro formado na área da selagem, para confirmação do crescimento bacteriano. Para isto foi utilizado uma espátula de vidro que facilitou a retirada do produto das bolsas como também a sua limpeza e esterilização. As amostras foram passadas para frascos estéreis, contendo água destilada, na mesma proporção de peso/volume, pois tratava-se de um produto de viscosidade alta e que apresentava grande dificuldade na quantificação e coleta do volume através de pipetas. A partir daí, as amostras foram passadas para placas de Petri, em duplicatas e em profundidade, em meio agar nutriente e incubadas a 30°C por 24 - 48 horas.

Nas placas que apresentaram crescimento, foram isoladas colônias típicas em tubos com agar nutriente e, posteriormente, foram submetidas às provas bioquímicas já descritas no item 4.9.1.

Retirada a alíquota para a confirmação da penetração do *B.subtilis*, as bolsas esterilizáveis, usadas no bioteste, foram lavadas e secas, cuidadosamente, e depois foram utilizadas na confirmação dos microfuros pelo teste eletrolítico.

4.10. MEDIÇÃO DOS MICROFUFOS POR MICROSCÓPIO

Os microfuros feitos na área de selagem de topo das bolsas, através dos fios de níquel-cromo, foram medidos através de um Banco Metalográfico, Neophot 32 (*Carl Zeiss*), contendo um microscópio de luz refletida com capacidade de 1000 vezes de aumento, e uma escala ocular para efetuar a medição de materiais (Laboratório de Metalografia da Faculdade de Engenharia Mecânica/UNICAMP).

Foram preparadas 4 amostras de cada diâmetro de fio usado, obtidas a partir de bolsas seladas nas mesmas condições que foram utilizadas no bioteste. Estas amostras foram preparadas em blocos de resina epoxi e depois passadas por um processo de lixamento e limpeza da superfície. Para se obter uma imagem nítida e perfeita da estrutura e dos microfuros, estes cuidados foram necessários, pois o equipamento registra imagens a partir da luz refletida.

Os resultados dos diâmetros medidos através do microscópio, com 250 vezes de aumento, foram comparados com os diâmetros dos fios empregados na formação dos microfuros e estabelecido a média aproximada (Fig. 23 e 24)

4.11. CONFIRMAÇÃO DOS MICROFUROS PELO TESTE ELETROLÍTICO

Seguindo as recomendações do trabalho de AXELSON *et.al.* (1990), o teste foi aplicado em todas as bolsas que foram testadas anteriormente pelo esporo teste, inclusive as bolsas controle (sem furo), e estabelecidas as seguintes condições de aplicação: concentração da solução eletrolítica com 1% de NaCl; temperatura ambiente; voltagem de 10V; corrente contínua e um amperímetro com exatidão de 0,1 μ A.

Os testes foram realizados no Laboratório de Embalagem da Companhia Industrial e Mercantil Paoletti, Jundiaí/São Paulo, onde as bolsas foram colocadas dentro de um reservatório plástico, contendo a solução eletrolítica, e cheias com a mesma solução. Dois eletrodos foram posicionados para medir a condutância elétrica: um dentro da embalagem e o outro fora dela, dentro do reservatório em contato com a solução de NaCl (Fig. 9).

Foram consideradas positivas, as bolsas testadas que acusaram leitura no microamperímetro, indicando assim, a condutância elétrica através da solução eletrolítica.

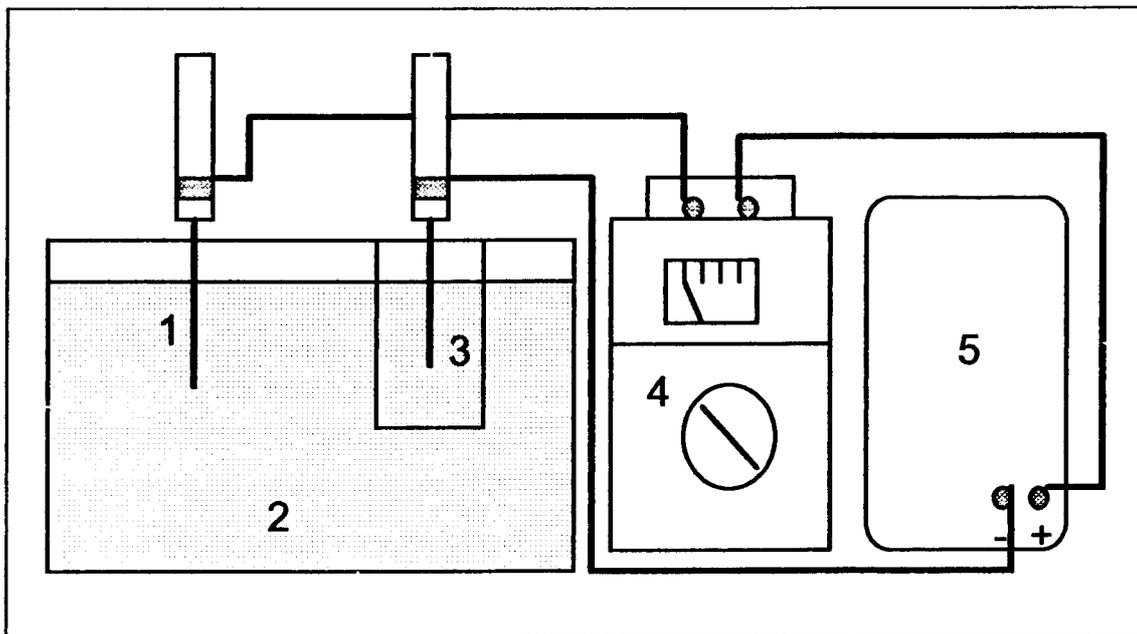


Figura 9 - Aparelho usado para determinação dos microfuros: 1) par de eletrodos; 2) solução eletrolítica (NaCl) em tanque de plástico; 3) bolsa analisada; 4) amperímetro; e 5) fonte de corrente contínua.

4.12. RESUMO DA METODOLOGIA APLICADA NO BIOTESTE DE BOLSAS ESTERILIZÁVEIS

A Figura 10 mostra todas as etapas desenvolvidas durante a pesquisa.

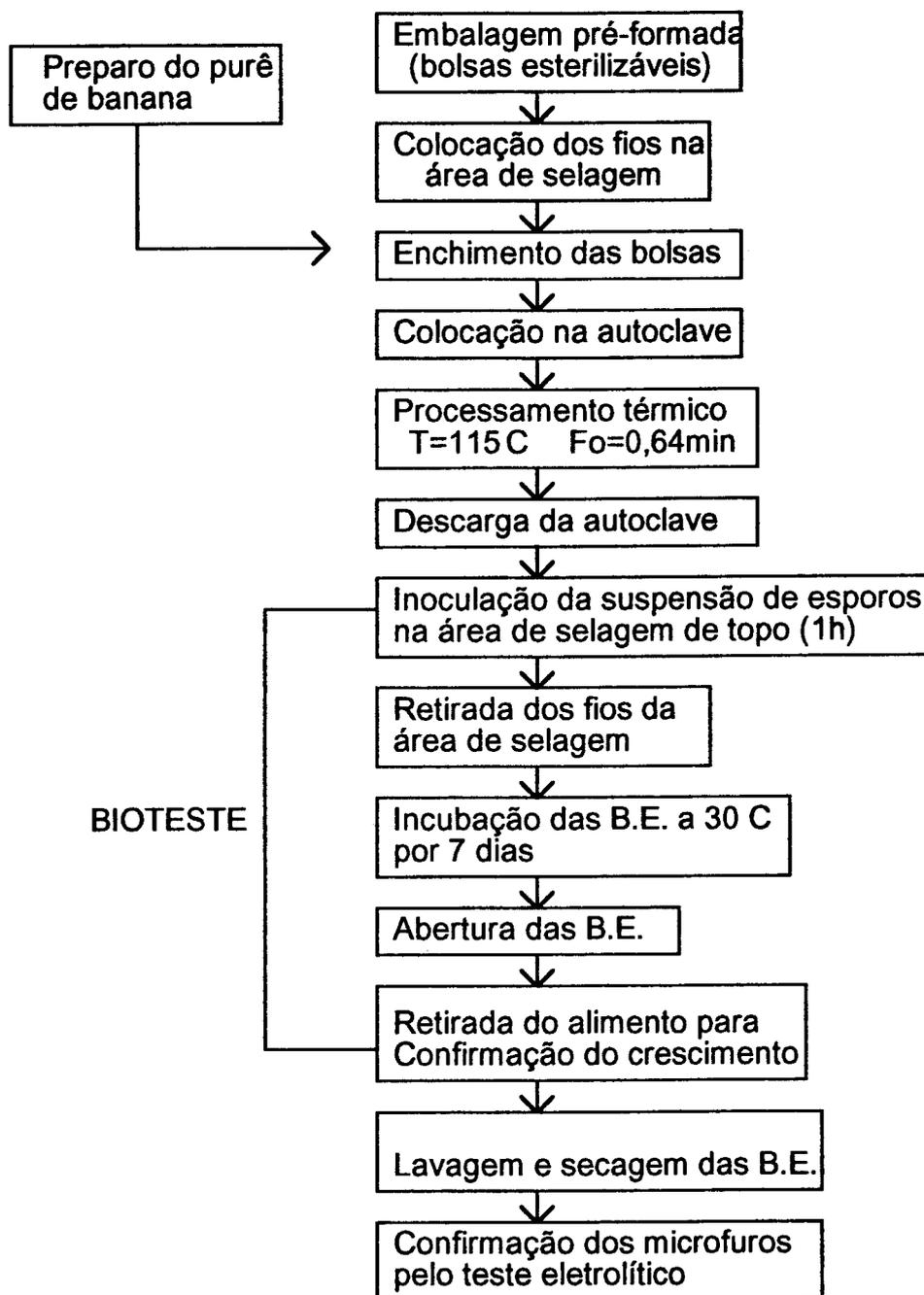


Figura 10 - Fluxograma da metodologia aplicada na pesquisa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO PURÊ DE BANANA

Na caracterização do purê de banana, além da viscosidade e da determinação da carga microbiana inicial, foi medido o pH, ficando numa faixa de 4,6 - 4,7.

5.1.1. Determinação da viscosidade do purê de banana

Visando determinar a influência da temperatura na viscosidade aparente (η_a) do purê de banana, fez-se a determinação de sua viscosidade aparente e do índice de comportamento reológico n , em três diferentes temperaturas: 30, 45 e 75°C, seguindo metodologia descrita no ítem 4.1.2.

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos para a leitura do viscosímetro, as velocidades de rotação aplicadas (rpm), os fatores de conversão específicos tabelados para a haste ("spindle") usada (LV4) e a viscosidade aparente (η_a), expressa em centipoise.

Tabela 3 - Determinação da viscosidade aparente, do purê de banana em viscosímetro rotacional Brookfield - LVT.

Velocidade (rpm)	Fator de conversão LV4	Leitura do viscosímetro LVT			Viscosidade aparente (η_a) (centipoise)		
		30°C	45°C	75°C	30°C	45°C	75°C
0,6	10000	14,0	23,0	26,0	140000	230000	260000
1,5	4000	16,5	31,0	34,0	66000	124000	136000
3	2000	19,5	38,0	41,5	39000	76000	83000
6	1000	21,0	47,5	46,5	21000	47500	46500
12	500	25,0	52,0	54,0	12500	26000	27000
30	200	31,0	54,0	61,5	6200	10800	12300
60	100	33,5	68,0	70,0	3350	6800	7000

rpm= rotações por minuto;

A Figura 11 mostra a relação entre a viscosidade aparente (η_a), para as três temperaturas, proporcional à tensão de cisalhamento (τ) e a velocidade de rotação (rpm) que é proporcional à taxa de deformação ($\dot{\gamma}$), evidenciando que o purê de banana obedece à lei de potência, segundo a Equação 4. Obteve-se os coeficientes de correlação de 0,9722; 0,9743 e 0,9744 para as temperaturas: 30, 45 e 75°C, respectivamente.

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (4)$$

sendo (τ) = f (leitura do viscosímetro), ($\dot{\gamma}$) = f (velocidade de rotação) e K índice de consistência e n índice de comportamento reológico (CANTU LOZANO *et. al.* 1994).

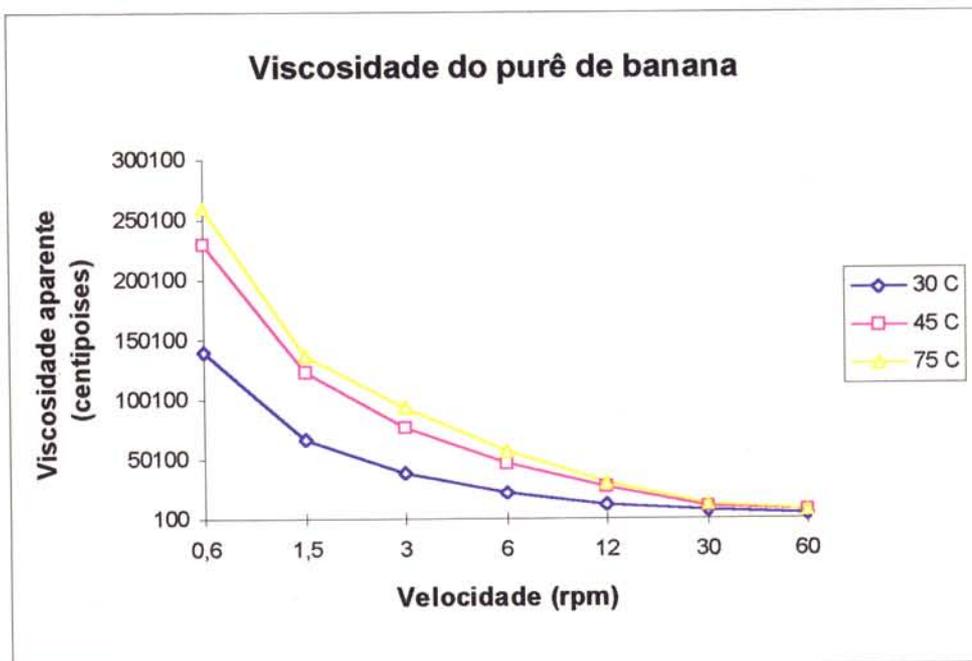


Figura 11 - Relação entre viscosidade aparente e velocidade de rotação para o purê de banana determinadas em três diferentes temperaturas.

O índice de comportamento reológico n do purê de banana para as temperaturas 30, 45 e 75°C, teve uma variação muito pequena em função da temperatura, conforme mostra a Tabela 4 e o gráfico da Figura 12 (log da leitura do viscosímetro pelo log da velocidade de rotação). Como o coeficiente angular da reta foi menor que 1, pode-se assumir que o produto se comporta como pseudo-plástico (VITALI, 1981).

Tabela 4 - Variação do índice de comportamento reológico com a temperatura.

TEMPERATURA (°C)	n	r^2
30	0,195	0,9936
45	0,230	0,9687
75	0,208	0,9814

n = índice de comportamento reológico; r^2 =coeficiente de correlação de linearidade

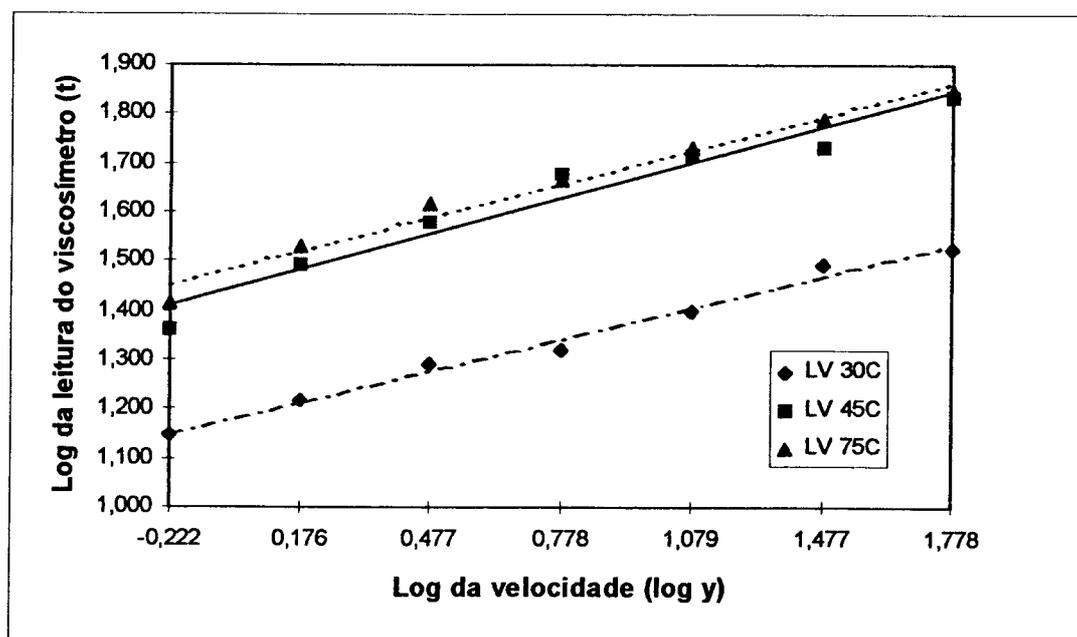


Figura 12 - Comportamento reológico do purê de banana (variedade nanica *Musa cavendish*) em três diferentes temperaturas.

O gráfico da Figura 13 mostra a variação da viscosidade aparente (η_a), no intervalo da velocidade de rotação média (30 rpm), medida nas temperaturas testadas: 30, 45 e 75 °C

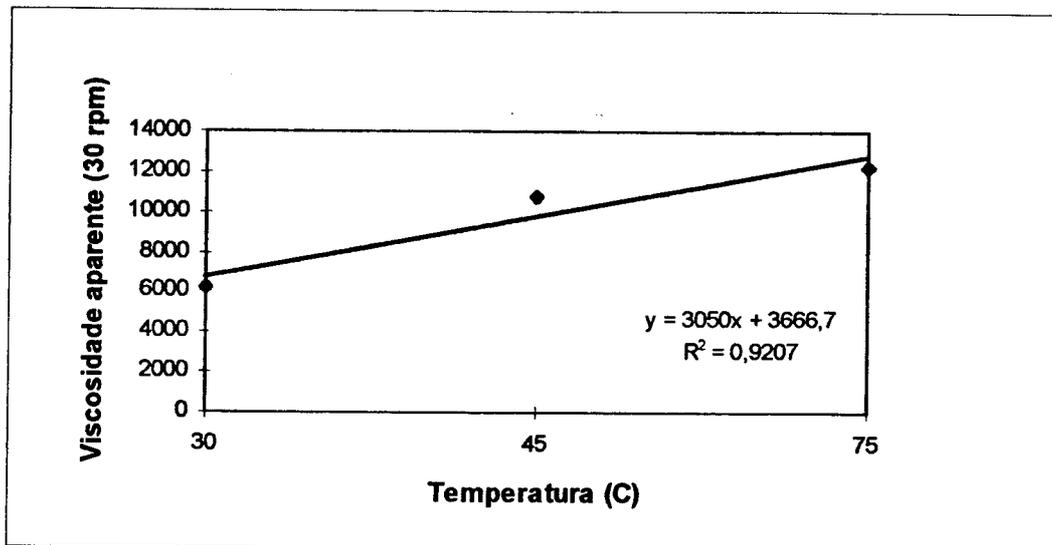


Figura 13 - Variação da viscosidade aparente com a temperatura, no intervalo de velocidade de rotação média (30 rpm).

Os resultados confirmam que esse modelo da lei de potência, amplamente usado para descrever o comportamento reológico de purês e sucos de frutas (VITALI, 1981), pode ser aplicado para o purê de banana natural como alimento de alta viscosidade, mesmo quando submetido à diferentes temperaturas.

A importância de se usar um produto altamente viscoso na aplicação do bioteste foi a de estabelecer a capacidade de bloqueio dos microfuros, intencionalmente formados, por este tipo de alimento. Pelos resultados obtidos no ítem de aplicação do bioteste, pode-se notar que não houve este tipo de entupimento, pois o ensaio foi capaz de detectar microfuros com diâmetros de até 48 μm .

5.1.2. Ensaio de determinação da carga microbiana inicial do purê de banana

O número total de bactérias mesófilas aeróbias encontradas no purê de banana natural, antes de ser embalado, foi relativamente constante, apresentando $4,5 \times 10^3$ células por grama do produto, como valor médio de 5 repetições.

Não foram detectados esporulados mesófilos anaeróbios nem termófilos anaeróbios pelas técnicas empregadas. Entretanto, YOKOYA (1969) encontrou uma faixa de 2 a 70 esporos de termófilos aeróbios em cada 100g da banana *in natura* de 5 variedades diferentes, inclusive a nanica.

Atualmente é conhecido que este choque térmico empregado por YOKOYA (1969), para eliminação de formas vegetativas, não é suficiente para ativar termófilos, portanto, a carga de termófilos do purê de banana pode ser mais expressiva quando aplicados outros métodos

5.2. OTIMIZAÇÃO DA SELADORA

5.2.1. Determinação do tempo de solda

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados da seleção das condições aplicadas na termosoldagem de topo em função do tempo de contato do mordente da MINIVAC CV 18 .

A melhor termosoldagem para bolsas vazias, obtida neste equipamento, foi com o tempo de contato aplicado para fechamento das bolsas de 5,67 segundos (escala 4 da seladora), pois apresentaram excelente aparência (G1), presença de fusão, uma resistência média à tração e uma resistência média ao estouro maiores que as outras escalas, com um menor coeficiente de variação entre as amostras, e enquadradas nas faixas aceitáveis descritas anteriormente no item 4.4. sobre o desempenho das bolsas esterilizáveis (Tabela 6).

Tabela 5 - Ensaio de resistência à tração (N/25mm), realizado a partir de amostras obtidas de bolsas vazias seladas na MINIVAC CV-18.

AMOSTRA	TEMPO DE SOLDA		
	5,1 min.	5,67 min.	5,67 min.
1	90,25	89,3	88,3
2	88,3	90,25	88,3
3	90,25	90,25	89,3
4	88,3	90,25	91,2
5	88,3	89,3	91,2
6	89,3	88,3	90,25
7	89,3	88,3	92,2
8	88,3	89,3	88,3
9	87,3	88,3	89,3
10	85,3	90,25	91,2
MÉDIA	88,5	89,38	89,95
D.P.	1,46	0,85	1,45
C.V.(%)	1,65	0,95	1,61

D.P. = desvio padrão ; C.V. = coeficiente de variação;

Tabela 6 - Teste de estouro (Kpa) realizado em bolsas que foram seladas vazias na MINIVAC CV-18.

AMOSTRA	TEMPO DE SOLDA		
	5,1 min.	5,67 min.	5,67 min.
1	63,4	62,7	62
2	62	63,4	62
3	63,4	63,4	62,7
4	62	63,4	64
5	62	62,7	64
6	62,7	62	63,4
7	62,7	62	64,8
8	62	62,7	62
9	61,4	62	62,7
10	60	63,4	64
MÉDIA	62,16	62,77	63,16
D.P.	1,0	0,61	1,02
C.V.(%)	1,61	0,97	1,61

D.P. = desvio padrão ; C.V. = coeficiente de variação;

Tabela 7 - Condições selecionadas para otimizar a termossoldagem das bolsas esterilizáveis vazias.

ESCALA DE SOLDA¹	TEMPO DE CONTATO (seg.)	RESISTÊNCIA À TRACÇÃO² (N/300mm)	FUSÃO	ASPECTO VISUAL	RESISTÊNCIA AO ESTOURO³ (Kpa)
2*	03:46	nd	-	nd	nd
3	05:10	88,3	+	G1	539
4	05:67	89,3	+	G1	548,7
5	05:67	89,3	+	G1	548,7

1 = Escala numérica aleatória existente no painel da seladora

2 = média de 10 corpos de prova ASTM (1990); 3 = média de 10 bolsas ASTM (1990)

* Nesta escala não houve termossoldagem nem fusão.

5.2.2. Determinação do vácuo aplicado no fechamento das bolsas e do ar residual remanescente

A escala ótima do vácuo foi determinada a partir da capacidade de contenção do produto na embalagem e da quantidade do ar residual remanescente após a selagem das mesmas. As bolsas foram preenchidas com 130g de purê de banana a 35°C.

A determinação da quantidade do ar residual dentro das bolsas foi realizado para confirmar a eficiência do vácuo no fechamento das bolsas com 130g do produto. O teste foi realizado à temperatura ambiente e foi encontrado uma média de 2,7ml/bolsa, com um vácuo de 25 mmHg, por 10 amostras, com um desvio padrão de 0,07 e coeficiente de variação de 3%. Esta média ficou abaixo do limite máximo recomendado pelo fabricante das mesmas (TOYO SEIKAN) que é de 5,0ml/bolsa. A Tabela 8 apresenta estes resultados.

Tabela 8 - Condições selecionadas para a otimização do vácuo aplicado nas bolsas esterilizáveis, contendo 130g de purê de banana, e com tempo de solda de 5,67 segundos (escala 4 da seladora).

ENSAIO*	Escala	Vácuo (mmHg)	Média de ar residual (ml)	Observações
I	1	5	nd	não houve fechamento das bolsas
II	2	20	6,0	acima do recomendado pelo fabricante (TOYO SEIKAN (1994))
III	3	25	2,7	ideal
IV	4	27	nd	expulsão do purê para fora da bolsa

* cada ensaio foi realizado com 10 bolsas

nd = não determinado

Como o fechamento das bolsas só pode ser feita na posição inclinada, houve uma limitação na aplicação do vácuo, ficando como escala limite de uso 25mmHg. A aplicação do teste em escalas maiores que 25mmHg resultou na expulsão do purê de banana para fora da embalagem. Este volume conseguido, 2,7 ml/bolsa, não compromete a performance das bolsas durante o processo. Sendo assim, foi selecionado o tempo de solda de 5,67 segundos (escala 4 da seladora) e 25 mmHg (escala 3) para a termosselagem das bolsas usadas nos processos posteriores.

5.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE DESEMPENHO DAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS ANTES E DEPOIS DO PROCESSO TÉRMICO

5.3.1. Aparência visual das soldas das bolsas

A única selagem de topo, com largura de 4mm, feita na seladora de impulso elétrico MINVAC CV18, para o fechamento das bolsas esterilizáveis, foi avaliada visualmente antes e depois do tratamento térmico.

Os resultados obtidos foram excelentes, onde não foram detectados quaisquer defeitos que pudessem comprometer a hermeticidade das bolsas. Segundo a escala

aplicada (OLIVEIRA & ALVES, 1992), todas obtiveram grau 1 (G1) como atributo à qualidade visual da termossoldagem, ou seja, nenhuma bolha ou enrugamento provocado pelo calor foi detectado nas mesmas, antes e depois do processamento.

5.3.2. Determinação da presença de fusão na região de termossoldagem das bolsas esterilizáveis

A fusão é o produto da realização de uma ótima termossoldagem. A ausência desta fusão geralmente está atribuída às condições que foram executado o fechamento das bolsas, isto é, otimização da seladora e/ou contaminação da área de selagem pelo próprio alimento ou por vapor de água, proveniente do alimento quando embalado à quente.

Os resultados da ocorrência de fusão na selagem de topo, antes e depois do processo, foram determinados quando da execução dos testes de tração. Em todas as amostras submetidas a este ensaio, as superfícies internas, unidas pela selagem, sofreram quebra e delaminação quando tracionadas, ou seja, não foi possível separar as camadas internas das bolsas, de polipropileno (PP), depois da termossoldagem.

5.3.3. Determinação da resistência das bolsas à delaminação

Este ensaio serviu para avaliar a qualidade da fabricação do laminado e sua resistência quando submetido a um processamento térmico com sobrepressão.

O ensaio de resistência à delaminação foi realizado na camada interna de amostras obtidas a partir de bolsas antes e depois de serem processadas. Os resultados obtidos foram registrados e determinada a resistência média à delaminação (Tabela 9). Segundo OLIVEIRA *et. al.* (1990), a faixa ótima deste teste fica em torno de 9,81 a 17,66 N/25mm, confirmando assim, a excelente qualidade da estrutura.

Tabela 9 - Ensaio de resistência à delaminação da camada interna das bolsas seladas na MINIVAC CV-18 (escala 4) com 5,67 seg. de tempo de solda, antes e depois de serem termoprocessadas.

AMOSTRA	RESISTÊNCIA À DELAMINAÇÃO (N/30mm)	
	ANTES DO PROCESSO	DEPOIS DO PROCESSO
1	13,7	13,7
2	13,7	14,7
3	13,7	12,7
4	13,7	13,7
5	13,7	14,7
6	14,7	13,7
7	13,7	12,7
8	13,7	13,7
9	13,7	12,7
10	13,7	13,7
MÉDIA	13,8	13,6
D.P.	0,316	0,74
C.V.(%)	2,29	5,4

D.P. = desvio padrão ; C.V. = coeficiente de variação;

5.3.4. Determinação da resistência da termossoldagem à tração

A determinação da resistência da termossoldagem à tração foi avaliada nas três escalas de tempo de soldagem, determinadas anteriormente na otimização da seladora MINIVAC CV18, e a escala de vácuo fixa (25 mmHg) para garantir a quantidade mínima de ar residual.

O efeito das operações de enchimento, selagem e processamento térmico sobre a resistência, foi verificado em amostras obtidas a partir de bolsas antes e depois de serem processadas.

Os resultados apresentados na Tabela 10, mostram as resistências da termossoldagem à tração para cada corpo de prova e calculada a média e o coeficiente de variação para cada tempo de soldagem.

Tabela 10 - Ensaio de resistência à tração da termossoldagem de bolsas seladas na MINIVAC CV-18 (escala 4) com o tempo de solda de 5,67 seg., antes e depois de serem termoprocessadas.

AMOSTRA	RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (N/25mm)	
	ANTES DO PROCESSO	DEPOIS DO PROCESSO
1	91,2	78,5
2	86,3	78,5
3	88,3	79,5
4	83,4	79,5
5	86,3	80,4
6	88,3	80,4
7	88,3	83,4
8	83,4	80,4
9	83,4	79,5
10	82,4	81,4
MÉDIA	86,13	80,15
D.P.	2,91	1,45
C.V.(%)	3,4	1,81

D.P. = desvio padrão ; C.V. = coeficiente de variação;

Para definir a alta performance da selagem de bolsas esterilizáveis a FDA estabelece 20,6 N/10mm e OLIVEIRA *et. al.* (1990) cita como faixa aceitável para resistência da termossoldagem à tração de 53 a 86,3 N/25mm. Como já foi visto na Tabela 10 todas as amostras testadas apresentaram valores considerados dentro da faixa de aceitação, entretanto, notou-se uma ligeira diminuição desta resistência para as amostras obtidas de bolsas depois de serem processadas.

5.3.5. Determinação da resistência das B.E. à pressão interna

A Tabela 11 apresenta os resultados dos ensaios de resistência à pressão interna das bolsas antes e depois do tratamento térmico. Estes resultados referem-se à capacidade de suporte de pressão hidrostática crescente, aplicada dentro das bolsas.

Os resultados foram determinados pelas médias de cada lote testado e seguido os padrões recomendados pelo fabricante do aparelho, que determina uma faixa mínima de 310,3 Kpa e um valor típico de 379,3 Kpa, REYNOLDS METALS COMPANY - RTM 832 (1979). Já a METAPAK RP-F SPECIFICATION (1973)

determina que o valor mínimo para este teste de 276 Kpa. A TOYO SEIKAN (1994) indica um valor máximo de 686,2 Kpa para bolsas esterilizáveis hiRP-F. Segundo OLIVEIRA *et. al.* (1990), a faixa aceitável para a resistência à pressão interna de B.E. é de 276 a 441 Kpa.

Os valores médios obtidos variaram de 496,5 a 517,2 Kpa, indicando, portanto, uma performance das bolsas acima das faixas típicas anteriormente mencionados. Também foi observado que as embalagens testadas pós-processo mostraram uma ligeira queda na resistência a este teste, evidenciando assim, o efeito do tratamento térmico neste tipo de material.

Tabela 11 - Ensaio de pressão interna aplicado nas bolsas seladas na seladora MINIVAC CV-18, com 25 mmHg de vácuo (escala 3 da seladora) e tempo de solda de 5,67 seg. (escala 4 da seladora) antes e depois processo térmico.

AMOSTRA	PRESSÃO INTERNA (Kpa)	
	ANTES DO PROCESSO	DEPOIS DO PROCESSO
1	538	524
2	496,5	496,5
3	524	510,3
4	510,3	531
5	510,3	503,4
6	524	510,3
7	510,3	510,3
8	524	510,3
9	524	496,5
10	510,3	510,3
MÉDIA	517,2	510,3
D.P.	11,72	10,77
C.V.(%)	2,27	2,11

D.P. = desvio padrão ; C.V. = coeficiente de variação;

5.4. ENSAIOS DE DISTRIBUIÇÃO DE CALOR NA AUTOCLAVE

Para o processamento de embalagens flexíveis esterilizáveis, houve a necessidade de se fazer uma adaptação na autoclave para o processamento das mesmas, o estudo da distribuição da temperatura durante o processo foi o principal meio de se avaliar as condições de circulação do meio de aquecimento dentro da cesta,

após a colocação dos blocos de bandejas. A identificação da região de aquecimento mais lento (ponto frio) foi muito importante para garantir a melhor transferência de calor no interior da autoclave.

Os testes foram conduzidos a 115 e 121°C com sobrepressão de 158 Kpa e em todos os ensaios o tempo de subida da temperatura de processo ("come-up time") foi de 6,0 minutos, para as leituras de temperatura feitas pelo RTD do tanque de trabalho e o MIG, e 4,0 min., para as leituras dos termopares., como mostra a Figura 14.

Notou-se que devido a sua localização , na linha de dreno, fora do tanque de trabalho, o MIG apresentou uma temperatura em torno de 0,7°C abaixo da média registrada pelos termopares no cesto e o RTD, com o sensor localizado na entrada de vapor do tanque de trabalho, aproximadamente 1,0°C acima destas médias (ver Fig. 15 e 16), daí a importância de saber estas diferenças para que não ponha em risco o processamento térmico dos produtos, caso contrário pode-se estar colocando no mercado produtos sub-processados, se o acompanhamento for apenas pelo RTD do tanque de trabalho, ou produtos super-processados quando o processo for referenciado pelo MIG. PARK *et. al.* (1990) também observaram que neste tipo de autoclave, por imersão de água, tanto o MIG como o RTD mostram temperaturas diferentes daquelas registradas dentro do cesto. O correto seria ter um sensor localizado no interior do cesto para acompanhar o processo.

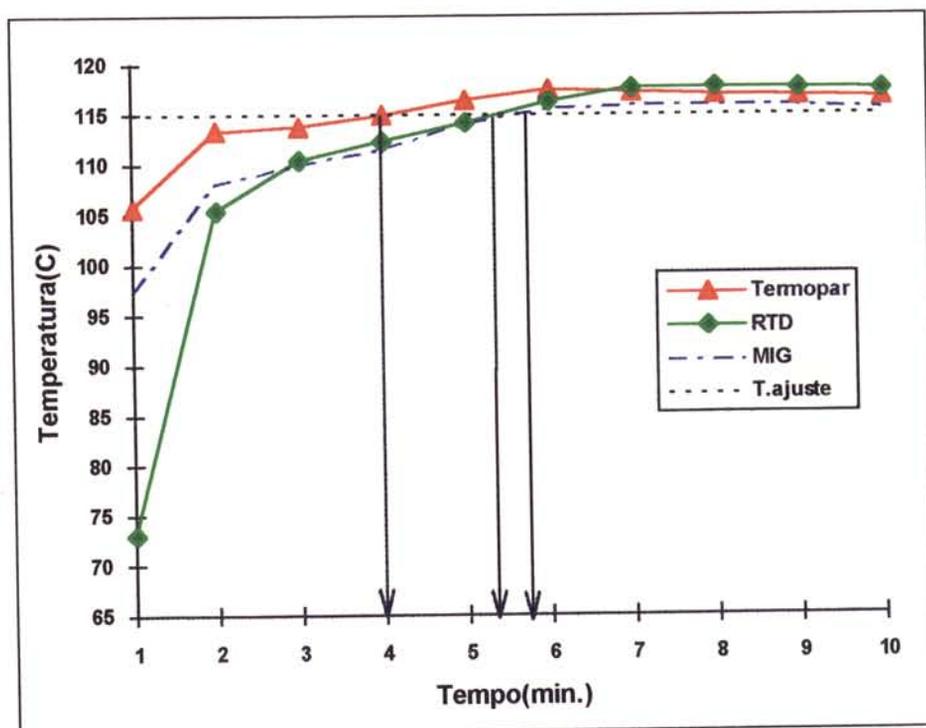


Figura 14 - Gráfico comparativo dos tempos de subida "come-up time" obtidos pelas temperaturas do MIG, RTD e um termopar localizado embaixo do cesto, nos ensaios de distribuição de temperatura realizados na Allpax para o processamento de B.E.

Os Quadros 3 e 4 mostram os dados obtidos dos ensaios de distribuição, onde foram analisadas as temperaturas das posições frente/direita, frente/meio, centro e fundo, com a utilização de 7 blocos de bandejas. Pode-se notar que as zonas de aquecimento mais lento estavam localizadas no bloco de topo do arranjo (bloco 7), possivelmente, devido a grande porção de água que entra pelo fundo do tanque de trabalho.

As diferenças máximas entre as leituras de temperatura dos termopares não ultrapassaram 0,5°C. Os requerimentos do NPFA (citado por CAMPBELL e RAMASWAMY, 1992) recomendam que esta diferença máxima não seja superior a 0,9°C, após a estabilização da temperatura no interior da autoclave. Sendo assim, os resultados mostraram-se bastante satisfatórios, quanto à uniformidade de temperatura no conjunto bandejas/autoclave, durante o processo. Caso a variação entre estes valores for maior que a requerida pela NPFA, haveria necessidade de modificações no sistema de confinamento das embalagens (RAMASWAMY *et. al.*, 1991).

Quadro 3 - Parâmetros diferenciais da distribuição de temperatura com a utilização de 7 blocos de bandejas para as posições frente/direita (FD)-frente/meio (FM)-centro (C). Espaçadores de 4,0 cm entre blocos.

PARÂMETROS COMPARATIVOS	TEMPRATURA °C	
	115	121
- Média da temperatura dentro da autoclave.	115,7	120,9
- Desvio padrão da temperatura média da autoclave.	±0,5	±0,6
- Diferença máxima entre MIG e temperatura média da autoclave.	0,6	0,9
- Diferença máxima entre as temperaturas dos termopares.	0,3	0,5
- Média da posição mais fria.	115,5	120,6
- Pontos de aquecimento mais lento no conjunto de bandejas.	FD e C / B-7	FM / B-7

MIG= "mercury-in-glass" - termômetro de referência; B-7= bloco 7

Quadro 4 - Parâmetros diferenciais da distribuição de temperatura com a utilização de 7 blocos de bandejas para as posições frente/direita (FD); centro (C); fundo (FU). Espaçadores de 4,0 cm entre blocos.

PARÂMETROS COMPARATIVOS	TEMPERATURA ° C	
	115	121
- Média da temperatura dentro da autoclave.	115,7	120,8
- Desvio padrão da temperatura média da autoclave.	±0,5	±0,7
- Diferença máxima entre MIG e temperatura média da autoclave.	0,9	0,5
- Diferença máxima entre as temperaturas dos termopares.	0,4	0,4
- Média da posição mais fria.	115,5	120,5
- Pontos de aquecimento mais lento no conjunto de bandejas.	FU / B-7	FM e C / B-7

MIG= "mercury-in-glass" - termômetro de referência; B-7= bloco 7

Outra informação importante na avaliação da distribuição de temperatura é que a diferença máxima entre a temperatura registrada pelo termômetro de referência (MIG) e a média das temperaturas no interior da autoclave não ultrapasse 1,8°C (NPFA, 1985). Nos ensaios realizados a 115 e 121°C esta diferença ficou em torno de 0,7°C, concordando assim, com os padrões internacionais estabelecidos para o processamento térmico de alimentos.

As Figuras 15 e 16 são exemplos de gráficos da uniformidade da temperatura, para as posições frente/direita, frente/meio, centro e fundo dos termopares localizados nas bandejas. Cada ponto representa a temperatura média de cada posição, com seu desvio padrão (acima e abaixo) e a linha inteira representa a média geral do ensaio (ver Figura 2 para identificação das posições na bandeja).

Os ensaios conduzidos com 4 blocos de bandejas, com espaçadores de 80 mm, mostraram uma diferença máxima de temperaturas entre termopares de 0,3°C, com um desvio padrão de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Os pontos de aquecimento mais lento foram evidenciados no bloco de topo (bloco 4) para as posições frente/meio e centro.

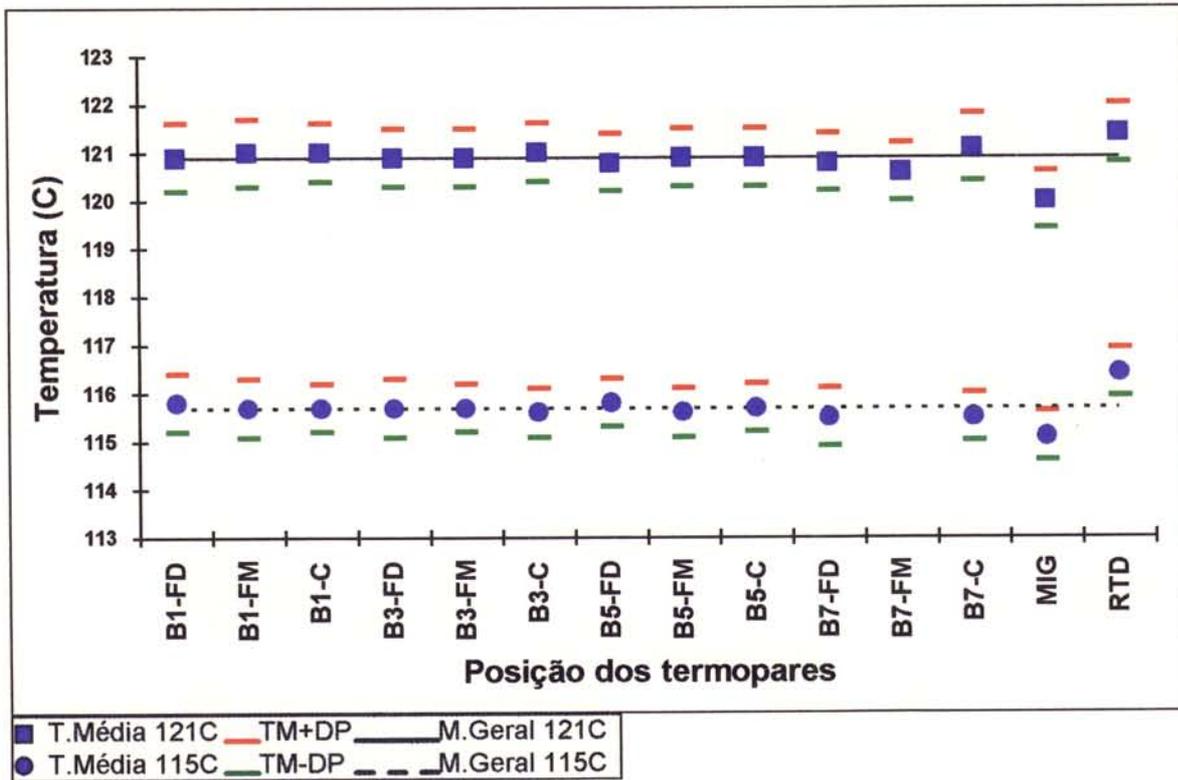


Figura 15 - Média das temperaturas por posição dos termopares usados no processamento de bolsas esterilizáveis (posições: frente/direita, frente/meio e centro).

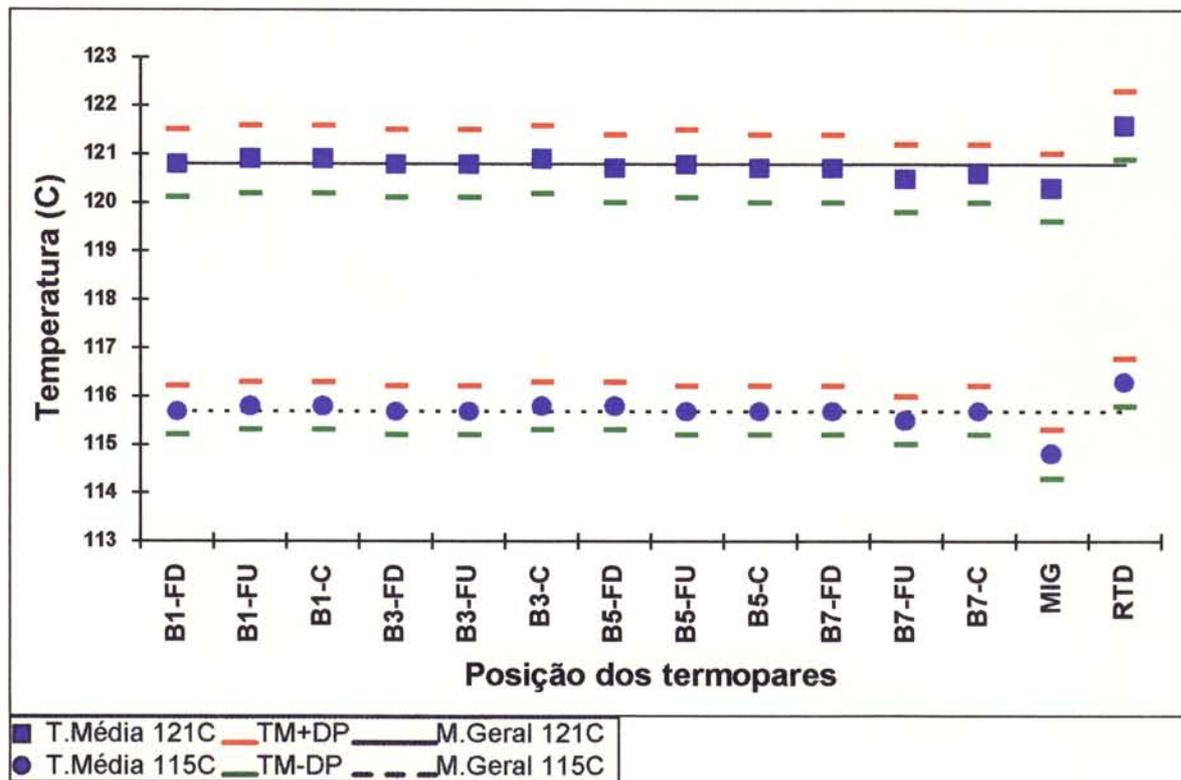


Figura 16 - Média das temperaturas por posição dos termopares usados no processamento de bolsas esterilizáveis (posições: frente/direita, centro e fundo).

Observa-se também, através dos Quadros 3 e 4, que os pontos mais frios foram identificados nas posições frente/direita, centro e fundo, para a temperatura 115°C, e frente/meio e centro para a temperatura 121°C no bloco de bandejas 7.

As Figuras 17 e 18 representam a estabilidade da temperatura no interior da autoclave, onde as médias das temperaturas por tempo de processo facilitaram a visualização da amplitude de oscilação das temperaturas e serviram como indicativo da precisão do sistema. O desvio padrão obtido foi de 0,5°C.

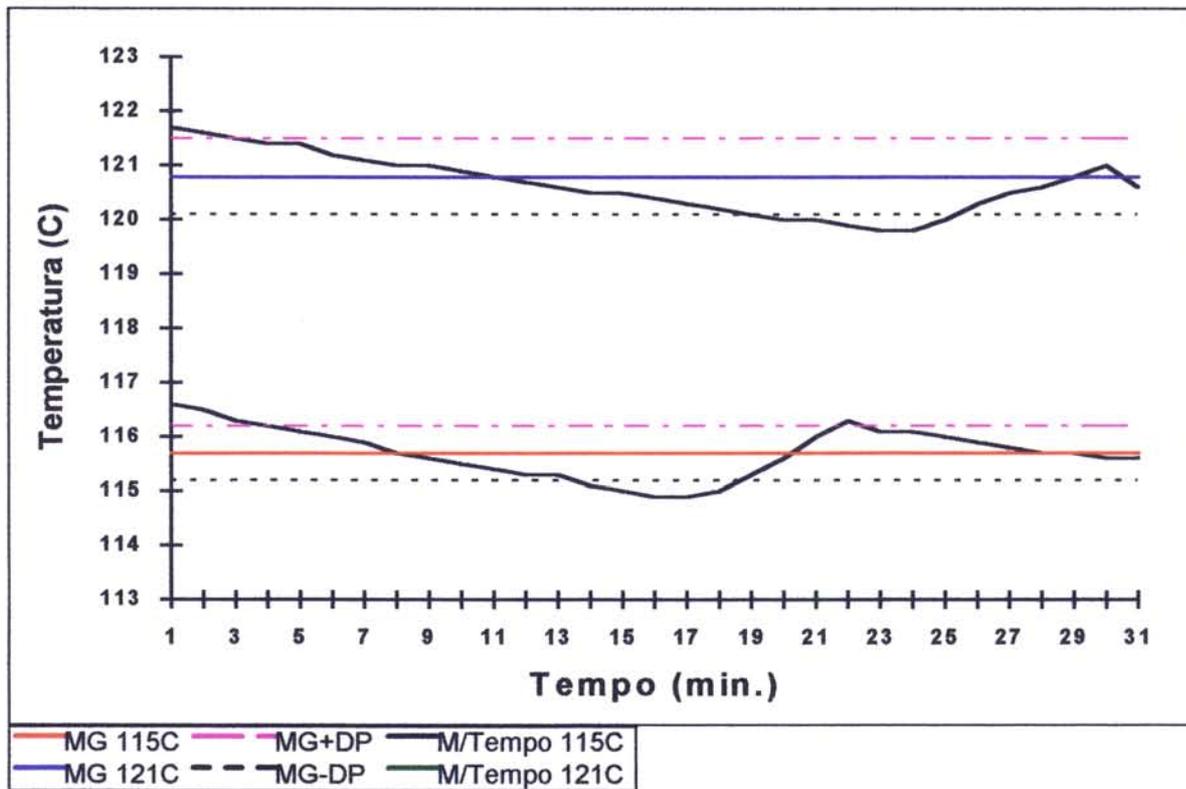


Figura 17 - Estabilidade da temperatura na autoclave usando 7 blocos de bandejas no processamento de bolsas esterilizáveis (posições : frente/direita, centro e fundo). Temperaturas de ajuste: 115 e 121°C.

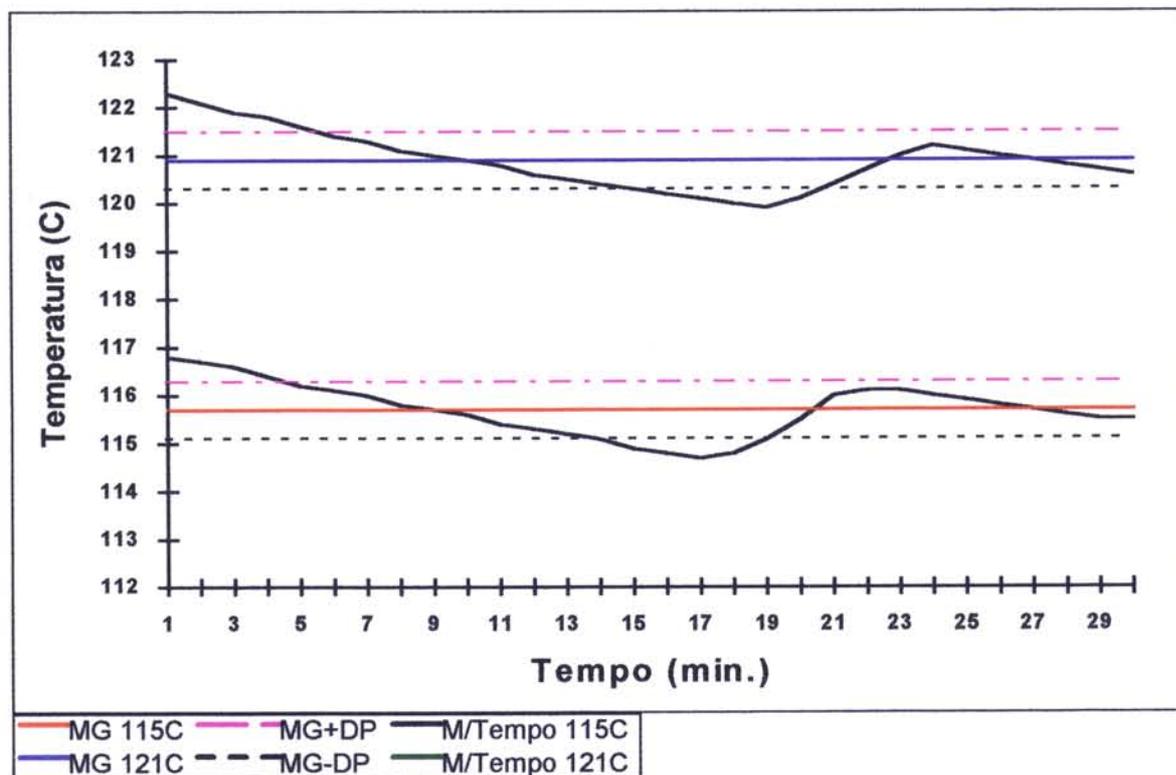


Figura 18 - Estabilidade da temperatura na autoclave usando 7 blocos de bandejas no processamento de bolsas esterilizáveis (posições : frente/direita, frente/meio e centro). Temperaturas de ajuste: 115 e 121°C.

Observou-se que a oscilação de temperatura durante o período de manutenção do processo (fase de **esterilização III**) foi pequena, apresentando uma variação média de 0,5°C, para as temperaturas de ajuste de 115 e 121°C, e um desvio padrão médio de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Com os resultados obtidos é possível utilizar espaçadores de 4,0 cm entre blocos de bandejas, neste tipo de autoclave (arranjo), para o aproveitamento da carga máxima de processo e não comprometer a estabilidade nem a uniformidade da temperatura dentro da autoclave. Sendo assim, pode-se dizer que as modificações introduzidas pelos blocos de confinamento não alteraram o padrão de aquecimento da autoclave, e o equipamento foi de acordo com as sugestões da NPFA (1985).

5.5. ENSAIOS DE PENETRAÇÃO DE CALOR NAS B.E.

Nas Tabelas 12 a 14 pode-se observar os resultados dos três ensaios de penetração de calor nos quais foram variados as pressões na fase de resfriamento I e na sua rampa de descida de pressão.

O ensaio II foi o que apresentou melhores resultados em termos de taxas de aquecimento e resfriamento mais baixas ($f_h=6,6$ min e $f_c=14,5$ min.). A taxa de resfriamento deve ser a menor possível para que se possa obter um resfriamento rápido das bolsas, garantindo assim, qualidade ao produto e integridade das embalagens na fase de resfriamento com sobrepressão.

CARDELLI (1992) encontrou um valor médio de f_h de 8,4min. e j_h de 1,22, para bolsas de 130 x 170mm de tamanho, contendo uma suspensão de 10% de bentonita, processadas em autoclave Dixie vertical por imersão em água com sobrepressão. Isto confirma o comportamento do purê de banana como alimento que se aquece por condução.

Para as taxas de resfriamento, CARDELLI (1992) encontrou um f_c médio de 12,3 min. e um j_c médio de 1,5 para bolsas com até 4,0 ml de ar residual. Estes resultados demonstram, mais uma vez, que as características do purê de banana e da bentonita 10% são bastantes semelhantes

Tabela 12 - Resultados obtidos do ensaio I de penetração de calor em bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.

BOLSA	LOCALIZAÇÃO NA BANDEJA	f_h (min.)	j_h	f_c (min.)	j_c
1	Centro	7,3	0,54	19,3	1,0
2	Frente/Meio	6,8	0,54	19,3	1,0
3	Fundo/Centro	7,0	0,53	20,2	1,1
	MÉDIA =	7,0	0,54	19,6	1,0

Tabela 13 - Resultados obtidos do ensaio II de penetração de calor em bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.

BOLSA	LOCALIZAÇÃO NA BANDEJA	fh (min.)	jh	fc (min.)	jc
1	Centro	5,8	0,56	14,9	1,5
2	Frente/Direita	6,2	0,56	12,6	2,2
3	Frente/Meio	7,0	0,50	14,1	1,8
4	Fundo/Lado	6,9	0,65	15,3	1,4
5	Fundo/Centro	7,2	0,58	15,5	1,8
	MÉDIA =	6,6	0,57	14,5	1,7

Tabela 14 - Resultados obtidos do ensaio III de penetração de calor em bolsas esterilizáveis contendo purê de banana.

BOLSA	LOCALIZAÇÃO NA BANDEJA	fh (min.)	jh	fc (min.)	jc
1	Fundo/Lado	7,8	0,31	18,8	1,1
2	Centro	5,8	0,26	17,2	1,1
3	Lado esquerdo	6,4	0,34	18,0	1,1
4	Fundo	7,2	0,47	18,0	1,4
5	Frente/Direita	7,4	0,28	18,0	1,1
	MÉDIA =	6,9	0,33	18,0	1,2

Ficou demonstrado que a bolsa de aquecimento mais lento estava localizada no fundo do cesto, no bloco de topo.

5.6. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DO *Clostridium butyricum* 18851 EM PURÊ DE BANANA pH 4,6

5.6.1. Crescimento do *Cl. butyricum* no purê de banana

O *Cl. butyricum* cresceu e se desenvolveu facilmente no purê de banana. Dos 10 tubos, contendo purê de banana inoculado, todos apresentaram alta produção de gás em menos de 48 horas. Nos tubos controle, que continham purê estéril sem inoculação,

não ficou evidenciado nenhuma presença de gás nem qualquer outro tipo de alteração no produto até o 15º dia de incubação a 30°C.

5.6.2. Produção de esporos

Dos métodos empregados para a produção de esporos de *Cl. butyricum*, o que apresentou maior sucesso foi o das transferências sucessivas, com uma visualização final em microscópio ótico de 80% de esporos/campo, após uma série de centrifugações aplicadas, conforme metodologia descrita no item 4.6.1.2.

Nos outros métodos citados na literatura, em que foram utilizados os meios de dextrose-triptona-agar e o de Keener, à base de mel, não foi evidenciado nenhuma formação de esporos depois do período de incubação.

5.6.3. Contagem da suspensão de esporos

O método de plaqueamento em dextrose-triptona-agar não se mostrou ideal na recuperação da suspensão de esporos de *Cl. butyricum*, entretanto, o emprego da técnica do Número Mais Provável (NMP), usando série de três tubos com meio fluido tioglicolato, mostrou-se perfeitamente adequado ao crescimento deste microrganismo. Sendo assim, através do NMP foi estabelecido que a suspensão de esporos tinha uma população de $4,6 \times 10^9$ NMP de esporos/ml, após uma incubação de 7 dias, onde os tubos positivos apresentaram turvamento do meio e produção de gás em menos de 48 horas. O tempo de estabilização de crescimento para contagem foi de 48 horas.

5.6.4. Resistência térmica do *Cl. butyricum* 18851

O resultado do atraso térmico ("lag"), necessário para o purê de banana atingir a temperatura de ajuste nos tubos Pyrex 13 x 100, foi de 3,4min.. As Tabelas 15 a 17 mostram os valores de D do *Cl. butyricum* 18851, obtidos a partir do purê de banana inoculado, que foram submetidos às temperaturas de 92, 95 e 98°C. Foram determinados também os valores de D médios para cada temperatura.

Tabela 15 - Valores de D a 92C do *Cl. butyricum* em purê de banana, pH 4,6

Tempo(min.)	Pop. inicial (No)	Pop. final (Nf) (tubo 1)	Pop. final (Nf) (tubo2)	Valor de D ₉₂ (min.)
3	nd	nd	nd	nd
6	2,15 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁵	2,15 x 10 ⁵	6,0
8	2,15 x 10 ⁶	4,65 x 10 ⁴	4,65 x 10 ⁴	4,8
10	2,15 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁴	5,0

nd = não determinado

D médio = 5,26 min.

Tabela 16 - Valores de D a 95C do *Cl. butyricum* em purê de banana, pH 4,6.

Tempo(min.)	Pop. inicial (No)	Pop. final (Nf) (tubo 1)	Pop. final (Nf) (tubo2)	Valor de D ₉₅ (min.)
2	2,15 x 10 ⁶	4,65 x 10 ⁵	4,65 x 10 ⁵	2,98
4	2,15 x 10 ⁶	1,15 x 10 ⁵	1,15 x 10 ⁵	3,15
6	2,15 x 10 ⁶	3,75 x 10 ⁴	3,75 x 10 ⁴	3,4
7	2,15 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁴	3,5

D médio= 3,25 min.

Tabela 17 - Valores de D a 98°C do *Cl. butyricum* em purê de banana, pH 4,6.

Tempo(min.)	Pop. inicial (No)	Pop. final (Nf) (tubo 1)	Pop. final (Nf) (tubo2)	Valor de D ₉₈ (min.)
2	2,15 x 10 ⁶	4,65 x 10 ⁴	4,65 x 10 ⁴	1,2
4	2,15 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁴	2,0
6	2,15 x 10 ⁶	1,15 x 10 ⁴	1,15 x 10 ⁴	2,6
7	2,15 x 10 ⁶	1,15 x 10 ⁴	1,15 x 10 ⁴	3,1

D médio = 2,2 min.

A Tabela 18 apresenta os valores de D médio, com suas respectivas temperaturas, usados no cálculo do valor de z que, através de uma regressão linear, foi determinado em 15,8°C, com um coeficiente de correlação de 0,9963 (Fig. 22).

Apesar de parecer um valor elevado, este trabalho confirma a tendência encontrada por LEITÃO *et. al.* (1977) onde o valor de z para *Bacillus stearothermophilus* em purê de banana natural (pH 4,7) também foi alto (17°C) quando comparado com valores encontrados em outros tipos de alimentos, entretanto, não foram indicadas as razões destes resultados.

Tabela 18 - Valores médios de D usados no cálculo de z do *Cl. butyricum* 18851 em purê de banana natural.

Temperatura (°C)	D médio (min.)	Log D
92	5,26	0,72098
95	3,25	0,51188
98	2,2	0,34242
115	0,183*	-0,7375

* Valor de D estimado pela formula : $\text{Log } D_2 - \text{Log } D_1 = 1/z (T_1 - T_2)$

Ainda na Tabela 18, foi estimado, a partir da "curva fantasma" TDT por extrapolação, o valor de D do *Cl. butyricum* 18851 de 0,183 min. para a temperatura de ajuste de 115°C, temperatura estabelecida para o processamento térmico do purê de banana em bolsas esterilizáveis.

As Figuras 19, 20 e 21 mostram as curvas de sobreviventes do *Cl. butyricum* 18851, para cada tempo aplicado nas temperaturas 92, 95 e 98°C. Nestes gráficos também foram plotados os valores de D médio para cada temperatura.

A Tabela 19 mostra que a determinação da resistência térmica das diferentes linhagens de *Clostridium butyricum* produziram diferentes valores de D, para as mesmas faixas de temperatura. Apesar dos valores estimados não terem sido determinados na prática, foram calculados por regressão da temperatura vs. log D. Notou-se que os alimentos utilizados na determinação da resistência térmica influenciaram estes resultados. Comparando as três determinações, o purê de banana promoveu aos esporos do *Cl. butyricum* 18851 menor resistência que a determinada por MORTON *et. al.* (1990), para *Cl. butyricum* 87-409, e maior resistência comparada com *Cl. butyricum* K-53 determinada por TOYODA (1990).

Tabela 19- Comparação dos valores de D do *Cl. butyricum* em purê de banana com valores da literatura.

TEMPERATURA (° C)	DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE "D" (min.)		
	<i>Cl. butyricum</i> K-53 em pH 7,0 Tampão fosfato a	<i>Cl. butyricum</i> 87-409 em pH 4,4 Suco de tomate b	<i>Cl. butyricum</i> 18851 em pH 4,6 Purê de banana
95	1,62*	6,87*	3,25
98	1,03*	3,1	2,2
100	0,91	1,8	1,6
110	0,12	0,13*	0,38

* Valores calculados por regressão da temperatura vs. log D.

a - TOYODA (1990)

b- MORTON (1990)

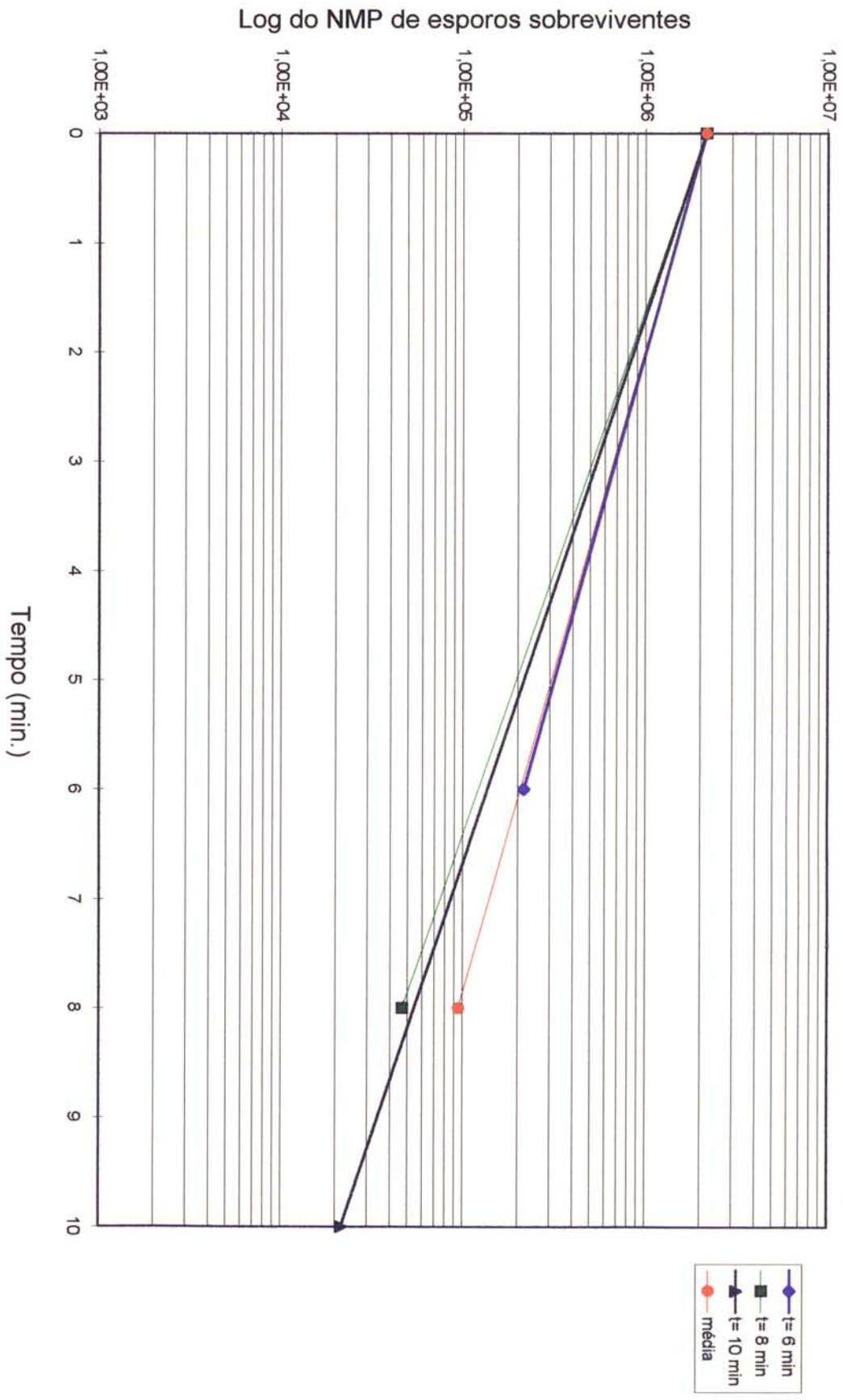


Figura 19 - Resistência térmica do *Clostridium butyricum* 18851 à 92 C em purê de banana natural, pH = 4,6.

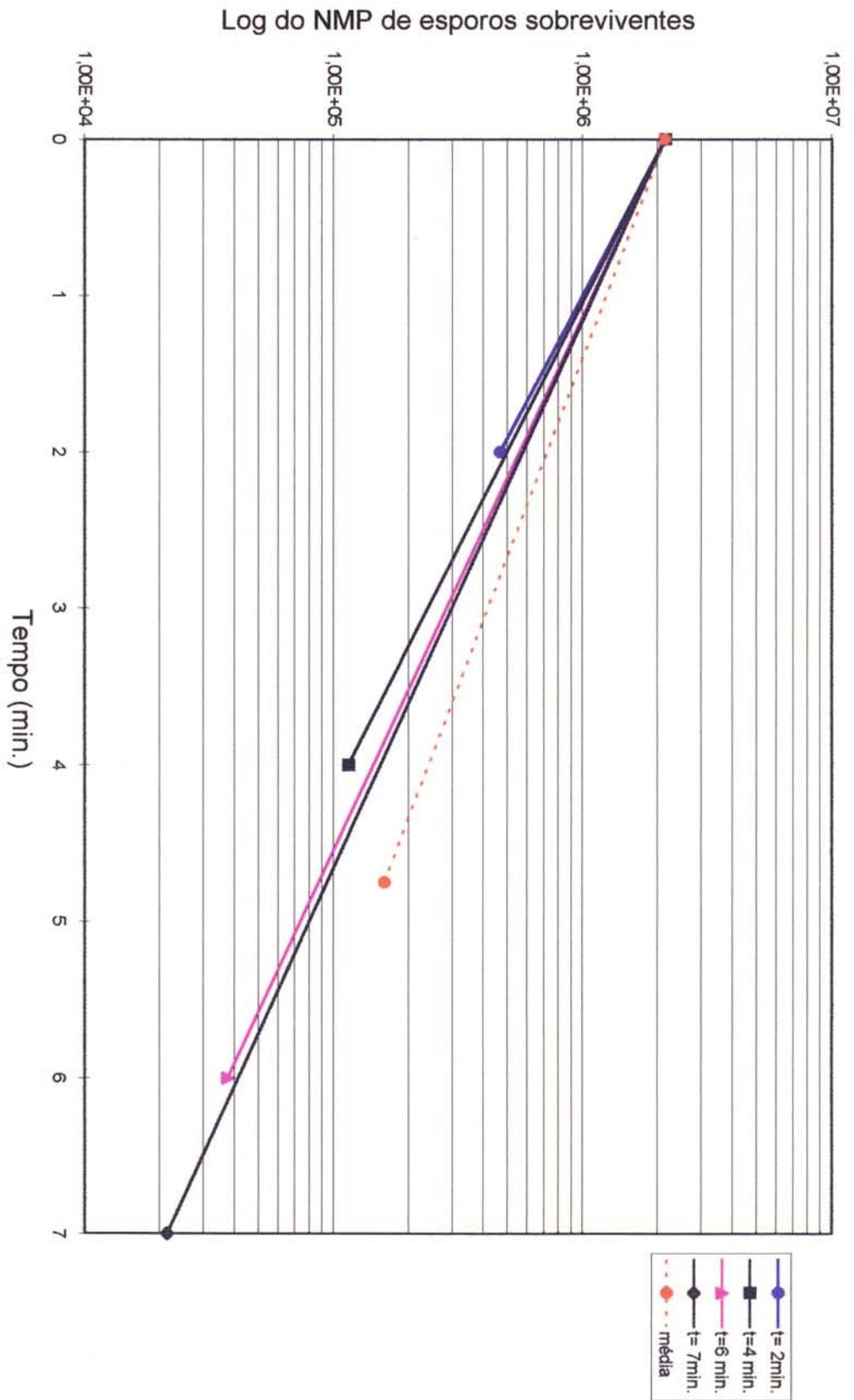


Figura 20 - Resistência térmica do *Clostridium butyricum* à 95 C em purê de banana natural, pH = 4,6.

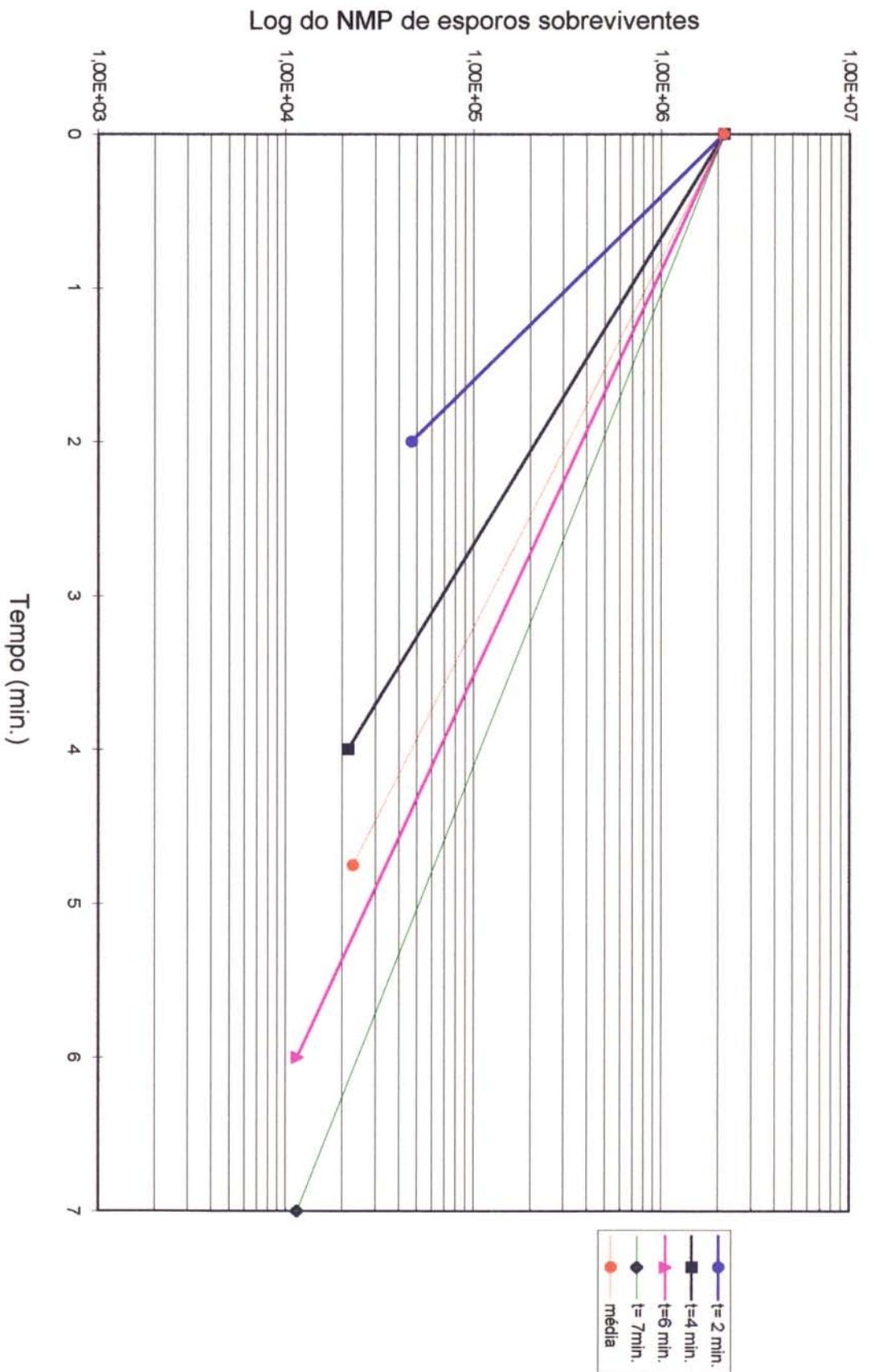


Figura 21 - Resistência térmica do *Clostridium butyricum* 18851 à 98 C em purê de banana natural, pH = 4,6.

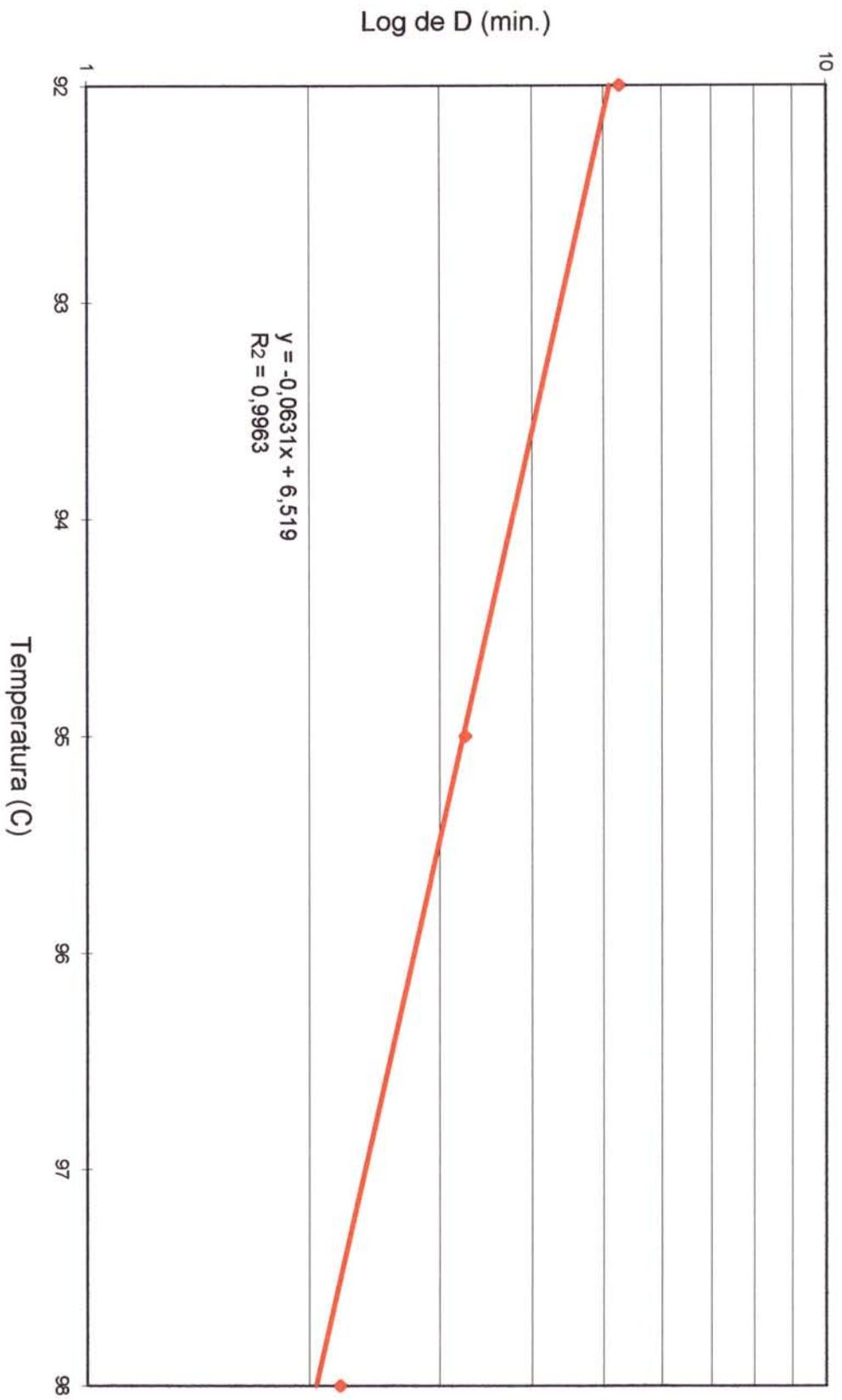


Figura 22 - Gráfico do valor de z do *Clostridium butyricum* em purê de banana, pH 4,6

5.6.5. Comparação da resistência térmica do *Clostridium butyricum* com a do *Clostridium botulinum* para o purê de banana com pH de 4,6

O objetivo desta análise foi comparar a resistência térmica do *Cl. botulinum*, estimada para um produto com pH de 4,6 e processado a 115°C (239°F), com a resistência térmica do *Cl. butyricum* determinada nesta pesquisa.

XEZONES e HUTCHINGS (1965) determinaram os valores de D do *Cl. botulinum* (62A), em três produtos, relacionando-os com o pH do produto e a temperatura estabelecida para o processamento térmico, assumindo um valor determinado de $z = 17,1^{\circ}\text{F}$ ($9,5^{\circ}\text{C}$). PFLUG (1985) transformou estes resultados em 2 equações para o cálculo de F e D para produtos com pH na faixa de 4,6 a 6,0.

Para a determinação dos valores de F e D do *Cl. botulinum* no purê de banana foi, então, escolhido a equação referida no item 4.6.1. (eq. 3) que foi baseada na composição do purê de banana apresentar-se bastante semelhante àqueles produtos analisados por XEZONES e HUTCHINGS (1965), como mostra a Tabela 20.

Tabela 20 - Comparação da composição do purê de banana com o molho de tomate com queijo usado no trabalho de XEZONES e HUTCHINGS (1965) para o cálculo dos valores de D do *Clostridium botulinum* tipo A.

Produto	COMPOSIÇÃO APROXIMADA (g)					MINERAIS (mg)				
	sólidos totais	proteína	gordura	cinza	carboidratos	fibra	Ca	P	Fe	NaCl (g)
Purê de banana	23,43	1,31	0,9	0,61	20,4	-	0,3	8,2	0,2	1,6
Molho de tomate com queijo	21,6	2,1	2,2	1,8	15,5	0,3	16	28	0,6	1,4

Com a aplicação da equação anteriormente mencionada, o valor de D encontrado para o *Cl. botulinum*, na temperatura estabelecida para o processamento do purê de banana de 115°C (239°F) e pH do produto de 4,6, foi de 0,236 min.

Observou-se que, apesar dos valores de $D_{115^{\circ}\text{C}}$ encontrados para *Cl. butyricum* e do *Cl. botulinum* serem bastantes semelhantes (0,183min. e 0,236min., respectivamente), o *Cl. botulinum* apresentou uma resistência térmica ligeiramente maior que a do *Cl. butyricum*. Sendo assim, resolveu-se utilizar o *Cl. botulinum* como alvo do processo.

Tabela 21 - Comparação dos valores de F_0 obtidos pelo aquisitor de dados DORIC 245 A com os calculados pelo método de PATASHNIK (1953).

PROCESSO	F_0 CALCULADO* PELO DORIC 245-A à 121,1°C (min.)	VALOR DE F (min.) CALCULADO PELO MÉTODO DE PATASHNIK à 121,1°C
I	0,647	0,664
II	0,645	0,660
III	nd	nd
IV	0,641	0,656
V	0,65	0,653
VI	0,649	0,666

* Valor obtido a partir da bolsa de aquecimento mais lento.
nd = não determinado

Como mostram os resultados da Tabela 21 os valores de F_0 determinado pelo aquisitor de dados DORIC 245-A apresentam-se ligeiramente menor que o calculado pelo método de PATASHNIK (1953), pois este aparelho só calcula a letalidade integrada a partir de 100°C, enquanto a outra forma de cálculo trabalha com dados a partir de 90°C, e também pela diferença de uso do z : DORIC determina os valores com $z = 10^{\circ}\text{C}$ e o método de PATASHNIK com um $z = 9,5^{\circ}\text{C}$.

5.7.MEDIÇÃO DOS MICROFUROS

Através do Banco Metalográfico, foi possível medir e fotografar os microfuros feitos na área de selagem com os fios de níquel-cromo, e ficou constatado que estes fios ficaram totalmente aderido à camada interna da bolsas (polipropileno), Figura 23. Esta foto foi tirada com fio ainda preso à estrutura da bolsa, utilizando-se uma escala de 250 vezes de ampliação.

A Figura 24 mostra o microfuro obtido com retirada do fio da Figura 23. Através da escala ocular, foram determinados os diâmetros dos microfuros sem os fios, e foi observado um ligeiro aumento de tamanho, em média 15%, com relação ao diâmetro do fio, como mostra a Tabela 22, no entanto, a forma do furo no corte transversal é uniforme.

Tabela 22 - Comparação dos diâmetros dos fios usados na formação do microfuro com o diâmetro dos furos medidos pelo banco metalográfico.

Diâmetro do fio usado na formação do microfuro (μm)	Média do diâmetro do furo medido pelo microscópio (μm)*	Diferença (%)
97	108,8	12,1
79	90,4	14,4
48	55,6	15,8
32	37,5	17,1

* média de 4 amostras por diâmetro de fio

Na Figura 25 foi possível registrar as camadas dos filmes que constitui a estrutura da bolsas esterilizável utilizada nesta pesquisa. Nota-se, com bastante perfeição a disposição das camadas e as respectivas espessuras.

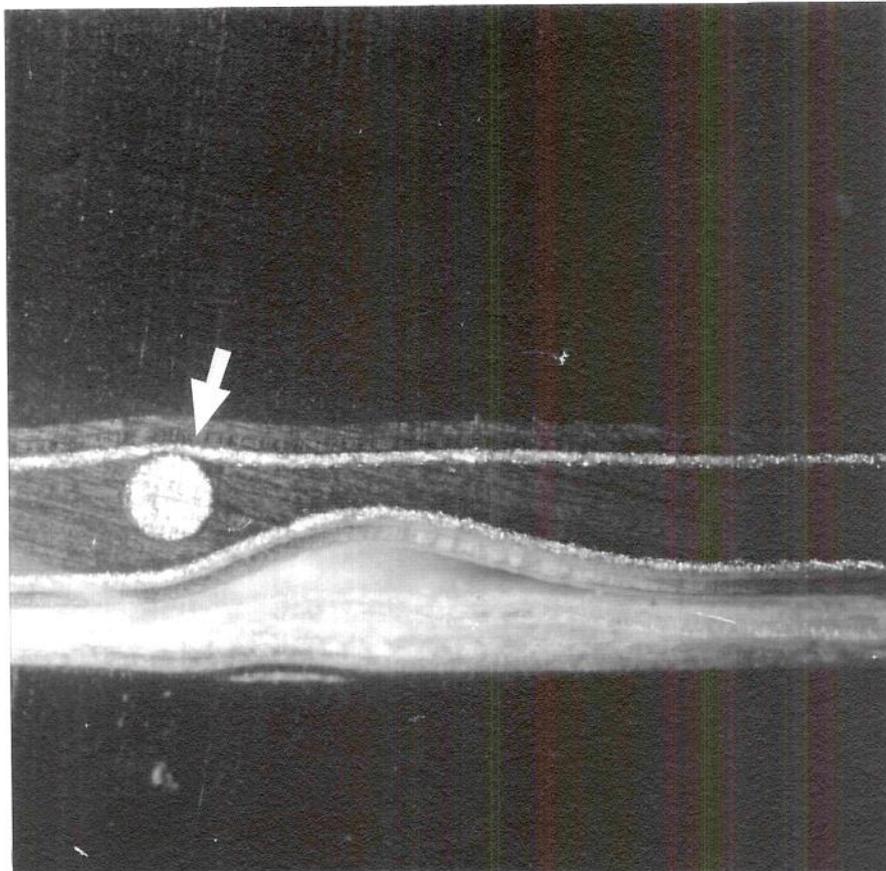


Figura 23 - Foto ampliada do microfuro formado com o fio de níquel-cromo de 97µm de diâmetro, ainda preso na área de selagem.

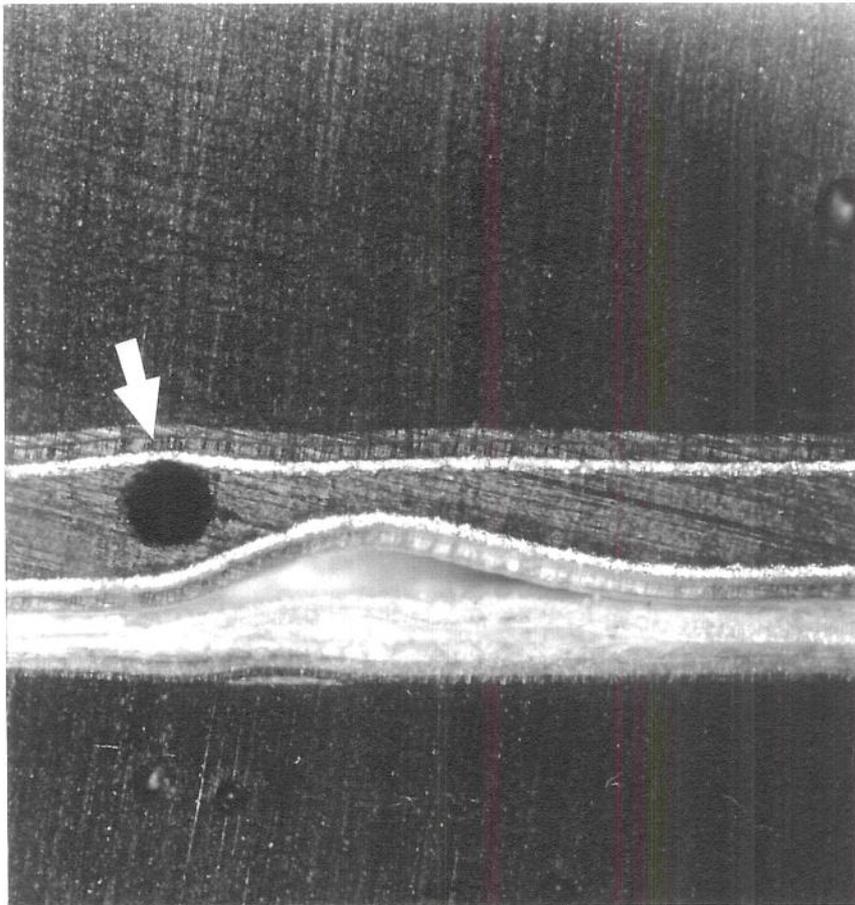


Figura 24 - Foto ampliada do microfuro obtido com a retirada do fio de níquel-cromo de 97 μ m de diâmetro da área de selagem.

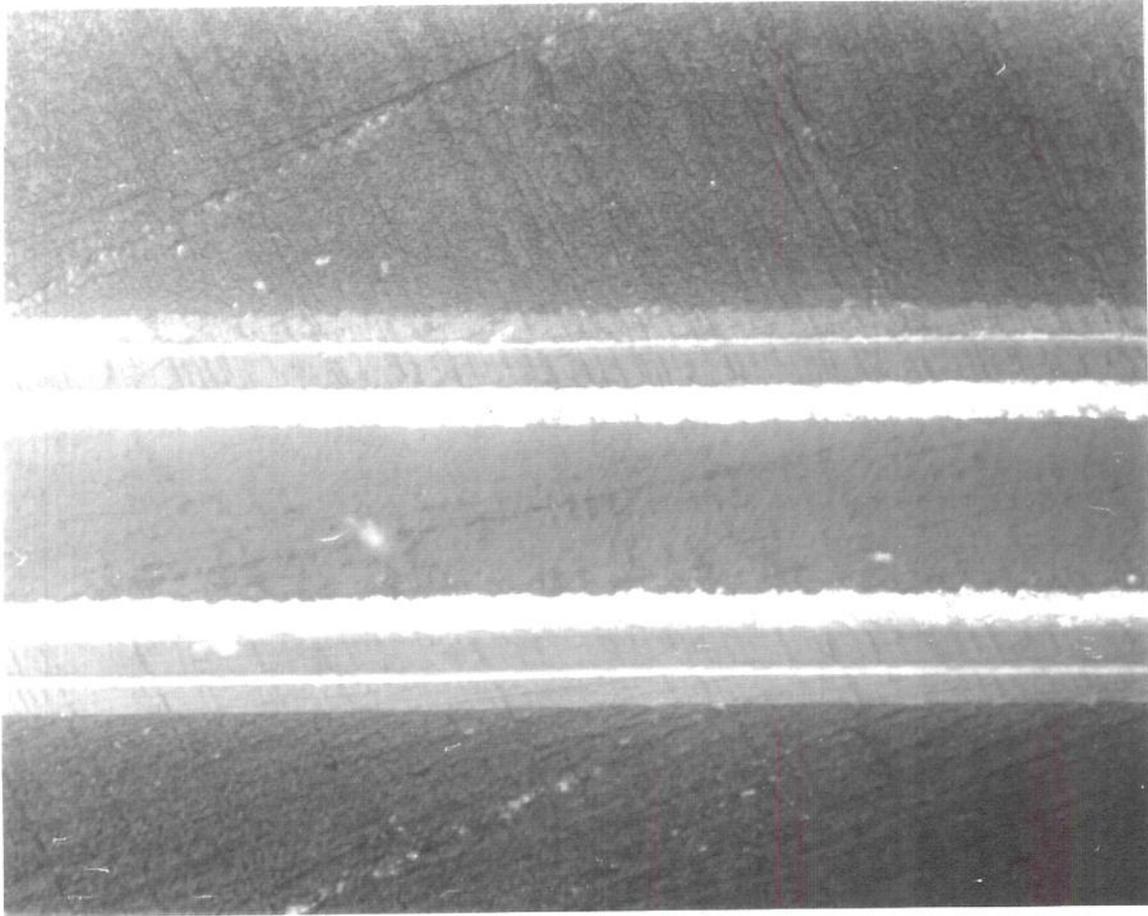


Figura 25 - Foto ampliada da secção transversal da área de selagem das bolsas esterilizáveis, onde se visualizam as camadas que constitui a estrutura da laminado.

5.8. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO *Bacillus subtilis* NO PURÊ DE BANANA (pH 4,6).

Como prova da adaptação deste método na avaliação da integridade de bolsas esterilizáveis, contendo purê de banana (pH 4,6), através do uso de esporos de *B. subtilis*, todos os tubos contendo purê de banana estéril que foram previamente inoculados com a suspensão de esporos desta bactéria apresentaram crescimento. Foram observadas as seguintes alterações no purê de banana: formação de uma película e escurecimento na superfície do produto. Os 5 tubos não inoculados, contendo purê de banana estéril, não apresentaram quaisquer alterações. As provas bioquímicas confirmaram a presença do *B. subtilis* nas amostras positivas: Voges-Proskauer (+); Reação de nitrato (+); Hidrólise de amido (+); Ácido a partir da xilose (-); Catalase (+); Reação de Gram (+).

5.9. ENSAIOS DE PENETRAÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* EM MICROFUROS DE BOLSAS ESTERILIZÁVEIS ANTES DE SEREM TERMOPROCESSADAS

O poder de penetração dos esporos de *Bacillus subtilis* em microfuros formados na selagem de topo de bolsas esterilizáveis, foi constatado em furos feitos com fios de até 79 μ m de diâmetro. Os furos formados com fios de 48 μ m de diâmetro apresentaram resultados negativos. Em bolsas controle (sem microfuros) não foi detectada a presença da referida bactéria.

A partir dos resultados da Tabela 23 ficou evidenciado que qualquer tipo de falha na fabricação destas embalagens pode comprometer a sua integridade.

Tabela 23 - Resultados do poder de penetração dos esporos de *B. subtilis* em bolsas antes de serem processadas.

Diâmetro do Microfuro (μ m)	Bolsas contaminadas / Bolsas ensaiadas	% de penetração
97	8/8	100
79	7/8	87,5
48	0/7	0
Bolsa controle (s / furo)	0/8	0

5.10. ENSAIO DE PENETRAÇÃO DE ESPOROS DE *B. subtilis* EM BOLSAS ESTERILIZÁVEIS TERMOPROCESSADAS

Os Quadros de 5 a 9 mostram os resultados do bioteste, utilizando esporos de *B. subtilis*, obtidos em 5 processos. Nota-se que este teste de avaliação da integridade asséptica de embalagens foi capaz de detectar microfuros formados a partir de fios com 48µm de diâmetro em todas 5 repetições.

Cabe resaltar que, as bolsas foram submetidas ao bioteste, mas com os fios mantidos durante o ensaio, não apresentaram resultados positivos de penetração da referida bactéria. Isto comprova a perfeita aderência dos fios à estrutura do laminado que compõem as bolsas. As bolsas controle (sem fios) também foram negativas para a penetração.

Na tentativa de detecção, pelo esporo teste, de microfuros menores que os formados pelos fios com 48µm de diâmetro, foi introduzido, a partir do ensaio III o fio com 32µm de diâmetro, entretanto, os resultados se mostraram também negativos à penetração dos esporos de *Bacillus subtilis*.

Quadro 5 - Ensaio I usando esporos de *B.subtilis* no bioteste de bolsas, realizado após o processo térmico. Resultados após 48 horas de incubação (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas).

MICROFURO FORMADO COM:	PROCESSO I						TOTAL
	Bs - 1	Bs- 2	Bs - 3	Bs - 4	Bs - 5	Bs -6	
Fio 97µm	+	+	+	+	+	+	6/6
Fio 79µm	+	-	+	+	+	+	5/6
Fio 48µm	+	-	-	+	+	+	4/6
Fio 32µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bolsa sem furo	-	-	-	-	-	-	0/6
BFM de 97µm	-	-	-	-	-	-	0/6
BFM de 79µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BFM de 48µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BFM de 32µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = não determinado; Bs = bolsa; BFM = bolsa testada com o fio mantido

Quadro 6 - Ensaio II usando esporos de *B.subtilis* no bioteste de bolsas, realizado após o processo térmico. Resultados após 48 horas de incubação (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas).

MICROFURO	PROCESSO II						
FORMADO COM:	Bs - 1	Bs - 2	Bs - 3	Bs - 4	Bs - 5	Bs - 6	TOTAL
Fio 97µm	+	+	+	+	+	+	6/6
Fio 79µm	+	+	+	+	+	+	6/6
Fio 48µm	-	-	-	+	+	+	3/6
Fio 32µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bolsa sem furo	-	-	-	-	-	-	0/6
BFM de 97µm	-	-	-	-	-	-	0/6
BFM de 79µm	-	-	-	-	-	-	0/6
BFM de 48µm	-	-	-	-	-	-	0/6
BFM de 32µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = não determinado; Bs = bolsa; BFM = bolsa testada com o fio mantido

Quadro 7 - Ensaio III usando esporos de *B.subtilis* no bioteste de bolsas, realizado após o processo térmico. Resultados após 48 horas de incubação (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas).

MICROFURO	PROCESSO III						
FORMADO COM:	Bs - 1	Bs - 2	Bs - 3	Bs - 4	Bs - 5	Bs - 6	TOTAL
Fio 97µm	+	+	-	+	+	+	5/6
Fio 79µm	-	-	+	+	+	+	4/6
Fio 48µm	+	+	-	-	+	+	4/6
Fio 32µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Bolsa sem furo	-	-	-	-	nd	nd	0/4
BFM de 97µm	-	-	-	-	nd	nd	0/4
BFM de 79µm	-	-	-	-	nd	nd	0/4
BFM de 48µm	-	-	-	-	nd	nd	0/4
BFM de 32µm	-	-	-	-	-	-	0/6

nd = não determinado; Bs = bolsa; BFM = bolsa testada com o fio mantido

Quadro 8 - Ensaio IV usando esporos de *B.subtilis* no bioteste de bolsas, realizado após o processo térmico. Resultados após 48 horas de incubação (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas).

MICROFURO	PROCESSO IV						
FORMADO COM:	Bs - 1	Bs - 2	Bs - 3	Bs - 4	Bs - 5	Bs - 6	TOTAL
Fio 97µm	+	+	+	nd	nd	nd	3/3
Fio 79µm	+	+	+	-	nd	nd	3/4
Fio 48µm	+	-	-	-	nd	nd	1/4
Fio 32µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Bolsa sem furo	-	-	-	nd	nd	nd	0/3
BFM de 97µm	-	-	-	nd	nd	nd	0/3
BFM de 79µm	-	-	-	nd	nd	nd	0/3
BFM de 48µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BFM de 32µm	-	-	-	nd	nd	nd	0/3

nd = não determinado; Bs = bolsa; BFM = bolsa testada com o fio mantido

Quadro 9 - Ensaio V usando esporos de *B.subtilis* no bioteste de bolsas, realizado após o processo térmico. Resultados após 48 horas de incubação (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas).

MICROFURO	PROCESSO V						TOTAL
	Bs - 1	Bs - 2	Bs - 3	Bs - 4	Bs - 5	Bs -6	
FORMADO COM:							
Fio 97µm	+	+	+	nd	nd	nd	3/3
Fio 79µm	+	+	+	+	nd	nd	4/4
Fio 48µm	-	-	+	+	nd	nd	2/4
Fio 32µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Bolsa sem furo	-	-	-	nd	nd	nd	0/3
BFM de 97µm	-	-	-	nd	nd	nd	0/3
BFM de 79µm	-	-	-	nd	nd	nd	0/3
BFM de 48µm	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BFM de 32µm	-	-	-	nd	nd	nd	0/3

nd = não determinado; Bs = bolsa; BFM = bolsa testada com o fio mantido

Para avaliar a possibilidade de contaminação das bolsas com a água de resfriamento utilizada na autoclave, foram processadas bolsas com microfuros abertos, ou seja, os fios foram retirados das bolsas antes das mesmas serem submetidas ao processamento térmico. Os resultados contidos na Quadro 10 mostram que não houve contaminação durante o processo. Como prova destes resultados, foi feita a análise microbiológica da água, coletada do tanque de trabalho da autoclave durante um processamento, ficando assim constatada a ausência de qualquer microrganismo neste meio.

Quadro 10 - Ensaio VI usado para avaliar a contaminação das bolsas pela água de resfriamento da autoclave (total de bolsas contaminadas / bolsas testadas) / contagem 48 horas.

MICROFURO	PROCESSO VI						TOTAL
	Bs - 1	Bs - 2	Bs - 3	Bs - 4	Bs - 5	Bs -6	
FORMADO COM:							
Fio de 97µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Fio de 79µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Fio de 48µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Fio de 32µm	-	-	-	-	-	-	0/6
Bolsa controle (s/ furo)	-	-	-	-	-	-	0/6

Bs = bolsa

Quadro 11 - Resumos dos ensaios de penetração do *Bacillus subtilis* em bolsas depois de serem termoprocessadas.

MICROFUROS FORMADOS NAS BOLSAS COM:	BOLSAS CONTAMINADAS COM <i>B. subtilis</i> / TOTAL DE BOLSAS TESTADAS						PERCENTAGEM DE
	P I	P II	P III	P IV	P V	TOTAL	PENETRAÇÃO
Fio 97 μ m	6/6	6/6	5/6	3/3	3/3	23/24	95,8
Fio 79 μ m	5/6	6/6	4/6	3/4	4/4	22/26	84,6
Fio 48 μ m	4/6	3/6	4/6	1/4	2/4	14/26	53,8
Fio 32 μ m	nd	nd	0/6	0/6	0/6	0/18	0
Bolsa sem furo	0/6	0/6	0/4	0/3	0/3	0/22	0
BFM de 97 μ m	0/6	0/6	0/4	0/3	0/3	0/22	0
BFM de 79 μ m	nd	0/6	0/4	0/3	0/3	0/16	0
BFM de 48 μ m	nd	0/6	0/4	nd	nd	0/10	0
BFM de 32 μ m	nd	nd	0/6	0/3	0/3	0/12	0

P = processo; nd = não determinado; BFM = bolsa testada com o fio mantido

Pelos resultados apresentados no Quadro 11, ficou evidente que o bioteste foi capaz de detectar microfuros formados com fios de até 48 μ m de diâmetro com 53,8% de penetração. Estes resultados também confirmam o trabalho de WIRTANEN *et. al.* (1993), onde a sensibilidade do bioteste, quando se utilizou esporos bacterianos no lugar de células viáveis, foi melhor na detecção de microfuros com diâmetros menores que 100 μ m.

5.11 CONFIRMAÇÃO DO *Bacillus subtilis*

As provas bioquímicas estabelecidas nos itens 4.9.1. e 4.9.2., para confirmação do *B. subtilis* isolados a partir das colônias típicas das bolsas com penetração positiva antes e depois de serem processadas termicamente, deram os seguintes resultados: Voges-Proskauer (+); Reação de nitrato (+); Hidrólise de amido (+); Ácido a partir da xilose (-); Catalase (+); Reação de Gram (+).

5.12 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO BIOTESTE COM O TESTE ELETROLÍTICO

A utilização do teste eletrolítico para a confirmação do microfuros, intencionalmente formados na área de selagem de topo das B.E., foi de grande

importância na avaliação da pesquisa, pois foi possível checar os limites de detecção deste método em comparação com o bioteste que utilizou esporos de *B.subtilis*.

Os resultados da Quadro 12 mostram que este teste só conseguiu detectar microfuros formados com fios de até 79µm de diâmetro, com 69,23% de positividade para as amostras testadas. Isto demonstra que o teste eletrolítico foi menos eficiente que o bioteste em detectar os microfuros.

Quadro 12 - Resultados do teste eletrolítico aplicado às bolsas esterilizáveis depois de serem termoprocessadas.

MICROFURUS FORMADOS NAS BOLSAS COM:	BOLSAS POSITIVAS / TOTAL DE BOLSAS TESTADAS						PERCENTAGEM DE POSITIVIDADE
	PI	PII	PIII	PIV	PV	PVI	
Fio de 97µm diâmetro.	6/6	6/6	4/6	3/3	3/3	22/24	91,66
Fio de 79µm diâmetro.	5/6	6/6	4/6	2/4	1/4	18/26	69,23
Fio de 48µm diâmetro.	0/6	0/6	0/6	0/4	0/4	0/26	0
Fio de 32µm diâmetro.	nd	nd	0/6	0/6	0/6	0/18	0
Bolsa sem furo	0/6	0/6	0/4	0/3	0/3	0/22	0

nd = não determinado ; P = processo

5.13. HISTÓRIA TÉRMICA E LETALIDADE DO PROCESSO TÉRMICO APLICADO NAS BOLSAS ESTERILIZÁVEIS

As Figuras 26 e 27 são exemplos de gráficos de história térmica e taxa letal, respectivamente, obtidos a partir dos dados de temperatura do processamento térmico das bolsas esterilizáveis no ensaio II, à uma temperatura de ajuste de 115°C com sobrepressão de 158 Kpa.

O gráfico da história térmica mostra de maneira bem clara o aquecimento característico de um produto condutivo, como o purê de banana, e o gráfico de taxa letal foi obtido da bolsa que apresentou um aquecimento mais lento durante o processamento do ensaio II.

5.14 RESULTADOS DO ENSAIO DE ESTERILIDADE COMERCIAL

Após o período de incubação por 15 dias/37°C, nenhuma alteração foi notada nas bolsas processadas com o purê de banana, tais como: estufamento, vazamento, odor estranho ou alteração no pH. Isto indica que o tratamento térmico aplicado no produto foi satisfatório sob o ponto de vista da estabilidade microbiológica.

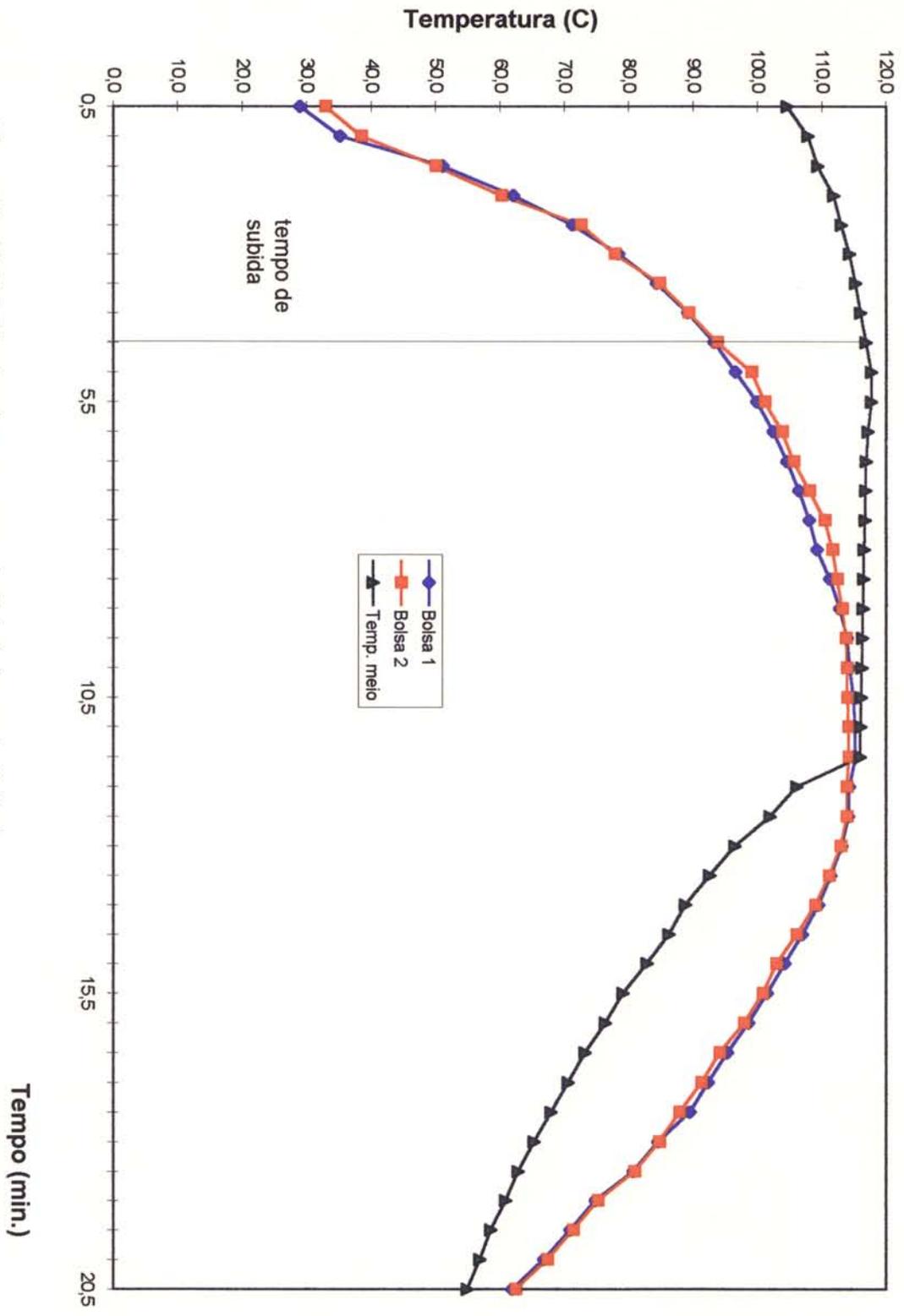


Figura 26 - História térmica do processamento II de bolsas esterilizáveis contendo purê de banana em autoclave Allpax.

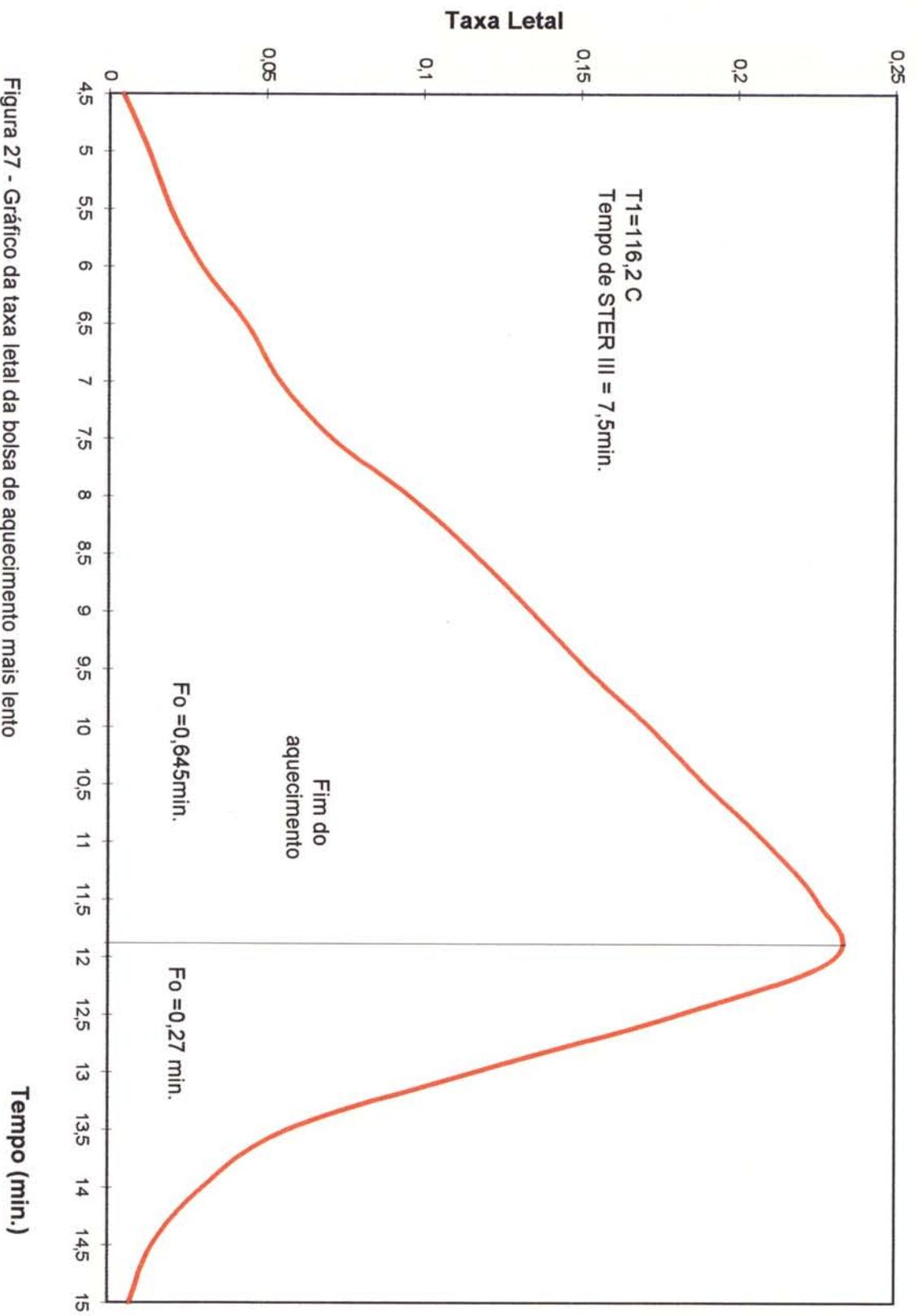


Figura 27 - Gráfico da taxa letal da bolsa de aquecimento mais lento do processo II para purê de banana em autoclave Allpax.

6. CONCLUSÕES

Para os resultados obtidos do processamento de bolsas esterilizáveis com purê de banana e da aplicação do bioteste com esporos de *Bacillus subtilis* na avaliação da integridade asséptica destas embalagens, pode-se concluir que:

- A adaptação do sistema de confinamento das bolsas no cesto da autoclave ALLPAX, com espaçadores de 4,0 cm, para o processamento das bolsas esterilizáveis foi comprovadamente eficiente, conforme resultados dos ensaios de distribuição de temperatura no equipamento e as taxas de penetração de calor mostrando-se eficientes.
- A performance das embalagens utilizadas foi considerada excelente, e a termossoldagem de topo, aplicada para o fechamento das bolsas, ficou dentro das faixas recomendadas pelas instituições especializadas. A seladora utilizada mostrou-se adequada na execução da termossoldagem, apesar do pouco recurso de variação nos controles de tempo e vácuo, e da ausência de controle da temperatura.
- A aplicação de um F_0 de 0,64min. na esterilização do purê de banana natural em bolsas esterilizáveis, foi o suficiente para garantir um produto microbiologicamente estável, comprovado pelas análises microbiológicas pós-processo e pelo ensaio de esterilidade comercial, além de apresentar um produto visualmente atraente.
- O *Clostridium butyricum* mostrou uma elevada resistência relativa quando aquecido em purê de banana (pH 4,6) na faixa de temperatura testada (92 - 95 e 98°C).
- O processamento das bolsas esterilizáveis a 115°C e com sobrepressão de 158 Kpa em autoclave de imersão total, agravou os defeitos intensionalmente provocados nas embalagens, pois o bioteste conseguiu detectar microfuros ainda menores em bolsas pós-processo.
- Os furos formados pelos fios de níquel-cromo sofreram um aumento no diâmetro na faixa de 12 a 17%, quando comparados aos diâmetros dos fios especificados pelo fabricante.
- O bioteste foi capaz de detectar microfuros formados com fios de até 48 µm de diâmetro, enquanto o teste eletrolítico apenas confirmou furos com 79 µm diâmetro.

Isto comprova a maior sensibilidade do esboro teste na avaliação de defeitos menores que 100 μm diâmetro.

- A aplicação do bioteste nestas condições não foi possível detectar microfuros formados com fios de 32 μm de diâmetro.

- Como sugestões para estudos complementares, pode-se pensar em reduzir o tempo de incubação das embalagens testadas pelo bioteste, já que o *Bacillus subtilis* tem grande facilidade e rapidez de crescimento no produto. Este ensaio poderia ser aplicado em outros tipos de embalagens, onde se utiliza a termossoldagem para o fechamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHVENAINEN, R.; MATTILA-SANDHOLM, T.; AXELSON, L. and WIRTANEN, G.. The effect of microhole size and foodstuff on the microbial integrity of aseptic plastic cups. Packaging Technology and Science. v. 5, p. 101-107, 1992.
- ANEMA, P.J. & SCHRAM, B.L. Prevention of post-process contamination of semi-rigid and flexible containers. J. Food Protect. v.43, n.6, p.461-464, 1980.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard methods of conditioning plastics and electrical insulating materials for testing. ASTM D618-61. Philadelphia: ASTM, 1977, p.207-210.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for seal strength of flexible barrier. ASTM F88-85. Philadelphia: ASTM, 1990. p. 857-859.
- AXELSON, L; CALVIN, S. and NORDSTROM, J.. Aseptic integrity and microhole determination of packages by electrolytic conductance measurement. Packaging Technology and Science, v.3, p. 141-162, 1990.
- BERRY, M.R. and KOHNHORST, A. L. Critical factors for thermal processing of institutional pouches. J. Food Prot. 46(6): 487. 1983.
- BEVERLY, R. G; STRASSER, J. and WRIGHT, B. Critical factors in fill and sterilizing of institutional pouches. Food Technology Setembro, 1980.
- CANTU LOZANO, D.; GASPARETTO, C.A.; MORAES, I. Q. Reologia de suspensões biológicas: uma técnica de laboratório. IV Mostra de Trabalhos Científicos. UNICAMP, Campinas, 1994, p. 184-187.
- CARDELLI, C. F. Estudo da esterilização numa autoclave vertical modificada para o termoprocessamento de bolsas flexíveis. Campinas: UNICAMP, 1992. 281p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.
- CHIQUITA BRANDS, Inc. Banana Puree. Processed Fruit Ingredients Division. 1994
- CLAUS, D. and BERKELEY, R.C.W. Genus *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol.2 Williams & Wilkins, 1986.
- DE MARTIN, Z.; TRAVAGLINI, D.A.; OKADA, M.; QUAST, D.G. e HASHIZUMET, T.. Processamento: produtos, caracterização e utilização. Série Frutas Tropicais nº3-Banana. ITAL, Campinas, 1990.

DIFCO MANUAL. Laboratory Media. 9th ed. Difco Lab. Inc., Detroit, Mich., USA, 1953.

FDA- Food and Drug Administration, Low Acid Canned Foods, State Training Branch FDA Course Manual, U.S. Dep. of Health and Human Services, 1981.

GILCHRIST, J. E.; RHEA, V.S.; DICKERSON, R.W. and CAMPBELL, J.E. Helium leak test for micron-sized holes in canned foods. Journal of Food Protection vol.48, nº10, 1985.

GILCHRIST, J. E.; SHAH, D.B.; RADLE, D.C. and DICKERSON, R.W.J. Leak detection in flexible retort pouches. Journal of Food Protection. vol.52, nº6, 1989.

GORDON, R. E; HAYNES, W.C. and PANG, C. H-N. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook nº 427, Washington, 1973.

GUEDES, L. B. R.; ARDITO, E.F.G.; PADULA, M.; GARCIA, E.E.C.; FERNANDES, M.H.C.; CABRAL, A.C.D.; SOLER, R.M.; ORTIZ, S.A. e MADI, L.F.C.. Aspectos técnicos sobre a conservação de alimentos acondicionados em embalagens flexíveis: Campinas, ITAL/SBCTA, 1984.

HEINTZ, D.A. Marketing opportunities for the retort pouche. Food Technology. 32-38, sept. 1980.

LABORATÓRIO DE TERMOBACTERIOLOGIA. Roteiro de aula prática Esporulação de *Bacillus* e *Clostridium*. 1994.

LAMPI, R.A. Flexible packages for thermoprocessed foods. Adv. in Food Res., 23: 305-428, 1977.

LEITÃO, F.F.M.; FALOMIR, C.A.O.; CIAMPI, C. e QUAST, D.G. Resistência térmica de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 e *Clostridium* PA 3679 em purê de banana natural. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos n.2, vol. 8 p.313-327, 1977.

LOPEZ, A. A complete Course in Canning. 11th Ed., The Canning Trade, Baltimore, USA, 1987.

MAGALHÃES, M.M.A. Estudo cinético da inativação térmica de enzimas termoresistentes, com ou sem adição de sacarose na polpa de mamão "Formosa" (*Carica papaya*, L.) acidificada e o estabelecimento do processamento térmico requerido. Campinas: UNICAMP, 1992. 156p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1992

- MASSAGUER, P. R.; CARDELLI, C.F.; AQUINO, P.R.; AGUILERA, H.G. Medida de temperaturas durante ensaios de penetração de calor em bolsas esterilizáveis para alimento. XIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos -SBCTA, São Paulo, 1992, p.112.
- MAUNDER, D.T.; FOLINAZZO, J.F. and KILLORAN, J.J. Bio-test method for determining integrity of flexible packages of shelf-stable foods. Food Technology, Chicago, v.22(5), p. 81-84, may. 1968.
- McGINNIS, D.S. Surface heat transfer distribution in a weir type pressurized water retort for processing of foods in flexible retort pouches. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 19: 45, 1986.
- METAPAK RP-F SPECIFICATION, December, 1973.
- MICHELS, M.J.M. & SCHRAM, B.L. Effect of handling procedures on the post-process contamination of retort pouches. J. Appl. Bacteriol. London, 47(1): 105-111, 1979.
- MORDVINOVA, S.A.; BELOUSOVA, M.V. e FLAUMENBAUM, B.L. Scientific grounds for the pasteurizing regimes applied in continuous pasteurization of tomato juice. Konservnaya-i-Ovoshchesushil'naya-Promyshlennost'; n.12 p.17 - 18, USSR, 1984.
- MORTON, V.N. ; SCOTT, D.T.; BERNARD, D.T. e WILEY, R.C. Effect of heat and pH on Toxicogenic *Clostridium butyricum*. Journal of Food Science. v.55 n.6, p.1725 - 1739, 1990.
- NPFA. Guidelines for thermal process development for foods packages in flexible containers. National Food Processors Association, Washington, 1985.
- OLIVEIRA, L.M. & ALVES, R.M.V. Influência do perfil da mandíbula de fechamento no desempenho da termossoldagem de embalagens flexíveis. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL. Campinas, n.2 vol.22, p.194-208, 1992.
- OLIVEIRA, L.M.; D'ERRICO, F.A.; MARTINS, M.I.P.; ORTIZ, S.A. e ANJOS, V.D.A. "Retortable pouch & retortable container". Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas/São Paulo. 24p. 1990.
- ORTIZ, S.A. Desempenho de embalagens flexíveis para alimentos termoprocessados, quando submetidas à simulação de manuseio e transporte São Paulo: EPVSP, 1986. 185p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Escola Politécnica da USP. 1986.

- PADULA, M.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.E.C.; OLIVEIRA, L.M. e ALVES, R.M.V. Embalagens plásticas: controle de qualidade. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas-São Paulo, 1989.
- PARK, D.J.; CABES, L.J. e COLLINS, K.M. Determining temperature distribution in retort, full-immersion, hot-water sterilizers. Food Technology p. 113 - 118, december, 1990.
- PATASHNIK, M. A simplified procedure for thermal process evaluation. Food Technology, v.7, p.1 - 6, 1953.
- PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A. e RAINOSEK, A.P. The Most Probable Number Technique. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods ed. 3, p.105 - 119, American Public Health Association, Washington, 1990.
- PETERSON, W.R. and ADAMS, J.P. Water velocity effect on heat penetration parameters during institutional size retort pouch processing. J. Food Science. 48: 457-459, 464, 1983.
- PFLUG, I. J. Microbiology and Engineering of Sterilization Processes. 7^oed. 1990.
- PFLUG, I.J.; ODLAUG, T.E. e CHRISTENSEN, R. Computing a minimum public health sterilizing value for food with pH values from 4.6 to 6.0. Journal of Food protection. v. 48, n. 10, p.848-850, october, 1985.
- PFLUG, I.J. Procedures for carrying out a heat penetration test and analysis of the resulting data. University of Minnesota, Department of Food Science and Nutrition, Minnesota, 1975.
- PORRETTA, S. Il controllo della qualità dei derivati del pomodoro. Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari in Parma. v.8, p. 204 - 213, 1992.
- PUT, H. M. C.; WITVOET, H. J. and WARNER, W.R. Mechanism of microbiology leaker spoilage of canned foods: biophysical aspects. Journal of Food Protection. vol.43, 1980.
- RAMASWAMY, H.; CAMPBELL, S. and PASSEY, C. Temperature distribution in a standard 1-basket water-cascade retort. Can. Inst. Sci. Technol. J. vol.24 n 1/2, 1991.
- REYNOLDS METALS COMPANY - FLEXIBLE PACKAGING DIVISION
TECHNOLOGY: Burst strength and seal separation of flex-can laminate.
R.T.M. 832, p. 1 a 4, 1979.

- SACHAROW, S. Food Packaging and Labeling. Food and Nutrition Press. vol.15 nº 1, 1991.
- SANTOS, A. V. Determinação da resistência ao óxido de etileno (em mistura com nitrogênio - 45% EO/55% N₂) de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (globigii) em fitas carregadoras de papel. Campinas: UNICAMP, 1994. 135p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 1994.
- SEGMILLER, J. L. & EVANCHO, G.M. Aciduric flat sour sporeformers. IN: VANDERZANT, C. e SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3^o ed. Washington: American Public Health Association, 1992, p. 291-297.
- SEKHAR, N. R; MAHADEVIAH, M. and GOWRAMMA, R. V. Studies on the suitability of retortable pouches for packing banana puree and ivy gourd. Indian Food Packer. v.45, n.5, 1991.
- SHAPPEE, J. e WERKOWSKI, S.J. Study of a non-destructive test for determining the volume of air in flexible food packages. Technical Report Army Natick Laboratories, Natick, M.A., 1972.
- SILVA, N. e JUNQUEIRA, V.C.A. Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Manual Técnico. nº 14. Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, Campinas, 229p. , 1995.
- STEFFE, J. F.; WILLIAMS, J.R.; CHHINNAN, M.S. and BLACK, J.R.. Energy requirements and costs of retort pouch vs. can packaging systems. Food Technology. September, 1980.
- STUMBO, C.R. Thermobacteriology in Food processing. 2nd ed. Academic Press, New York, N.Y., 1973.
- THE FRUIT DISPATCH COPANY . Banana Ripening Manual . Equipment Dept. Circular nº 14. New York, N.Y., 24p., 1956.
- TOYO SEIKAN KAISHA . Comunicação pessoal , 1995.
- TOYO SEIKAN KAISHA Ltda. Broaden the Horizons of Cooking. RP-F and hiRP-F Guide, Tokyo, Japan, 1994.
- TOYODA, S.; KOBAYASHI, Y. e AHIKO, K. Resistance of clostridia spores isolated from Gouda cheese. Japanese Journal of Zootecchnical. v.61, n.7, p. 599 - 605, Japan, 1990.

- TOWNSEND, C.T. Spore-forming anaerobes causing spoilage in acid canned foods. Food Research v. 4, n.3, p.231, 1939
- TSUTSUMI, Y. The growth of retortable pouch food packaging in Japan. The 36th Annual National Packaging Forum of the Packaging Institute, Chicago IL, October 7-9, 1974.
- TUNG, A.M.; BRITT, I.J. e RAMASWAMY, H.S. Food sterilization in steam/air retorts. Food Technology. p.105 - 109, december, 1990.
- VITALLI, A. A. Comportamento reológico do suco de laranja concentrado congelado a baixas temperaturas. Escola Politécnica de São Paulo, 1981. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo-USP.
- WEINTRAUB, S.E.; RAMASWAMY, H.S. e TUNG, M.A. Heating rates in flexible packages containing entrapped air during overpressure processing. Journal of Food Science. v.54, n.6, p.1417 - 1421, 1989.
- WIRTANEN, G.; HURME, E.; AHVENAINEN, R.; AXELSON, L. and MATTILA, T.S. Comparison of the immersion biotest and the spore-test method for evaluating the integrity of seals of flexible retort packages. Proceeding. Chiba, 1993.
- XEZONES, H. e HUTCHINGS, I.J. Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. Food Technology p.113 - 115, june, 1965.
- YAMAGUCHI, K. Retortable packaging. Food Packaging. Academic Press, Inc, 1990.
- YAMANO, Y. and KOMATSU, Y. Sterilization of foods in flexible packages part I. heat characteristics of a pilot retort for sterilization of flexible packages. Journal Food Sci. and Technology. Japan v.16, n.3, 1969.
- YOKOYA, F. e CRUVINEL, A.M. Fontes de contaminação microbiana na industrialização da banana: I - matéria-prima. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL. vol.3, p.17-28, 1969/70.