

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"USO DE UM SISTEMA INDICADOR BIOLÓGICO NA AVALIAÇÃO DO VALOR DE
ESTERILIZAÇÃO APLICADO A PURÊ DE CENOURA PROCESSADO EM RETORTA
ROTATIVA"

Autora: Lourdes Maria Araujo Quaresma de Camargo
(Bióloga)

Orientadora: Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

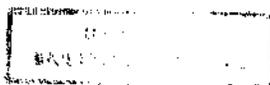
Paralisa

Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por Lourdes Maria Araujo Quaresma
de Camargo e aprovada pela Comissão Julgadora
em 10.05.95

Tese apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos
da UNICAMP para obtenção
do título de Mestre em
Engenharia de Alimentos (área
ciência de alimentos)

Pilar Rodriguez de Massaguer

Data: 10 de Maio de 1995



UNIVERSIDADE	700
DEPARTAMENTO	
CLASSIFICAÇÃO	C 14
NUMERO DE IDENTIFICACAO	24847
DATA DE AQUISICAO	4/3/95
VALOR	R\$ 11,00
DATA DE PAGAMENTO	09/06/95
ASSINATURA	

CM-00070593-2

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

C172u

Camargo, Lourdes Maria Araujo Quaresma de

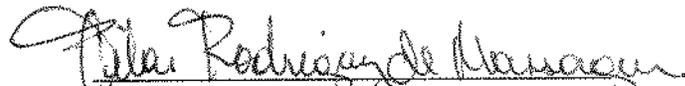
Uso de um sistema indicador biológico na avaliação do valor de esterilização aplicado a purê de cenoura processado em retorta rotativa / Lourdes Maria Araujo Quaresma de Camargo. -- Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador : Pilar Rodriguez de Massagner.

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

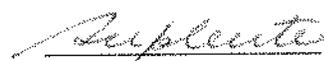
1. Esterilização. 2. Indicadores (Biologia). 3. *Processamento térmico. 4. Bacillus stearothermophilus. I. Rodriguez Massagner, Pilar. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA


Dra. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER
(ORIENTADORA)


Dr. JOSÉ SANTO GOLDONI
(MEMBRO)


Dr. ALFREDO DE ALMEIDA VITALI
(MEMBRO)


Dr. FUMYO YOKOYA
(MEMBRO)

Campinas, 10 Maio, 1995

Ofereço este trabalho ao Renato pelo amor e compreensão, e aos meus pais pelo carinho e apoio.

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos Victor, Mariana, Marta, Camila e Arthur, e também à Erika e Juliana como incentivo.

Agradecimentos

Agradeço à Deus a graça de me ter permitido concluir este trabalho.

Agradeço à Dra. Pilar pela orientação científica, pela perseverança de educadora, que fez de mim mais que um mestre, e especialmente pela amizade .

Agradeço à Seção de Operações Unitárias do ITAL, especialmente ao Dr. Alfredo Vitali, pela colaboração durante o trabalho, e por permitir que as latas fossem preenchidas e recravadas na seção, e agradeço também ao pessoal de apoio: Sras. Encarnação e Ivone, e Srs. Giovani e Sebastião.

Agradeço o Centro de Tecnologia da UNICAMP, ao Dr. Carlos Alfredo por me ter permitido usar a oficina durante todo o trabalho, e especialmente ao Prof. Nelson Bolzani pela colaboração e disponibilidade total durante este trabalho.

Agradeço à Sra. Rosa Tosello especialmente pelo carinho e amizade, e pela ajuda nas análises microbiológicas.

Agradeço aos meus colegas do laboratório : Flavio, Homero, Celso, Marcelo, Fernando e Luciane e Dna. Tereza, pela força (física e moral) que me deram durante o trabalho.

Agradeço especialmente à colaboração dos alunos Hector, André, Santiago, Alessandra, Alexandre e Fernando Souza.

Agradeço aos amigos da secretaria do Depto. de Ciências de Alimentos: Cícera, Jadete, Francéli, e especialmente Marco Antonio pela ajuda durante o período que estive no departamento.

Agradeço aos amigos da FEA que foram muito importantes para execução deste trabalho: Srs Waldecí, Gilson, Edinho, Paraíba, Aparecido, Toninho, Geraldo, José Carlos e às Sras. Telma Crsitiane, Cláudia e Cleusa.

Agradeço de forma especial ao meu amigo Sr. Raimundo, pela disponibilidade e pelo carinho.

Agradeço ao Dr. José Carvalho do IMEC-UNICAMP e pela orientação no planejamento e análise estatística dos experimentos , e especialmente à Carla e André pela incalculável ajuda.

Agradeço ao Sr. Alzino Vilela da Indaco S.A. pela execução dos IBs.

Agradeço ao Sr. José Maria da Metalúrgica Harmonia pela execução da mini-retorta.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	I
INDICE DE TABELAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMO	XII
SUMMARY	XIV
NOMENCLATURA.....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1- Validação biológica de processos de preservação de alimentos.....	6
2.2- Indicadores biológicos	11
2.2.1- Definições e termos.....	11
2.2.2- Microrganismos utilizados como organismos indicadores.....	13
2.2.3-Tipos de IBs.....	16
2.3- Uso de IBs na área farmacêutica e hospitalar	17
2.4- Uso de IBs na indústria de alimentos para processo de esterilização com calor.	19
2.5- Métodos de uso de esporos como IBs para monitoração de processos de esterilização	31
2.6-Calibração de IBs	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1-Fluxograma do trabalho prático	34

3.2-Microrganismo utilizado	35
3.3 - Alimento utilizado	35
3.3.1- Preparo do purê de cenoura diluído	35
3.3.2- Envase do purê	35
3.4 - Preparo da suspensão de esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	36
3.4.1- Quantificação da suspensão de esporos	38
3.4.2- Determinação da resistência térmica das suspensões de esporos em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015M, pH7,2) em banho de óleo	38
3.5 - Produção dos carregadores plásticos e preparo dos indicadores biológicos	39
3.5.1-Enchimento dos IBs	39
3.6 - Projeto e construção da mini-retorta.....	41
3.6.1 - Construção da mini-retorta	41
3.6.2 - Determinação do tempo de subida e sistema de desaeração da mini-retorta	44
3.6.3 - Estudo da distribuição de calor na mini-retorta.....	45
3.6.3.1 - Coleta e tratamento de dados de distribuição de calor.....	47
3. 7- Estudo da resistência térmica e calibração dos IBs em mini-retorta.....	48
3.7.1 - Determinação do fator de atraso térmico dos IBs.....	48
3.7.2 - Determinação da resistência térmica dos IBs em mini-retorta.....	48
3.7.3 - Ensaio de calibração dos IBs.....	49

3.8 - Estudo da carga termofílica do alimento teste	51
3.8.1 - Determinação da biocarga de termófilos totais e produtores de acidez plana em cenoura fresca e em purê de cenoura	51
3.8.1.1- Cálculo das contagens.....	51
3.8.2 - Seleção do isolado produtor de acidez plana termofílico mais termo-resistente	52
3.8.3 - Determinação da resistência térmica do isolado mais termo-resistente em purê de cenoura	53
3.9 - Estudo da retorta rotativa Rotopax.....	54
3.9.1 - Descrição do sistema e funcionamento da retorta rotativa Rotopax.....	54
3.9.2-Calibração dos termopares na retorta rotativa Rotopax.....	55
3.9.3-Ensaio de distribuição de calor na retorta rotativa Rotopax	58
3.9.3.1 - Coleta de dados de distribuição de calor na retorta Rotopax	60
3.10 - Ensaio de comparação de Fo-BIO e Fo-FIS	60
3.10.1 - Preparo das latas.....	60
3.10.2 - Estabelecimento do valor de esterilização requerido.....	61
3.10.3 - Aplicação dos processos térmicos.....	63
3.10.4 - Estudo dos parâmetros de penetração de calor do purê de cenoura diluído.....	66
3.10.5 - Determinação do valor de esterilização físico (Fo-FIS).....	67
3.10.6 - Determinação do valor de esterilização biológico (Fo-BIO).	67
3.10.6.1- Recuperação dos sobreviventes	67
3.10.6.2- Conversão dos valores F-BIO para Fo BIO	68

3.10.7- Ensaio de esterilidade comercial.....	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1-Preparo das suspensões de esporos de <i>B. stearothermophilus</i>	71
4.1.1-Quantificação da suspensões de esporos de <i>B. stearothermophilus</i>	71
4.1.2 - Determinação da resistência dos lotes de esporos de <i>B.stearothermophilus</i> em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015M, pH 7,2)	72
4.2 - Construção e estudo da distribuição de calor na mini-retorta	75
4.2.1 - Determinação do tempo de subida e método de desaeração da mini-retorta	77
4.2.2 - Estudo da distribuição de calor na mini-retorta.....	78
4.2.3 - Determinação do fator de atraso térmico dos IBs na mini-retorta	88
4.3 - Cinética de destruição térmica de suspensão de esporos de <i>B stearothermophilus</i> encapsulada em IBs, aquecida em mini-retorta ..	90
4.3.1-Determinação da resistência térmica dos IBs na míni retorta ...	90
4.3.2-Calibração dos IBs na mini retorta.....	93
4.4 - Estudo da biocarga de termófilos do produto	97
4.4.1 - Contagem de termófilos e produtores de acidez plana em cenoura fresca e purê de cenoura	97
4.4.2 - Seleção do produtor de acidez plana termofílico mais termo-resistente	98
4.4.3 - Resistência térmica do isolado produtor de acidez plana termofílico mais termo-resistente em purê de cenoura.....	99

4.5 - Estudo da retorta Rotopax.....	101
4.5.1 - Distribuição de calor na Rotopax.....	101
4.6- Comparação de Fo-BIO e Fo-FIS.....	109
4.6.1 - Estudo da penetração de calor em purê de cenoura.....	109
4.6.2 - Comparação dos valores Fo-FIS e Fo-BIO	113
4.6.3 - Ensaio de esterilidade comercial.....	117
5 CONCLUSÕES	118
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
APÊNDICES	130
Apêndice 1. Meios de cultura e soluções	131
Apêndice 2. Dados de penetração de calor.....	134
Apêndice 3. Valores de esterilização calculados pela subrotina SETU no programa ESPERA.....	138
Apêndice 4. Resultados integrais dos estudos de comparação entre valores Fo-BIO e Fo-FIS	146

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Disposição dos termopares na mini-retorta para estudo da distribuição de calor	45
Tabela 2 - Condições de tempo e temperatura de estudo para determinação do valor-D dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> nos IBs em mini retorta.	48
Tabela 3 - Condições dos estudos de calibração dos IBs.....	50
Tabela 4 - Tempos de exposição e temperaturas de estudo para determinação do isolado produtor de acidez plana mais termo-resistente.....	53
Tabela 5 - Localização dos termopares na prateleira da cesta da retorta Rotopax.	58
Tabela 6 - Condições de processo para estudo da distribuição de calor na retorta Rotopax.	60
Tabela 7 - Programação das condições de processo à 121,0 °C para aplicação de valor de esterilização (valor-F) = 15,0 min.	64
Tabela 8 - Programação das condições de processo à 121,0 °C para aplicação de valor de esterilização (valor-F) = 10,0 min.	64
Tabela 9- Programação das condições de processo à 115,0 °C para aplicação de valor de esterilização (valor-F) = 15,0 min.	65
Tabela 10 - Programação das condições de processo à 115,0 °C para aplicação de valor de esterilização (valor-F) = 10,0 min.....	65
Tabela 11 - Quantificação das suspensões de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> , Série I, II e III, em meio TSA.....	71
Tabela 12 - Contagem da suspensão de esporos Série II durante período de armazenamento sob refrigeração.....	72
Tabela 13 - Resistência térmica das suspensões de <i>B. stearothermophilus</i> Séries II e III em tampão de Butterfield (50X). Ensaio feito em banho de óleo à 121,0 °C ($\pm 0,5$).....	74
Tabela 14 - Determinação do método de desaeração da mini-retorta.....	78

Tabela 15 - Resumo da distribuição geral de calor na mini-retorta.....	88
Tabela 16 - Determinação do atraso térmico dos IBs em mini-retorta. IBs com e sem espaço livre.	89
Tabela 17- Resistência térmica de <i>B. stearothermophilus</i> (ATCC 7953) em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015M, pH 7,2) em carregadores plásticos. Ensaio realizado em mini-retorta à 121,0 °C ($\pm 0,2$)	90
Tabela 18 - Contagem total de termófilos em superfície de cenoura crua fresca	97
Tabela 19 - Contagem total de termófilos em purê de cenoura diluído	98
Tabela 20 - Resultado dos ensaios de seleção do <i>B. stearothermophilus</i> mais termo-resistente isolado de cenoura crua fresca.	99
Tabela 21 - Determinação do valor-D dos isolado No10 em purê de cenoura pH = 5,3. Tubo TDT. Banho de óleo.	100
Tabela 22 - Uniformidade de distribuição de temperatura dentro da cesta da retorta rotativa Rotopax, durante fase de esterilização III.	103
Tabela 23 - Resumo geral da distribuição de temperatura em retorta rotativa Rotopax.....	106
Tabela 24 - Resumo dos parâmetros de penetração de calor em purê de cenoura processado em latas 73,0 mm D.E. x 91,0 mm h, com 10% de espaço livre.	109
Tabela 25 - Resultados dos ensaios de comparação de Fo-FIS, Fo-BIOPF e Fo-BIOHW determinados nos processos à 121,0°C nas duas séries experimentais	114

Tabela 26 - Resultados dos ensaios de comparação de Fo-FIS, Fo-BIOPF e Fo-BIOHW determinados nos processos à 115,0°C nas duas séries experimentais	114
Tabela 27 - Porcentagem de diferença entre Fo-BIOPF e Fo-BIOHW determinados nos processos aplicados à 121,0 e 115,0 °C nas duas séries de tempos. Resultados médios de duas replicatas/ensaio.....	115
Tabela 28-Resultados dos ensaios de esterilidade comercial.....	117

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Validação biológica de um processo térmico através do uso de IB.	11
Figura 2 - Áreas de medida biológica em função do número de sobreviventes do processo por unidade.	32
Figura 3 - Montagem ilustrativa do indicador biológico acoplado à lata pela tampa.	40
Figura 4 - Esquema geral da mini-retorta acoplada à autoclave Dixie.	43
Figura 5 - Detalhe da disposição dos termopares flexíveis no interior da mini-retorta para estudo da distribuição de calor.	46
Figura 6 - Vista geral da retorta Rotopax (Allpax Prod. Inc.) Tanque de trabalho (dir), tanque de estocagem (esq. 2o plano) e painel de controle (esq. 1o plano)	56
Figura 7- Vista do tanque de trabalho da retorta Rotopax mostrando a cesta com prateleira para latas conforme utilizada para este trabalho.	57
Figura 8 - Ilustração da disposição das latas-suporte para os termopares na prateleira para o estudo da distribuição de calor na cesta da retorta Rotopax.	59
Figura 9 - Desenho do processo de preservação do purê de cenoura e a curva de calibração dos IBs mostrando o NF/IB correspondente.	63
Figura 10 - Curva de sobreviventes da suspensão de <i>B. stearothermophilus</i> série I em tampão fosfato de Butterfield (50X) em carregadores plásticos. Ensaio feito em mini-retorta à 121,0°C ($\pm 0,2$).	73

Figura 11 - Curva de sobreviventes da suspensão de <i>B. stearothermophilus</i> série II e III em tampão fosfato de Butterfield (50X) em carregadores plásticos. Suspensão série II valor- $D_{121} = 3,4$ min, suspensão série III valor- $D_{121} = 2,2$. Ensaio em banho de óleo termostaticado à $121,0^{\circ}\text{C} (\pm 0,5)$	75
Figura 12 - Vista geral da mini-retorta (dir) acoplada à autoclave Dixie utilizada como tanque pulmão.	76
Figura 13 - Detalhe da tampa da mini-retorta acoplada ao suporte metálico com IBs.	77
Figura 14 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão $115,1^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,1). IBs com espaço livre.	80
Figura 15 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão $121,0^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,2). IBs com espaço livre.	80
Figura 16 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão $123,0^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,2). IBs com espaço livre.	81
Figura 17 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão $115,2^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,1). IBs sem espaço livre.	81
Figura 18 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão $121,5^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,2). IBs sem espaço livre.	82
Figura 19 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão $123,4^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,2). IBs sem espaço livre.	82
Figura 20 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão $115,1^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,1). IBs com espaço livre.	84
Figura 21 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão $121,1^{\circ}\text{C}$ (DP = 0,2). IBs com espaço livre.	84

Figura 22 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 123,1 °C (DP = 0,2). IBs com espaço livre.	85
Figura 23 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 115,1 °C (DP = 0,1). IBs sem espaço livre.	85
Figura 24 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 121,2 °C (DP = 0,2). IBs sem espaço livre.	86
Figura 25 - Distribuição de calor na mini retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 123,1 °C (DP = 0,2). IBs sem espaço livre.	86
Figura 26 - Resistência térmica de <i>B. stearothermophilus</i> (ATCC 7953) nos IBs. Ensaio em mini-retorta à 115,1, 118,1, 121,0 e 123,2°C	91
Figura 27 - Curva "fantasma" de morte térmica de <i>B. stearothermophilus</i> em tampão fosfato de Butterfield (50X) em carregadores plásticos. Valor-z = 7,2 °C.	92
Figura 28 - Curva de calibração da suspensão de <i>B. stearothermophilus</i> Série II em tampão fosfato de Butterfield (50X) encapsulada em carregadores plásticos. Ensaio em mini-retorta à 121,0°C (±0,2).	95
Figura 29 - Curva de calibração da suspensão de <i>B. stearothermophilus</i> Série II em tampão fosfato de Butterfield (50X) encapsulada em carregadores plásticos. Ensaio em mini-retorta à 123,1°C (±0,2).	96
Figura 30- Curvas de morte térmica do isolado No 10 em purê de cenoura. Estudo feito à 118,0 e 121,0 °C.	101
Figura 31 - Estabilidade de temperatura da retorta rotativa Rotopax durante ensaio à 115,9 °C. As três linhas paralelas representam a temperatura média geral dentro da retorta (centro) e a média acrescida (superior) e subtraída de um desvio padrão (inferior). (DP = 0,2).	104
Figura 32 - Estabilidade de temperatura da retorta rotativa Rotopax durante ensaio à 121,2 °C. As três linhas paralelas representam a temperatura média geral dentro da retorta (centro) e a média acrescida (superior) e subtraída de um desvio padrão (inferior). (DP = 0,2)	104

Figura 33 - Estabilidade de temperatura da retorta rotativa Rotopax durante ensaio à 123,2 °C. As três linhas paralelas representam a temperatura média geral dentro da retorta (centro) e a média acrescida (superior) e subtraída de um desvio padrão (inferior).(DP = 0,2)	105
Figura 34 - Estudo da distribuição da temperatura por posição durante o período de esterilização III. Ensaio à 115,9 °C. (DP = 0,2).....	107
Figura 35- Estudo da distribuição da temperatura por posição durante o período de esterilização III. Ensaio à 121,2 °C.(DP = 0,2).....	108
Figura 36 - Estudo da distribuição da temperatura por posição durante o período de esterilização III. Ensaio à 123,2 °C. (DP = 0,2).....	108
Figura 37- Curva de aquecimento para purê de cenoura processado em latas 73,0 mm D.I. x 91,0 mm h, à 121,5 °C em retorta rotativa com 10% de espaço livre.	112
Figura 38 - Latas seccionadas ilustrando a montagem dos IBs (esq) e termopares de agulha (dir) pela tampa, conforme utilizado neste estudo	113

RESUMO

Com o objetivo de utilizar a técnica de indicadores biológicos para monitorar o processo de esterilização de alimentos enlatados processados em retorta rotativa, foi realizado este trabalho, com execução em 3 etapas: 1- preparo e calibração de indicadores biológicos (IBs) de esterilização para alimento enlatado termo-processado; 2- desenho do processo térmico de preservação de purê de cenoura diluído com água (50%, pH 5,3), considerando a carga e a resistência do microrganismo alvo isolado da matéria prima; e 3- avaliação da eficiência dos IBs na medida do valor de esterilização biológico (Fo-BIO) aplicado ao produto, através da comparação com valor de esterilização físico (Fo-FIS) determinado a partir de dados tempo-temperatura de latas equipadas com termopares.

Os IBs foram constituídos de bastões plásticos (Nylon 6,6, 70,0 mm h x 6,0 mm D.E.) inoculados em sua cavidade interna com 0,3 ml de suspensão de esporos de *B.stearothermophilus* (ATCC 7953). Uma mini-retorta (MR) foi projetada e construída para ser utilizada como resistômetro na avaliação da resistência térmica e calibração dos IBs. Os resultados do estudo da distribuição de calor na MR à 115,0, 121,0 e 123,0 ° C, indicaram adequação do equipamento para tal fim. Curvas de calibração dos IBs foram construídas a partir de ensaios realizados à 121,0 e 123,2 ° C. Ambas apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,95. Somente a curva à 121,0°C foi utilizada, e com esta curva, o número de sobreviventes por IB obtido em cada ensaio foi relacionado com o valor de esterilização (U min) à temperatura de calibração.

O estabelecimento do valor de esterilização requerido pelo purê de cenoura levou em consideração a carga de termófilos da matéria prima (~ 4,0 x 10E2/lata), a resistência do termófilo causador de acidez plana isolado do produto, e um processo rígido com dois níveis de probabilidade final de sobreviventes : probabilidade de unidade não estéril (PUNE) 10E-6, e PUNE = 10E-3. Foram então realizados ensaios à 115,0 e 121,0°C em duplicata para obter o valor-F requerido de 15,0 e 10,0 min.

Uma retorta rotativa de um cesto (Rotopax, Allpax Prod. Inc) foi utilizada para processamento do produto, e para tanto o padrão de distribuição de calor no interior da cesta da retorta foi determinado. No estudo da uniformidade e estabilidade de temperatura na retorta observou-se que a variação máxima obtida entre posições dentro da retorta foi de 0,5° C durante a fase de esterilização III. Estes resultados foram considerados satisfatórios, estando de acordo com os requerimentos publicados para retortas deste tipo. Uma vez

determinada a região de aquecimento mais lento (ponto frio) na cesta (região frontal próximo à porta), todos ensaios subsequentes foram realizados nesta área.

Os valores de esterilização obtidos pelos IBs após cada processo - valor F-BIO (à temperatura de calibração com base no valor-z do organismo no IB), foram corrigidos para valor de esterilização Fo-BIO através da conversão em três passos de PFLUG e CHRISTENSEN, (1980), e denominado valor **Fo-BIOPF**. Também foi feita outra conversão utilizando metodologia de HAYAKAWA, (1977) para cálculo de Fo-BIO, devido ao fato do produto estudado ter apresentado curva quebrada de aquecimento. Estes valores foram denominados valor **Fo-BIOHW**.

Na comparação dos valores de esterilização Fo-BIOPF, Fo-BIOHW, e Fo-FIS, observou-se que em geral os valores Fo-BIO foram 5,0 a 15,0 % menores que os valores Fo-FIS, quando os ensaios foram à 121,0 °C. Para os ensaios à 115,0 ° C, os valores Fo-BIOPF foram de 24,0 a 32,0 % maiores que Fo-FIS, enquanto que os valores Fo-BIOHW continuaram apresentando diferença consistente de 2,0 a 12,0 % abaixo de Fo-FIS. Esta diferença de comportamento pode ser devida às limitações impostas pela correção de PFLUG e CHRISTENSEN, (1980). Porém, as medidas biológicas apresentaram pouca variabilidade (C.V. % médio = 3,5), e a medida física teve uma variabilidade pouco maior (C.V. % médio = 5,0), tendo, portanto, sido considerado o método bastante reproduzível.

Os resultados deste estudo indicaram que em função da magnitude das diferenças entre os valores de esterilização determinados, IBs podem ser utilizados para monitorar a letalidade aplicada durante o processamento de alimentos enlatados em equipamentos agitados.

SUMMARY

Aiming to employ the biological indicator technique to monitor sterilization process delivered to canned food processed in agitating retort, this work was carried out in three phases: 1- preparation and calibration of sterilization biological indicator units (BIUs) for thermo-processed canned food; 2- design of preservation process for diluted (50% pH 5.3) carrot puree considering burden of target microorganism isolated from the raw material; and 3- evaluation of BIUs efficiency in measuring the biological sterilization values (F_o-BIO) delivered to the product by comparison with physical sterilization values (F_o-FIS) determined with time-temperature data from thermocouple equipped cans.

BIUs were made of plastic rods (Nylon 6.6; 70.0 mm h x 6.0 mm D.E.) inoculated in its inner cavity with 0.3 ml of spore suspension of *B. stearothermophilus* (ATCC 7953). A mini-retort was designed and built to be used as resistometer in the BIU thermal resistance and calibration studies. Results of heat distribution studies in the MR at 115.0, 121.0 and 123.0 °C indicated that the equipment is adequate for such purpose. Calibration curves were built at 121.0 and 123.0 °C, both presenting correlation coefficient above 0,95. Only the calibration curve at 121.0 °C was employed, and with this curve, the number of survivors per BIU obtained in each run was related to sterilization value (U min) at calibration temperature.

To establish the preservation process required by the product, it was taken into consideration: the thermophilic burden in the product (aprox. 4,0 x 10E2/can); the resistance of thermophilic flat sour isolated from the product; and a rigid thermal process with 2 levels of survivors, probability of non sterile unit = 10E-6 and 10E-3. Duplicate tests were carried out at 115.0 and 121.0 °C to obtain the required F-values of 15 and 10 min. W

An agitating retort Rotopax (Allpax Prod. Inc.) was used to process the product, therefore the heat distribution pattern in the basket was determined. With the results of heat uniformity and stability in the retort, it could be observed that maximum temperature variation among positions was 0.5 °C during sterilization III. These results were considered satisfactory, being in accordance to published performance requirements for this type of equipments. Once determined the slowest heating zone, (frontal area close to the door) the tests were carried out in this area.

Sterilization values obtained from BIUs after each process, F-BIO values (at calibration temperature based on z-value of the indicator organism in the BIU) were corrected to F_o-BIO (at reference temperature, based on z-value of *C. botulinum* = 10,0 °C), using the 3 step

correction of PFLUG and CHRISTENSEN (1980). This was named Fo-BIOPF. Another correction was made using methodology of HAYAKAWA (1977) to calculate Fo-BIO, due to fact that, the product studied presented broken heating curve. This was named Fo-BIOHW.

In the comparison of Fo-BIOPF , Fo-BIOHW and Fo-FIS, it was observed that in general Fo-BIO values were 5 to 15% lower that Fo-FIS for tests run at 121°C. For tests at 115°C, Fo-BIOPF values were 24 to 32% higher than Fo-FIS, while Fo-BIOHW were consistently 2 to 12% lower than Fo-FIS. This difference may be due to limitation imposed by the correction of PFLUG and CHRISTENSEN (1980). But, biological measures presented little variability as determined by the coefficient of variation (C.V.% = 3,5), and physical measures variated to a little higher level (C.V.% = 5,0), therefore, the method was considered reproducible.

The results of this study indicated that according to the magnitude of differences found among sterilization values biologically and physically determined, BIUs properly calibrated may be used to monitor/validate the lethality applied during the processing of canned food in agitating retorts.

NOMENCLATURA

- D Tempo de redução decimal. Tempo para reduzir em 90% a concentração inicial de microrganismos, nutrientes ou fatores de qualidade (min.)
- z Intervalo de temperatura necessário para que a Curva "Fantasma" de Morte térmica atravesse um ciclo logarítmico (°C).
- fh Tempo requerido para que a porção linear da curva de aquecimento atravesse um ciclo logarítmico. Índice de inclinação da curva de aquecimento (min.)
- fh1 Idem acima, quando há um ou mais pontos de quebra na curva de aquecimento este parâmetro representa o índice de inclinação da porção linear antes da 1ª quebra (min.)
- fh2 Idem acima, exceto que este parâmetro representa o índice de inclinação da porção linear após a 1ª quebra (min.)
- jh Fator de atraso térmico para o aquecimento. Coeficiente de intersecção (adimensional) da curva de aquecimento definido como:
$$jh = (T1 - Ta) / (T1 - To)$$
- fc Tempo requerido para que a porção linear da curva de esfriamento atravesse um ciclo logarítmico. Índice de inclinação da curva de esfriamento (min.)
- jc Fator de atraso térmico para o esfriamento. Coeficiente de intersecção (adimensional) da curva de esfriamento definido como: $jc = (Tw - Tba) / (Tw - Tg)$
- Fp Valor de esterilização alvo com base em valor-z = 10,0 °C estimado pela sub-rotina SETU do programa computadorizado para estimativa de processo térmico de alimentos enlatados com as fórmulas empíricas de curvas de aquecimento e esfriamento desenvolvidas por HAYAKAWA (1974)
- T1 Temperatura do meio de aquecimento
- To Temperatura inicial do produto, medida no ponto frio do recipiente
- Tw Temperatura de esfriamento
- Ta Temperatura pseudo-inicial de aquecimento obtida pela intersecção da reta extrapolada da curva de aquecimento com o eixo das ordenadas.

Tba	Temperatura pseudo-inicial de esfriamento obtida pela intersecção da reta extrapolada da curva de esfriamento com o eixo das ordenadas.
Tg	Temperatura do alimento no final do aquecimento
Gb1	Diferença de temperatura entre o alimento e o meio de aquecimento no 1o ponto de quebra da curva de aquecimento
Gb2	Diferença de temperatura entre o alimento e o meio de aquecimento no 2o ponto de quebra da curva de aquecimento
Tmg	Comprimento da fase de aquecimento
Tref	Temperatura de referência (121,1 °C)
Fo	Valor de esterilização. Tempo em minutos necessário para inativar determinado número de microrganismos à temperatura de referência constante (121,1 °C), com base em um valor-z = 10,0 °C
Fo-BIO	Valor de esterilização determinado por método biológico
Fo-FIS	Valor de esterilização determinado por método físico
E	Exponenciação
FT	valor de esterilização equivalente em minutos à temperatura T, com valor-z do microrganismo indicador
N _o	número inicial de microrganismos resistentes críticos por unidade
N _f	ponto final do processo de preservação, número de microrganismos sobreviventes por unidade, o qual é igual à probabilidade de uma unidade não estéril (PUNE).
V.P.	Voges-Proskauer
D.P.	Desvio padrão
C.V.	Coefficiente de variação
LAG	Fator de atraso térmico

RTD	"Resistance Temperature Device", monitor/controlador de temperatura que funciona à base de resistências
MIG	"Mercury in Glass Thermometer", instrumento oficial indicador de temperatura - termômetro de mercúrio de referência da autoclave
PUNE	Probabilidade de unidade não estéril
AN	Agar nutriente
DTA	Ágar dextrose triptona (Dextrose Tryptone Agar)
TSA	Ágar de soja tríptica (Tryptic Soy Agar)
TSB	Caldo de soja tríptica (Tryptic Soy Broth)
D.I.	Diâmetro interno
D.E.	Diâmetro externo
h	Altura/hora
l	Comprimento
b	Largura
vol	Volume
min	Minuto
s	Segundo
psig	Libras/polegada quadrada no manômetro . "Pounds per Square Inch in gauge", unidade de pressão no manômetro
RPM	Rotação por minuto. "Revolution per minute", unidade de rotação
dir	Direita
esq	Esquerda

Curva fantasma Curva semiologarítmica construída com os valores-D na ordenada e temperatura na abcissa, denominada "fantasma" por ser um espelho (paralela) da curva semilogarítmica de morte térmica construída com valores-F na ordenada e temperatura na abcissa.

Correspondência de nomenclatura válida somente para as saídas do programa ESPERA, no Apêndice 3:

c fc

cj jc

hj jh

1-INTRODUÇÃO

A partir da década de 60, com a construção e instalação dos primeiros equipamentos de esterilização rotativos, houve maior desenvolvimento das técnicas de esterilização permitindo melhoria na qualidade dos produtos e no emprego de processos térmicos mais cuidadosos. Neste tipo de equipamento, onde pode-se utilizar vapor ou água como meio de aquecimento, consegue-se obter aquecimentos e esfriamentos mais rápidos do que com as técnicas convencionais de esterilização com equipamentos estacionários. Além disso, a seleção da rotação ideal ajuda a aplicação do processo letal adequado e minimiza o sobreprocessamento do alimento em função dos ciclos com tempo mais reduzido. Portanto, os alimentos processados nestes equipamentos apresentam melhor qualidade sensorial (cor e sabor) e nutricional. (EISNER,1988; DIGNAN et alii,1989)

A preocupação com a qualidade da esterilização dos alimentos também se estendeu para o desenvolvimento de tecnologia na monitoração e validação biológica dos processos de esterilização. O uso de métodos microbiológicos para testar a eficiência de processos comerciais de esterilização (de produtos farmacêuticos inclusive) tem representado um desafio contínuo para cientistas de alimentos e microbiologistas ao longo dos anos.

De uma forma geral, o conceito de esterilização envolve a eliminação ou a minimização da carga de organismos indesejáveis de um ambiente em particular. Alimentos e drogas em recipientes, por exemplo, podem ser esterilizados submetendo-se os recipientes a um processo de esterilização com calor. Na esterilização com calor, a alta temperatura age por um período de tempo, resultando na morte dos contaminantes biológicos indesejados.

A medida da temperatura somente, não indica o poder letal do tratamento térmico sobre os microrganismos, é portanto necessário integrar o tempo e a temperatura de tratamento. Na indústria de alimentos enlatados, o ciclo de esterilização envolve o uso de vapor para aquecer recipientes adequadamente envasados e selados. Para que o processo de esterilização de um alimento acondicionado em um recipiente hermeticamente selado seja eficiente, ele deve funcionar adequadamente até na zona de aquecimento mais lento do recipiente. Desta forma, é importante que o processo de esterilização seja cuidadosamente controlado e monitorado principalmente neste ponto. (PFLUG,1976).

Uma abordagem largamente empregada na monitoração de processo de esterilização é uso de esporos bacterianos caracterizados e com resistência conhecida a agentes esterilizantes. O uso de tais estruturas celulares como monitores biológicos fundamenta-se no fato de que estas são capazes de responder à pequenas variações de condições ambientais. Quando um número pré-determinado de esporos é submetido por determinado tempo a um agente esterilizante, a morte dos esporos acontecerá de uma forma previsível. Dependendo da severidade do tratamento, após o ciclo de esterilização, uma certa porcentagem dos esporos utilizados como teste terá sido morta, e o remanescente ainda estará viva. Quando o número de sobreviventes é determinado, (através de uma série de técnicas convencionais) obtém-se uma medida razoável da severidade do processo aplicado ao produto. Este método de monitoração assume que a taxa de morte dos microrganismos contaminantes do produto, que estão dentro do recipiente, será aproximadamente a mesma que a dos organismos indicadores (esporos), utilizados no preparo do monitor. (PFLUG,1976, 1990; PFLUG e SMITH, 1977; GRAHAM,1986; SPICHER,1988)

Hoje em dia, diversos sistemas de monitoração biológica de processos de esterilização são conhecidos. Um grupo geral de tais sistemas, especialmente utilizado na área farmacêutica e hospitalar, emprega um número pré-determinado de microrganismos viáveis depositados em uma tira de papel de filtro. Estas tiras são colocadas junto com a carga do esterilizador, e terminado o ciclo é feita a incubação em meio de cultura adequado para pesquisa de sobreviventes. Neste método é feita somente a pesquisa de sobrevivência ou morte dos organismos utilizados como indicadores, onde ausência de crescimento indica eficiência do ciclo.

Na indústria de alimentos, os primeiros esforços de validação biológica foram os estudos de embalagens inoculadas (utilizadas até hoje) onde amostras do produto são inoculadas com altas concentrações de esporos termo-resistentes e incubadas, após o processamento, a fim de se relacionar a fração do produto deteriorado com o número de esporos sobreviventes ao processo. A partir dos primeiros trabalhos de YAWGER, (1978) a utilização desta técnica, juntamente com o método de redução de contagem, ampliou as informações fornecidas nestes ensaios, chegando à uma medida biológica da severidade do processo aplicado. Os resultados das contagens de sobreviventes e de testes de penetração de calor no produto, feitos no mesmo ensaio, permitiu fazer comparações entre o valor de esterilização biológico integrado (em todo o recipiente) com o valor de esterilização

físico (medido com instrumentos físicos de medição como termopares) . Muitos estudos desta natureza foram relatados desde os trabalhos de YAWGER, (1967 citado por YAWGER 1978), e HOUTZER e HILL (1977) até mais recentemente BERRY e BRADSHAW (1980, 1982, 1985 , 1986), (estes últimos trabalhando com retortas agitadas) onde todos autores fizeram comparações entre medidas biológicas e físicas dos valores de esterilização aplicados a diversos tipos de alimentos enlatados processados com calor.

Mais recentemente, indicadores biológicos (IBs) tem sido usados para validar biologicamente a esterilidade de alimentos enlatados e termo-processados em autoclaves agitadas, sistema hidrostático, e em sistemas assépticos de aquecimento, manutenção e esfriamento, onde o método físico de medida da temperatura torna-se difícil. Nestes últimos anos o desenvolvimento de IBs para estes tipos de processamentos (rotativos e assépticos) tem sido considerado de maior relevância porque à medida que se estuda um pouco mais os produtos particulados e estes processos , consegue-se distinguir que apesar dos modelos e métodos matemáticos conseguirem predizer com grande facilidade e chegar a estabelecer os processos requeridos, há necessidade de se fazer uma validação biológica do processo.

Alguns autores validando biologicamente processamentos assépticos, tem utilizado sistemas IBs que consistem em imobilizar um número conhecido de esporos de microrganismos termo-resistentes em partículas de alimentos ou em simulações de partículas (misturas de alimento com alginato), e após o tratamento térmico do produto, recupera-se as partículas com indicadores e faz-se a contagem dos sobreviventes . Nos estudos de DALLYN et alii (1977); HERSON e SHORE, (1981); BROWN et alii, (1984) e mais recentemente nos estudos de SEGNER et alii (1989); GAZE E BROWN, (1989); GAZE et alii, (1990) as comparações foram feitas entre os valores de esterilização determinados biologicamente e os valores de esterilização determinados pelos métodos matemáticos que consideram o tempo de residência das partículas.

Uma forma de determinar o efeito do processo térmico em microrganismos localizados na zona de aquecimento mais lento de recipientes hermeticamente selados foi descrito por PFLUG, (1976), conhecido como termopar biológico. O sistema consiste em encapsular suspensões com concentrações conhecidas de esporos termo-resistentes em um carregador posicionado nesta área, de modo que a informação fornecida monitora o ciclo de

esterilização no ponto mais crítico do processo térmico. Neste sistema, um grande número de carregadores é preparado ao mesmo tempo (inoculado com a suspensão de esporos do organismo indicador previamente preparada), e calibrados sob condições ambientais cuidadosamente controladas (em resistômetros especialmente projetados para determinação da resistência térmica de organismos indicadores biológicos de esterilização). Os bastões podem ser fixos às tampas ou às laterais dos recipientes antes do enchimento com o produto e recravação, e no final do processo são retirados. A suspensão de esporos é então retirada e efetuada a contagem dos esporos sobreviventes. Este resultado é relacionado com a curva de calibração dos carregadores e determina-se o valor de esterilização biológico à temperatura de calibração, aplicado ao produto. Este valor deve então, ser convertido para valor de esterilização F_0 biológico (à $121,1^\circ\text{C}$, com base em valor- $z = 10^\circ\text{C}$). Uma vez que estes bastões plásticos podem ser confeccionados em qualquer dimensão, de modo a localizar a suspensão de indicadores no ponto mais frio do recipiente, os valores de esterilização biológicos assim obtidos, podem ser mais adequadamente comparados com valores de esterilização físicos. Este modelo foi utilizado primeiramente por PFLUG, (1980a,b) e mais recentemente por RODRIGUEZ e TEIXEIRA (1988) e ZECHMAN (1989).

No Brasil, para o estabelecimento do valor de esterilização de alimentos, o uso de organismos indicadores biológicos em carregadores plásticos não tem sido relatado até o momento. Uma vez que o país se encontra em uma crescente conscientização da importância do controle de qualidade em todos os setores, este trabalho destina-se a reunir dados para sugerir, no futuro, o uso de uma forma adicional e prática de garantir ao consumidor brasileiro que um processo térmico projetado, foi aplicado de forma adequada ao produto.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se:

- 1 - Produzir e calibrar o modelo de indicador biológico para alimentos enlatados processados termicamente.
- 2 - Construir uma mini-retorta para calibrar os indicadores biológicos.

- 3 - Projetar o processo determinando a carga e resistência do microrganismo alvo de processamento térmico do produto considerando a) conserva tropical - processo de preservação contra deterioração por organismos termófilos esporulados, sendo a temperatura de distribuição e estocagem do produto acima de 30,0 °C, e b) distribuição e estocagem à temperaturas inferiores à 30,0°C

- 4 - Aplicar o processo desenhado e avaliar a eficiência dos IBs na determinação do valor de esterilização aplicado ao produto, através da comparação destes dados com dados fornecidos por método físico tradicional de medida de valor de esterilização (com termopares).

- 5 - Prover o Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, da técnica para avaliação biológica de processos de esterilização de alimentos enlatados.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. VALIDAÇÃO BIOLÓGICA DE PROCESSOS DE PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Durante a esterilização com calor, os alimentos são aquecidos à temperaturas suficientemente altas e por tempos suficientemente longos para destruir a atividade microbiana e enzimática. Como resultado disto, alimentos esterilizados podem ter vida de prateleira prolongada. O tratamento térmico severo durante a esterilização, produz alterações nas características nutricionais e sensoriais dos alimentos. No entanto, os desenvolvimentos da tecnologia de processos têm por objetivo reduzir o dano aos nutrientes e componentes sensoriais buscando a diminuição do tempo e/ou o aumento das temperaturas de processo, ou ainda através da agitação dos recipientes ou do processamento dos alimentos antes de embalá-los. (processamento asséptico)

O tempo requerido para esterilizar um determinado alimento é influenciado por:

1. a população inicial e a resistência térmica dos microrganismos ou enzimas provavelmente presentes no alimento
2. condições de aquecimento (da retorta)
3. pH do alimento
4. tamanho, forma e material de constituição dos recipientes
5. estado físico dos alimentos

Para determinar o tempo de processo de um determinado alimento, é necessário ter-se informações sobre a resistência térmica dos microrganismos e das enzimas, e também sobre a taxa de penetração de calor do produto. (FELLOWS, 1988).

Os processos de preservação de alimentos envasados em recipientes herméticos deve chegar a produtos estáveis durante o período de estocagem, e espera-se que ao final do processamento todas unidades dos lotes estejam estéreis. O termo "estéril" conota uma condição absoluta para um produto "livre de organismos viáveis", no entanto não se aplica quando se trata de grandes quantidades de produto, (lotes contendo centenas de recipientes), uma vez que nem todas unidades de lotes grandes estarão estéreis ao final de um processo de esterilização. Sabe-se que isto ocorre porque a morte dos organismos individuais de uma população microbiana homogênea sujeita ao calor, radiação, ou agentes químicos geralmente segue um padrão logarítmico, - somente com um tratamento infinito pode-se ter certeza absoluta de que todas unidades dos lotes ficariam estéreis. Desta forma, é muito mais realístico expressar o ponto final dos processos de preservação por calor através de uma especificação, onde se considera o número de falhas por quantidade de recipientes processado, ou seja, a probabilidade de unidades não estéreis ao final do processo (PUNE). (PFLUG, 1987, 1990; FELLOWS, 1988)

Na indústria farmacêutica para produtos produzidos sob condições de boas práticas de manufatura (GMPs) descritas pelo FDA, a probabilidade aceitável para produtos embalados asépticamente é: menos que uma unidade não estéril em $10E3$ unidades de produto ($PUNE < 10E-3$), e para produtos esterilizados é : menos que uma unidade não estéril em $10E6$ unidades de produto esterilizadas, ($PUNE < 10E-6$). (PFLUG, 1987)

Quando se realiza processos para preservação de produtos alimentícios ou farmacêuticos, o objetivo é chegar a um número muito baixo de sobreviventes, (p.ex: um organismo viável em cada $10E3$, ou $10E6$, ou $10E9$ unidades de produto processadas). Quando somente uma em $10E3$, $10E6$, ou $10E9$ unidades não está estéril, há uma grande probabilidade de que em cada unidade não estéril exista apenas um organismo viável. Consequentemente, na análise baseada na especificação "uma unidade não estéril em um lote de $10EX$ unidades", poderia-se então utilizar como ponto final deste processo, "um microrganismo sobrevivente em um lote de $10EX$ unidades de produto".(PFLUG, 1987)

Na área de processamento de alimentos, é desejável conhecer o alvo do processamento térmico para que se determine a especificação do ponto final. Para alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$, e $a_w > 0,85$) *Clostridium botulinum* é o organismo esporulado, patogênico, termo-resistente de mais alto risco; logo, sua destruição é o requerimento mínimo da esterilização com calor. Porém, em vegetais e em leite, existem microrganismos esporulados termo-resistentes que se não forem destruídos no processo, podem deteriorar o alimento durante a estocagem. Assim, três condições de preservação são consideradas no projeto de preservação de alimentos de baixa acidez:

- a) preservação para que o produto seja seguro do ponto de vista de saúde pública (SP), o que significa estar livre de esporos de *C. botulinum*, - em geral, é usada no processo uma PUNE-SP a partir de $= 10\text{E}-9$ (um esporo viável, sobrevivente, em $10\text{E}9$ recipientes de produto)
- b) preservação contra deterioração por organismos esporulados mesofílicos (M), PUNE-M = $10\text{E}-6$, e
- c) preservação contra organismos esporulados termofílicos (T), sendo que para produtos estocados à temperaturas abaixo de $30,0\text{ }^\circ\text{C}$, a PUNE-T = $10\text{E}-2$ ou $10\text{E}-3$, e para produtos estocados a temperaturas acima de $30,0\text{ }^\circ\text{C}$, (conservas tropicais), a PUNE-T = $10\text{E}-6$.

Para alimentos mais ácidos (pH entre 4,5 e 3,7) organismos como leveduras e fungos termo-resistentes são utilizados como alvos para estabelecimento do processo de preservação. Para alimentos ácidos ($\text{pH} < 3,7$) a inativação de enzimas é a principal razão do processamento, e as condições de aquecimento são menos severas. (PFLUG, 1987,1990; LOPEZ, 1987; FELLOWS, 1988)

Uma vez que a carga de microrganismos resistentes é geralmente baixa e conforme indicado acima, o ponto final de preservação dos processos é de um nível não mensurável, (da ordem de $10\text{E}-2$ a $10\text{E}-6$ organismos resistentes por unidade de

produto), o uso de microrganismos indicadores para validar biologicamente tais processos apresenta-se como uma forma útil de assegurar a aplicação dos processos projetados. Para validação biológica de processos de preservação serão selecionados microrganismos que possam atender as condições a serem validadas. A seleção dos microrganismos indicadores é também feita com base em seu valor-D, de modo que a partir de uma população inicial conhecida e levando-se em consideração o valor de esterilização especificado no processo projetado, a população final seja de nível mensurável.

Pode-se resumir os passos para efetuar a validação biológica da eficiência de processos de preservação de alimentos da seguinte forma: determina-se o valor de esterilização requerido pelo produto com o número inicial e valor-D da biocarga; faz-se a calibração do sistema IB e determina-se qual será a redução do número inicial após aplicação do processo térmico projetado; aplica-se o processo e faz-se a contagem do sobreviventes no sistema IB confirmando, com a redução da carga inicial, que o processo projetado foi aplicado.

Para ilustrar o método de validação biológica, na Fig. 1 está exemplificado como pode-se fazer graficamente a relação da destruição da microflora de um produto com a destruição dos microrganismos que constituem um sistema indicador biológico. Neste exemplo teria sido utilizado um produto com carga de microrganismo alvo a igual a $10E2$ esporos/unidade de produto e o processo de preservação foi projetado para uma $PUNE = 10E-6$ (o microrganismo alvo tem valor- $D_{121,1^{\circ}C} = 0,5$ min no produto), logo, o valor de esterilização requerido para este produto seria $F_0 = 4,0$ minutos. O indicador biológico selecionado para validar este processo possui valor- $D_{121,1^{\circ}C} = 1,0$ min, de modo que utilizando-se um número inicial da ordem de $10E5$, após aplicação de $F_0 = 4,0$ min., tem-se $10E1$ esporos sobreviventes em cada unidade do indicador. (PFLUG 1990)

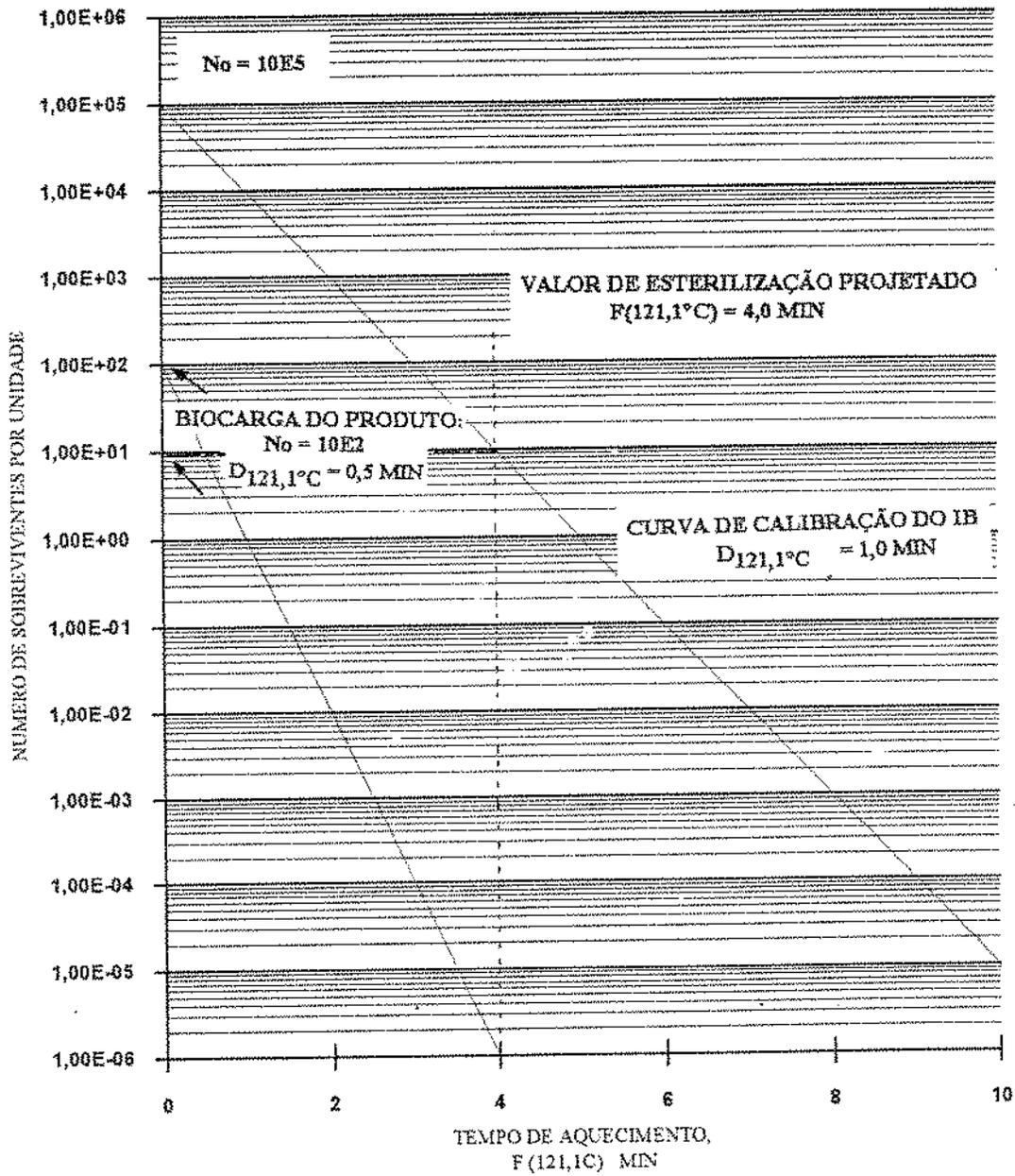


FIGURA 1 Validação biológica de um processo térmico através do uso de um IB. (Fonte Pflug, 1990)

2.2- INDICADORES BIOLÓGICOS

2.2.1-Definições e termos

A esterilização é uma ciência em desenvolvimento e com constantes melhorias no projeto de equipamentos e técnicas de controle de processos. Mudanças nos serviços de saúde pública, bem como o aparecimento de novos tipos de produtos que requerem técnicas mais refinadas de esterilização, a conscientização crescente do consumidor sobre a qualidade dos produtos e serviços, e o aparecimento de novas leis governamentais, são fatores que geram mudanças dos métodos de esterilização de produtos tanto na área farmacêutica e médico hospitalar, quanto na área de alimentos. Para gerar confiabilidade, os processos de esterilização devem ser cuidadosamente projetados, controlados e monitorados. (GILLIS et alii, 1976; PFLUG e SMITH, 1977; CAPUTO et alii, 1981; SKAUG e BERUBE, 1983; COOPER, 1985; SKAUG e KALANGER, 1986; KOTILAINEN e GANTZ, 1987).

A monitorização de um processo de esterilização, proporciona maior confiança e segurança do processo que foi aplicado ao produto. Para a maior parte dos processos empregados hoje em dia, existem métodos químicos, físicos e biológicos de monitorização. (LEE et alii, 1979; CAPUTO et alii, 1981; GRAHAM, 1986)

Monitor- Um monitor é um dispositivo utilizado para supervisionar processos ou as condições em que estes são realizados. No campo da esterilização, monitores podem ser utilizados nos procedimentos de controle de processos, fornecendo informações sobre a capacidade dos processos de esterilização, em produzir ou não, um determinado efeito (mínimo) sobre a carga contaminante do produto a ser esterilizado. Os monitores devem ser construídos, de tal forma que possam determinar o efeito do agente esterilizante sobre toda extensão do produto a ser esterilizado. Uma vez que os parâmetros que contribuem para o efeito microbiocida atingem seus níveis pré-determinados apenas gradualmente, e não todos ao mesmo tempo, o monitor deve ser capaz de integrar estas quantias parciais, e ao mesmo tempo, levar em consideração as inter-relações entre todos os parâmetros envolvidos no ciclo (ex. temperatura, tempo, concentração, umidade relativa). (ODLAUG et alii, 1981; SKAUG e BERUBE, 1983;

PFLUG e ODLAUG, 1986; SPICHER, 1988)

Como a função do **monitor** é registrar a eficácia do agente microbiocida em toda a extensão do item a ser esterilizado, para que o IB seja realmente um **monitor**, ele deve ser colocado dentro ou na superfície de um produto de modo a simular as piores condições possíveis a serem encontradas pelo agente esterilizante. (PFLUG e SMITH, 1977; CAPUTO et alii, 1981; PFLUG e ODLAUG, 1986).

O objetivo de qualquer processo de esterilização é destruir microrganismos, especialmente esporos bacterianos, que são as estruturas celulares de resistência. A medida mais objetiva disponível para determinar a eficiência de qualquer método de esterilização é o efeito letal (germicida) em si. Desta forma, os constituintes mais importantes dos **monitores biológicos** são microrganismos. O **monitor biológico** consiste, em geral, de **organismos indicadores** inoculados em **carregadores** e de uma **proteção**.

Organismo indicador é a denominação dada aos microrganismos utilizados na confecção dos monitores. Estes funcionam como sensores. Esporos bacterianos são em geral empregados como organismos indicadores. A capacidade dos microrganismos de se multiplicar serve como medida biológica, sendo a menor unidade biológica a célula em si. (SPICHER, 1988) O termo "**indicador biológico**" muitas vezes se refere aos **organismos indicadores** em si, com resistência conhecida a um agente esterilizante.

Carregadores são os objetos utilizados como suporte de **organismos indicadores**. A função dos carregadores é tornar possível o manuseio dos organismos indicadores. Para garantir que os **monitores biológicos** entrarão em contato com todos os parâmetros envolvidos no processo de esterilização, normalmente são preparadas suspensões aquosas dos **organismos indicadores** e estas são secas na superfície ou distribuídas no volume total de **carregadores**.

Existe uma variedade de materiais, tamanhos e formas que os **carregadores** podem apresentar. A maioria deles é feita de materiais sólidos como papel de filtro, vidro, grãos de solo, de areia ou de sílica, folha de plástico ou de alumínio, e fios de algodão,

e às vezes podem ser feitos de materiais semi-sólidos, como pasta de alginato de sódio ou misturas de alimento-alginato, ou ainda plásticos como polimetilmetacrilato. Em certos casos a deposição de organismos indicadores sobre os produtos (ex: deposição de suspensão de esporos no interior de um cateter antes do processo para validar o ciclo) ou homogeneizados nos produtos (ex: inoculação de suspensão de esporos termo-resistentes em uma lata de sopa de vegetais como na técnica de embalagens inoculadas) faz com que estes funcionem como carregadores .

Após a exposição ao agente esterilizante, os **carregadores** com os **organismos indicadores** devem ser submetidos ao procedimento de detecção da presença/ausência de organismos capazes de se multiplicar, ou de contagem dos mesmos. Conseqüentemente, estes devem ser protegidos de qualquer contaminação acidental, ou disseminação no ambiente até que eles tenham sido sujeitos à pesquisa de sobreviventes. Em alguns modelos de indicadores biológicos (**IBs**) onde as suspensões de **organismos indicadores** não são secas diretamente na superfície dos **carregadores**, o sistema requer, além do veículo onde os organismos indicadores são dispersos, uma **proteção** à prova de vazamentos para evitar contato do organismo indicador com o meio externo e vice-versa. Em alguns modelos onde as suspensões são secas em papel de filtro, esta **proteção** pode se apresentar na forma de envelopes de papel transparente. Porém, é fundamental no projeto de um sistema **IB**, que esta **proteção** permita que o agente esterilizante atinja os organismos indicadores da mesma forma que atinge os contaminantes do produto. Isto significa que para que o **monitor** atue de modo confiável, a **proteção** da suspensão de organismos indicadores de um sistema **IB**, não deve impor qualquer resistência ao contato do agente esterilizante para não mascarar ou retardar seu efeito letal. (PFLUG 1976; DADD et alii, 1983; KOTILAINEN e GANTZ, 1987; SPICHER, 1988; MAcCORMICK 1988, RODRIGUEZ e TEIXEIRA, 1989).

IBs empregados para avaliar o efeito microbiológico de um processo de esterilização, devem ser preparados de modo a apresentar um desafio real ao processo. A resistência do **IB** é uma função da resistência do organismo indicador e da concentração do agente esterilizante e da resistência física à penetração do agente esterilizante oferecida pelo carregador. (MYERS & CHRAI, 1980)

2.2.2. Microrganismos utilizados como organismos indicadores

No começo deste século, microbiologistas e médicos começaram a buscar garantias maiores da esterilidade de itens esterilizados, através da monitorização da temperatura, pressão, e do tempo de exposição ao agente esterilizante. Assim, suspensões de esporos bacterianos começaram a ser usadas como meio de monitorar esterilização à vapor. (BIGELOW, 1920 e WILLIAMS, 1929, citado por MILLER, 1971) .

No começo dos anos cinquenta, BREWER et alii (citado por MILLER 1971), conduziram estudos com *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953, buscando selecionar esporos não patogênicos ao homem, não pirogênicos e não produtores de toxinas, e que não crescessem à temperatura de 37,0° C ou abaixo, durante um período de duas semanas de incubação, como determinava os Regulamentos do Serviço de Saúde Pública dos EUA vigentes na época. (MILLER, 1971; PFLUG et alii, 1980b). Antes de 1960, já estavam sendo produzidas e comercializadas preparações padronizadas de esporos de *B. stearothermophilus* para atuarem como organismos indicadores de indicadores biológicos de esterilização na indústria farmacêutica e em hospitais. (PERKINS, 1969; MAKI, 1987)

Entre as características que justificam o uso de esporos como indicadores de esterilização destacam-se ainda:

- a) sua estabilidade, que é maior do que a das células vegetativas, e que é um atributo da maior importância, pois as propriedades dos organismos indicadores devem se manter constantes durante a propagação de subcultura para subcultura e durante a estocagem,

- b) sua habilidade de responder às pequenas variações no ambiente, eles respondem quantitativamente às variações físicas, e são sensíveis a um grande número de condições ambientais além da temperatura, como por exemplo: presença de substâncias químicas no ambiente, pH do substrato, disponibilidade de água, e outros fatores. Quando se deseja medir o efeito da

temperatura, estes outros fatores que afetam a sobrevivência dos esporos devem ser mantidos constantes

- c) sua facilidade de manuseio e produção de culturas, e, principalmente,
- d) sua resistência, o alto nível de resistência à destruição por agentes físicos e químicos exibida pelos esporos está diretamente relacionada com as características estruturais e químicas de sua capa e camadas protetoras. O esporo é permeável, e as espessas camadas laminadas protetoras do "core" agem como um "selecionador" molecular, conferindo resistência à penetração de substâncias químicas tóxicas, principalmente as de alto peso molecular. O teor de pontes dissulfeto, íons cálcio e ácido dipicolínico, tem sido relacionados com a sua resistência ao calor. (PFLUG e SMITH, 1977; MYERS & CHRAI, 1980; PFLUG, 1982; GOMBAS, 1983; GRAHAM, 1986; SPICHER, 1988; PFLUG, 1990.)

A resistência aos agentes esterilizantes dos esporos mais comumente utilizados na confecção de IBs, deve, obrigatoriamente, ser maior do que a resistência dos organismos contaminantes do item a ser esterilizado, quer sejam estas células vegetativas ou esporos. Esta resistência maior significa que os organismos indicadores reagem de uma forma mais lenta ao agente letal que a carga contaminante. Isto representa portanto, o fator de segurança do indicador, uma vez que quando um indicador mostrar que o processo de esterilização foi eficiente, é perfeitamente razoável assumir que uma carga igual ou maior de células vegetativas foi exterminada. (LEE et alii, 1969; GILLIS et alii, 1976; PFLUG e SMITH, 1977; PFLUG et alii 1980a; CAPUTO et alii, 1981; ODLAUG et alii, 1981; PFLUG e ODLAUG, 1986; MAKI et alii, 1987; KOTILAINEN e GANTZ, 1987).

Os tipos de microrganismos usados em um sistema IB, devem ser selecionados de acordo com as condições teste específicas. Desta forma, encontram-se esporos de microrganismos de diferentes espécies e linhagens sendo usados em várias aplicações.

Em geral, esporos do genero *Bacillus* são empregados como organismos indicadores para procedimentos de esterilização como se descreve a seguir : *Bacillus stearothermophilus*, para calor úmido e formaldeído; *Bacillus subtilis* var niger para calor seco e para óxido de etileno; e *Bacillus pumilus* para radiação. (SPICHER,1988, USP, 1995). PFLUG e ODLAUG (1986) citam que também é relatado o uso de *Bacillus subtilis*, ATCC 5230 , e *Bacillus coagulans* para calor úmido, e *Bacillus subtilis* ATCC 5230 e *Bacillus stearothermophilus*, para calor seco.

Células vegetativas resistentes também podem ser usadas como organismos indicadores. Alguns autores como SILVERMAN, (1983) citado por PFLUG e ODLAUG, (1986) e SPICHER, (1988), relatam o uso de suspensões de *Deinococcus radiodurans* (antigo *Micrococcus*) para teste de métodos de esterilização por radiação.

Embora organismos anaeróbicos sejam mais difíceis de se manusear, esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679, tem sido utilizados na área de alimentos para monitorização e validação biológica de processos de esterilização de alguns tipos de alimentos processados termicamente. Alguns alimentos de baixa acidez (pH >4,6 e < 5,6) permitem o crescimento e proliferação de *C. botulinum* que geralmente é acompanhado pela produção de uma neurotoxina fatal. Desta forma, o processo térmico mínimo de alimentos de baixa acidez enlatados é projetado para atingir um nível seguro de ausência de esporos de *C. botulinum* que possui ampla distribuição na natureza e presume-se que possa estar presente praticamente em todos alimentos. Para garantir a adequação dos processos desenhados para tais produtos, na técnica de embalagens inoculadas recomenda-se portanto o uso de esporos do *C. sporogenes* PA 3679 como organismo indicadores. Esta seleção é fundamentada em fatores como:

- 1- evita-se contaminação da planta com *C. botulinum* ,
- 2- sua resistência térmica nos alimentos é maior que a de *C. botulinum* ,
- 3- não é produtor de toxina, e

- 4- possui os mesmos requerimentos fisiológicos que o *C. botulinum* (GOLDONI et alii, 1981; LOPEZ, 1987;GAZE et alii 1990)

2.2.3 Tipos de IBs

Existem dois tipos básicos de IBs: o tipo carregador e o tipo produto inoculado.

Tipo carregador. Os carregadores podem ser utilizados de duas formas:

- 1- os organismos indicadores em suspensão são depositados de forma homogênea na superfície de carregadores que podem variar largamente quanto ao material de constituição, tamanho e forma.
- 2- os organismos indicadores em suspensão são depositados no interior dos carregadores que neste caso funcionam como cápsulas. Neste tipo os carregadores podem ser ampolas, bulbos ou tubos capilares de vidro, bastões de plástico, de alumínio ou de plástico-alumínio. Em alguns tipos os organismos indicadores são suspensos em água, solução tampão, ou em caldos de cultura.

Tipo produto inoculado. Os organismos indicadores são depositados sobre ou no interior de uma amostra ou simulação do material a ser esterilizado. Na área farmacêutica e médico-hospitalar, os produtos inoculados são incubados em caldos de cultura contendo indicadores de pH adequados e a observação de presença ou ausência de crescimento indica a eficiência do processo. Na área alimentar, os produtos inoculados podem ser utilizados para controlar a população inicial, através da observação da deterioração do produto após ou durante o período de incubação, ou podem ser utilizados para determinação da relação entre o número inicial e final dos sobreviventes em função da cinética de destruição do organismo indicador no produto para avaliação da letalidade integrada do processo.

2.3. USO DE IBs NA ÁREA FARMACÊUTICA E HOSPITALAR

O tipo clássico e mais antigo, de IBs para ciclos de esterilização, é o denominado "Envelope de Esporos de Organismos do Solo" (Spore Earth Packet), que consiste em um pequeno envelope contendo cerca de 0,2 g de solo composto seco e peneirado envolto em um pedaço de papel de filtro. Para determinação da carga inicial e para recuperação dos sobreviventes, todo material é suspenso em meio líquido, para posterior incubação em condições adequadas. A versão moderna deste IB é um envelope de papel transparente contendo uma pequena tira (aprox. 30,0 mm l x 6,0 mm b) ou disco (aprox. 10,0 mm D.E.) de papel de filtro inoculadas com uma suspensão de esporos em concentração conhecida (entre 10E5 e 10E6).

Suspensões de esporos de culturas puras de organismos indicadores são preparadas e depositadas assepticamente nas tiras ou discos, que depois de secas são colocados dentro dos envelopes de proteção. Após a exposição ao agente esterilizante os carregadores são assepticamente retirados dos envelopes e submetidos aos procedimentos adequados de pesquisa de sobreviventes. Neste tipo de IBs a ausência ou presença de crescimento é o que determina a eficiência do ciclo de esterilização. (MILLER, 1971; SPICHER, 1988). Exemplos comerciais deste sistema são o UNISPORE produzido pela AMSCO, EUA e o SPOREDISK produzido pela MALMO, Suécia. (PFLUG e SMITH, 1977; SKAUG e BERUBE, 1983; SKAUG e KALAGER, 1985, 1986; KOTILAINEN e GANTZ, 1987; SPICHER, 1988)

Em uma variação do modelo descrito anteriormente, os organismos indicadores são convencionalmente depositados em uma tira ou disco de papel de filtro, porém são colocadas em um recipiente plástico contendo também uma ampola de vidro especial (com paredes finas) contendo caldo de cultura estéril (com indicador de pH). Este recipiente de plástico flexível (que varia entre os fabricantes, porém, geralmente é polipropileno) possui uma tampa com orifícios por onde também há penetração do agente esterilizante, sendo que abaixo desta tampa há um filtro permeável. Após o ciclo de esterilização a ampola de vidro é quebrada torcendo-se ou aplicando-se pressão ao frasco de plástico. Desta forma, o meio de cultura é liberado e submerge a tira ou disco

de papel de filtro, sem risco de contaminação pós-processo por não haver manuseio durante a transferência da tira de esporos para tubo com caldo de cultura. Todo o sistema é incubado em condições adequadas para a pesquisa de organismos sobreviventes. A viragem da cor do meio de cultura indica presença de sobreviventes, ou seja ineficiência do processo. Exemplos de IBs deste tipo comercializados são o "Attest Biological Indicators", produzido pela 3M Co., e o "Proof Biological Indicator" produzido pela AMSCO, USA (HODGES, 1982; SKAUG e BERUBE, 1983; SPICHER, 1988)

O "Sterikon -Bioindicators" produzido pela Merck, USA, é um tipo de IB que também garante não haver risco de contaminação pós-processo uma vez que suspensões de esporos *B. stearothermophilus* são colocadas diretamente em ampolas de vidro contendo cerca de 2,0 ml caldo de soja tríptica (TSB) com bromocresol púrpura. Este tipo de indicador pode também ser utilizado para validação de processos de esterilização aplicados a produtos médico-hospitalares líquidos esterilizados em garrafas, mergulhando-se a ampola no conteúdo e posicionando-a no ponto frio do recipiente. Terminados os processos de esterilização as ampolas são incubadas nas condições adequadas. Neste tipo de IB, a eficiência dos ciclos também é observada pela não viragem do indicador de pH do caldo de cultura. (COSTIN e GRIGO, 1974; SPICHER, 1988).

DADD et alii (1983) descreveram um modelo especial de monitor para esterilização com óxido de etileno. O sistema é composto por suspensões de esporos em meio sintético com um indicador de pH, depositadas na superfície de tubos de Nylon, (6,0 mm D.E. e aproximadamente de 10,0 mm l), que funcionam como carregadores. Após serem depositadas nos tubos, deixa-se a suspensão secar em câmara de fluxo laminar. Para a pesquisa de carga inicial e de sobreviventes, após o processo, os carregadores são transferidos para frascos com água destilada estéril que são colocadas em um agitador ultrasonico. Alíquotas são retiradas e diluições são plaqueadas e incubadas para contagem de células.

SPICHER e BROCHERS (citado por SPICHER,1988) descrevem um sistema IB indicado para esterilização com formaldeído. Este consiste em adaptar a cada objeto a ser esterilizado um pequeno tubo de vidro com aproximadamente 30,0mm de comprimento e com o mesmo diametro interno do objeto a ser esterilizado, que abriga em sua porção terminal um fio de algodão, de dimensão não especificada pelo autor, inoculado com uma suspensão de $10E6$ esporos termo-resistentes por ml. Após o final do ciclo de esterilização, o fio é retirado e colocado em um frasco com água destilada e agitado. Desta suspensão, são preparadas alíquotas que são plaqueadas em meio especial para germinação e incubadas para posterior contagem de sobreviventes.

2.4. USO DE IBs NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO COM CALOR

Na indústria de alimentos suspensões de esporos de organismos termo-resistentes tem sido usadas como organismos indicadores na composição de IBs, tanto para fornecer dados para o cálculo do valor de esterilização aplicado ao produto, quanto para checar se o processo aplicado em um produto foi suficiente para garantir a esterilidade comercial ou aplicação de processo mínimo.

A inoculação direta de suspensões de esporos de organismos termo-resistentes em recipientes contendo alimento (em geral enlatados) é a base da técnica de embalagens inoculadas. Na preparação das embalagens inoculadas, os organismos em suspensão (normalmente em solução salina, em concentração suficiente para produzir uma população mínima de $10E4$ a $10E5$ esporos viáveis por recipiente), são depositados nas embalagens (em geral 100) de acordo com a constituição do alimento estudado. Produtos fluidos, como sopas, são normalmente inoculados dispersando-se a suspensão com a ajuda de um agitador mecânico. Produtos particulados em salmoura ou em xaropes, são inoculados no centro da partícula com a ajuda de uma pipeta ou seringa. Para produtos onde mistura uniforme não é possível o inóculo em geral é injetado em um ponto próximo do centro geométrico da lata, com uma seringa. A embalagem é devidamente identificada e encaminhada para o processamento. Terminado o ciclo de

aquecimento e esfriamento, os recipientes marcados são incubados para pesquisa de presença ou ausência de sobreviventes. Isto pode ser feito através da constatação de alterações físicas da embalagem, (como estufamento, ruptura na linha de arrafagem, etc), ou observações de alterações químicas do produto, (como alteração da acidez, alteração de cor, etc.) ou ainda através de evidências microbiológicas da presença de organismos sobreviventes nas subculturas de uma amostra do produto. Este teste sempre foi utilizado com objetivo de observar presença ou ausência de crescimento microbiano, (método de ponto final), o que determina eficiência ou ineficiência do processo de esterilização aplicado. (NCA,1968; PFLUG,1980b; HERSON e HULLAND,1984; LOPEZ, 1987)

Porém YAWGER, (1967 citado por BARRY e BRADSHAW, 1980; e YAWGER, 1978) introduziu o uso do método de redução de contagem acoplado à técnica de embalagens inoculadas para validação ou monitorização de processos térmicos aplicado aos produtos. Para este fim, os dados obtidos a partir do número de sobreviventes ao processo são utilizados para calcular o valor de esterilização aplicado em toda extensão do recipiente, valor de esterilização integrado (I.S.) através da relação entre a contagem inicial (I) e a contagem de sobreviventes (S) , em função da resistência térmica do organismo indicador no produto estudado (valor -D), com a equação :

$$I.S. = D(\log I - \log S) \quad (\text{eq.1})$$

O autor comparou os dois valores de esterilização aplicados a creme de milho e milho em salmoura enlatados processados em retorta estática comercial à 115,6 °C. Foram inoculadas as embalagens com suspensão de *B. stearothermophilus* FS 1518, em concentração de 3 x 10E6 esporos/ml. O valores-Fo foram calculados pelo Método Geral, e os valores I.S foram calculados a partir da redução da contagem das embalagens inoculadas. Foi observado que os valores I.S excederam os valores-Fo para creme de milho, sendo que as diferenças aumentaram à medida que aumentou o tamanho das latas, chegando a um máximo de 8,4 min para as latas 603 x 700. Foi também observado, que as diferenças entre I.S e Fo encontradas, foram uma função do tempo de processo, para o produto condutivo. Os resultados obtidos para milho em

salmoura nos dois tamanhos de lata estudados, foram valores I.S. de 2,0 a 3,0 % maiores que valores F_0 , de onde foi concluído que para alimentos convectivos existe pouca diferença entre I.S. e F_0 .

Usando a mesma técnica e abordagem de YAWGER (1978), alguns autores tem feito comparações dos valores de esterilização integrado e valor de esterilização F_0 para produtos processados em retorta agitadas.

HOUTZER e HILL (1977) fizeram estudos de redução de contagem e penetração de calor para determinar a letalidade de processos térmicos durante desvios de temperaturas. Os autores inocularam diretamente suspensões de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 em latas de milho em salmoura, vagem em salmoura e creme de milho, processados em retortas agitadas contínuas e simuladores de laboratório. Para os processos normais de vagem, o valor I.S. médio foi de 7,7 min e F_0 foi de 5,8 min, e para os processos com desvio, o I.S. médio foi de 8,7 min e F_0 foi de 7,8 min. Em todos os estudos os valores I.S. foram maiores que os valores F_0 , sendo que para milho em salmoura enlatado (latas 303 x 406) processado em "Steritort" (FMC) à 121,0 °C, a diferença chegou a 5,0 min. (os valores I.S. médios foram de 14,3 min e F_0 = 9,5 min)

BERRY e BRADSHAW (1980) inocularam suspensões de esporos de *B. stearothermophilus* (1503) diretamente em sopa creme condensada de aipo enlatada (latas três tamanhos) processadas em "Steritort" e "Orbitot" (FMC) às temperaturas de 124,0 e 129,0°C respectivamente. Os valores I.S. observados para ambos equipamentos foram em geral mais altos que os valores F_0 , quando calculados pelo Método Geral com valor-z = 10,0 °C, ou quando calculados com valor-z = 7,8°C, (diferenças em média de 12% para latas menores até 35% para latas maiores). Diferenças maiores foram encontradas para cogumelos em salmoura envasados em latas de dois tamanhos (BERRY e BRADSHAW 1982). Os recipientes foram inoculados com suspensões de esporos de *B. stearothermophilus* # 1518, e processados em "Steritort" à 124,0 °C. Os autores encontraram que para latas menores, os valores I.S. obtidos foram em média 30% maiores que os valores F_0 (calculado pelo Método Geral com valor-z = 10°C), e para latas maiores, os valores I.S. foram em média, 60% maiores que os valores F_0 .

A maior diversidade de modelos de IBs utilizados na área de alimentos está descrita na monitorização e validação de processos assépticos de alimentos particulados, em função das dificuldades de utilização de métodos físicos devido ao movimento contínuo dos produtos nos trocadores de calor. Muitos autores testaram modelos de partículas inoculadas ou simulações de partículas contendo organismos indicadores, sendo que alguns dos modelos e os problemas apresentados serão descritos em seguida.

HUNTER et alii, (1972, citado por BROWN et alii, 1984, e por DIGNAN et alii, 1989), descreveram um método de imobilização de suspensões de esporos de *Bacillus anthracis* como IBs para processos térmicos em sistemas de fluxo contínuo para alimentos particulados. Os autores simularam partículas de alimentos preparando esferas de metilmetacrilato ("perspex") embebidas nas suspensões de esporos. As dificuldades apresentadas por esta técnica foram o fato do valor-z dos esporos neste sistema ser da ordem de 61,0 °C, o que é muito mais alto que o valor utilizado como base para o cálculo dos processos térmicos (=10,0 °C), e que neste plástico os esporos ficam sujeitos à destruição por calor seco, assim a taxa de morte se torna uma função do teor de umidade do plástico.

Na tentativa de produzir simulações de partículas com umidade semelhante à das partículas de alimento DALLYN et alii (1977, citado por BROWN et alii e por DIGNAN et alii, 1989) imobilizaram suspensões de esporos de *B. stearothermophilus* em alginato de sódio e prepararam esferas (1,6 a 2,2 cm diâmetro) empregadas na validação biológica de processos contínuos de aquecimento-manutenção-esfriamento. Esferas maiores de alginato/esporos (3,0 cm diâmetro) foram também utilizadas por BEAN et alii (1979, citado por BROWN et alii, 1984, e por GAZE et alii, 1990) na avaliação do efeito letal de processos térmicos realizados em trocadores de calor de superfície raspada semi-comerciais, operando na faixa de 138,0 a 142,0 °C.

Posteriormente, a mesma técnica foi aprimorada e utilizada por BROWN et alii (1984)

que imobilizaram suspensões de esporos de *C. sporogenes* (PA 3679, 1×10^6 esporos/cubo) e *B. stearothermophilus* (1×10^7 esporos/cubo) em cubos (0,8 a 2,4 cm) formados por misturas de alginato de sódio e purês de batata, de ervilhas ou de carne. Os cubos foram aquecidos em uma câmara estática de aquecimento com vapor (escala experimental), na faixa de temperatura de 120,0 a 150,0 °C. Uma vez recuperados os sobreviventes, o valor de esterilização integrado obtido (Fs) foi comparado com valores Fs físicos calculados teoricamente (Stumbo, 1973 a partir da difusividade térmica dos cubos). Os valores Fs biológicos obtidos a partir dos cubos feitos com *B. stearothermophilus* apresentaram maior diferença em relação aos valores Fs físicos que os Fs biológicos obtidos a partir de cubos com *C. sporogenes*. As menores diferença entre Fs físicos e Fs biológicos, foram observadas com partículas de purê de carne/alginato, para ambos organismos indicadores.

RICHARDSON e GAZE, 1986 e NESARATNAM e GAZE, 1987, (citados por GAZE et alii 1990) utilizaram células vegetativas de *Zygosaccharomyces bailii* imobilizadas em cubos e esferas de pêssego/alginato em estudos conduzidos às temperaturas de 60,0 e 65,0 °C em sistema de recirculação de fluxo. Uma vez recuperadas as partículas e determinados os sobreviventes ao processo, a letalidade do processo foi avaliada levando-se em conta a cinética de destruição térmica dos organismos indicadores nas partículas, e os valores de esterilização biológicos foram comparados aos valores de esterilização físicos calculados teoricamente. Os autores observaram que os valores Fs experimentais, obtidos a partir dos indicadores biológicos, foram semelhantes aos valores Fs físicos.

GAZE et alii (1988, citado por GAZE et alii, 1990) realizaram estudos em trocadores de calor de superfície raspada (Cherry Burrel) em faixas intermediárias de temperaturas, de 80,0 a 100,0 °C, empregando partículas de pêssego/alginato contendo suspensões de esporos de *Clostridium butyricum*. Os autores citam que os valores de esterilização médios experimentais, valores-Fs, de cada grupo de dados apresentaram resultados aceitáveis quando comparados com valores de esterilização calculados teoricamente.

GAZE et alii (1989, 1990) determinaram a letalidade de processos térmicos aplicados à esferas de purê de batatas/alginato, purê de ervilhas /alginato e purê de rim/alginato processados em sistema trocador de calor de superfície raspada Cherry Burrell na faixa de 115,0 a 130,0 °C. As esferas foram feitas com diâmetro de 3,0 e 5,0 mm e suspensões de *B. stearothermophilus* FS 210 e FS 223 foram imobilizadas nas esferas em concentração de aproximadamente 10E7 esporos/partícula. Os autores citam que o uso do alginato de sódio na confecção das simulações de partículas permite a confecção de formatos e tamanhos variados. Neste trabalho foi relatado que houve dificuldade na recuperação das partículas sem danos, causados durante o fluxo pelo trocador de calor. Em consequência, houve perda de esporos durante o processamento. Foi observado também, que o tempo de residência das partículas foi maior que o previsto a partir dos cálculos das taxas de fluxo, provavelmente devido à retenção das partículas no sistema, e devido a isto não foi adequado fazer comparações entre os valores de esterilização biológicos e físicos. A menor variação de valores FS foi obtida nos indicadores à 125,0 °C a partir das esferas de purê de batata/alginato. (D.P. = 0,9)

Uma vez que nos casos acima, a suspensão de esporos do organismo indicador é homogeneizada no carregador formando as partículas, o resultado da medida do processo de esterilização reflete mais o valor de esterilização integrado do que o valor de esterilização no centro geométrico ou ponto mais frio da partícula. (DIGNAN et alii, 1989). Uma das dificuldades destes métodos citadas por todos autores é que o número de partículas preparadas para cada processo deve ser grande (mais de 100 por processo), uma vez que estas sofrem danos ao longo do fluxo pelos trocadores de calor, e em alguns casos, perde-se esporos ao longo do processador de modo que poucas partículas intactas podem ser recuperadas.

SEGNER et alii (1989) validando biologicamente processamento asséptico de carne de peru em molho, em trocador de calor de superfície lisa, utilizou cubos de carne de peru de 12,7 mm, inoculados com suspensão de esporos de *C. sporogenes* (P.A. 3679) como organismos indicadores. Com uma agulha, fios de linha de algodão inoculados com a suspensão de esporos foram posicionado no centro geométrico dos cubos. Um nó nas extremidades dos fios impedia que estes se deslocassem no interior da partícula durante o processamento, garantindo assim que os esporos pudessem medir o efeito letal do

calor no centro da partícula. Terminados os ciclos, os fios eram retirados das partículas e encaminhados para pesquisa de sobreviventes e determinação da letalidade do processo. Os autores compararam valores Fo-BIO com valores Fo calculados a partir de simulações computadorizadas de transferência de calor para alimentos particulados. Os resultados obtidos foram considerados bons pelos autores, apesar de que em um experimento mostrado, os valores Fo-BIO em tubo curto foram 80% maiores que Fo-Fis, e em tubo longo foram 8,5% maiores.

Um método para partículas, porém com abordagem diferente, foi tentado por HERSON e SHORE, (1981). Os autores utilizaram bulbos de vidro de 5,0 mm de diâmetro contendo uma suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* (10E6 esporos em solução de citrato tamponada) inserido no centro de uma partícula de alimento. Os bulbos eram feitos de tubos capilares inflados que após receberem a suspensão eram selados na chama, estes carregadores eram depositados no interior de cubos feitos de vegetais. Neste trabalho os autores prepararam cubos de cenoura porém, citam que qualquer vegetal que possua firmeza para o corte em forma de cubo pode ser utilizado para simular a partícula de alimento contendo o carregador de organismos indicadores, e que este método é correntemente utilizado por eles em escala industrial (Londreco, Canadá). Para posicionamento do carregador na partícula de cenoura, um orifício foi feito em um cubo de cenoura com uma broca, e um bulbo de vidro 5,0 mm diâmetro foi inserido no orifício de cada partícula. Após a inserção do bulbo, uma rolha feita do mesmo alimento com encaixe perfeito no orifício, foi colocada e o local selado com resina "epoxi". Após a recuperação das partículas indicadoras, que eram identificadas por estarem dentro de um envoltório de gase, estas eram encaminhadas para pesquisa de sobreviventes ao processo. Os autores observaram resultados satisfatórios quando comparados com dados físicos dos processos com os valores Fo biológicos, determinados durante processamento das partículas em trocador de calor "duplo cone" sistema tipo Dole normal.

Aparentemente existem algumas vantagens no modelo de HERSON e SHORE, (1981) em relação às simulações de partículas descritas anteriormente: (1) conhece-se a localização dos esporos nas partículas; (2) ao se recuperar os bulbos, recupera-se todos os esporos sobreviventes ao processo; (3) a suspensão de organismos indicadores fica

localizada no centro geométrico das partículas; (4) a calibração dos organismos indicadores não é produto específica. (DIGNAN et alii, 1989).

PFLUG (1976) projetou um IB para monitorização e/ou validação de processamentos térmicos aplicados a alimentos enlatados ou de soluções parenterais em garrafas, que apresenta vantagens similares às do modelo descrito acima. O modelo consiste em um dispositivo que abriga uma suspensão de esporos calibrados para monitorar processos de esterilização em retortas agitadas contínuas ou descontínuas. Cada unidade consiste em um carregador de plástico (Teflon ou Nylon), cujo comprimento depende das dimensões do recipiente no qual ele será instalado. Em uma das extremidades, o bastão possui uma cavidade para deposição da suspensão de esporos, que corresponde à aproximadamente 50% do comprimento do bastão. O desenho do bastão permite que este se ajuste perfeitamente a um receptáculo convencional para termopares, tipo "C9" (Ecklund-Harrison Inc.) pela extremidade oposta à da cavidade para a suspensão de esporos. Este encaixe permite que o corpo do bastão se projete fixo para o interior do recipiente com o produto, de modo que a suspensão de organismos indicadores fique na região de aquecimento mais lento do recipiente. Para o preparo dos IBs, aproximadamente 0,28 ml de uma suspensão de *B. stearothermophilus* (concentração $10E6$ esporos/IB, em tampão fosfato) é depositada no orifício interno, (na extremidade inferior do bastão). Este orifício é selado na extremidade inferior por meio de um parafuso do mesmo material rosqueado firmemente, a fim de impedir vazamento. Após o final do ciclo, o bastão é retirado do recipiente com o produto, e a suspensão encaminhada para a contagem de sobreviventes. Este modelo é comercializado atualmente nos EUA, sendo que pode também ser confeccionado com o corpo todo em metal, somente com o parafuso/tampa feito em teflon. (PFLUG, 1992)

PFLUG et alii (1980a), estudaram a eficiência dos bastões plásticos como carregadores para suspensão de *B. stearothermophilus* (ATCC 7953) como indicadores biológicos para determinação de valores Fo-BIO em ervilhas em salmoura processadas em "Steritort" (FMC) à 123,3 °C em processos agitados e estáticos. Foi observado que para os processos estáticos os valores Fo-FIS (Método Geral) se apresetaram em média 22,0% maiores que Fo-BIO, e para os processos agitados, Fo-FIS ficaram em média 14,0% maiores que Fo-BIO em uma série de ensaios (com tempos de aquecimentos de

9 e 11 minutos), e 5,0% maiores que Fo-BIO em outra série (com tempos de aquecimentos de 10 e 12 e 13,5 min.).

PFLUG et alii, (1980b) utilizaram também este mesmo modelo de bastões plásticos com suspensão de *B. stearothermophilus* (ATCC 7953) como IBs, para comparar o valor de esterilização biológico (Fo-BIO) com o valor de esterilização físico (Fo-FIS) aplicado a milho em salmoura em latas 303 x 406, processado em retorta agitada "Steritort" (FMC), às temperaturas de 115,6, 121,1 e 127,8°C. Os IBs foram calibrados às temperaturas de 115,0 121,1 e 127,0°C. Para estudar os efeitos da utilização de curvas de calibração feitas em temperaturas diferentes às dos processos sobre os valores Fo-BIO, os valores F-BIO obtidos a partir dos IBs foram corrigidos com as curvas de calibração produzidas às três temperaturas. Os autores citam que o uso de curvas de calibração apresentam resultados mais precisos que o uso da equação $F(\text{BIO}) = D(\log N_0 - \log N)$ pelo fato da curva semi-logarítmica de sobreviventes nem sempre ser uma linha reta. Neste estudo, os esporos sobreviventes produziram quase uma linha reta à 127,0°C, mas produziram curvas às outras duas temperaturas estudadas. Os resultados dos estudos de comparação dos valores de esterilização biológicos com físicos, mostraram que os valores de Fo-BIO obtidos foram maiores que os Fo-FIS da ordem de 4,0 a 9,0 % para 115,0 ° C; de 0,4 a 32,0 % para 121,0 ° C; e, de 4,0 a 47,0 % para 127,0 ° C. Os autores consideraram tais resultados razoáveis, exceto para 127,0 ° C , onde os valores de Fo-BIO 47% maiores que Fo-FIS foram obtidos a partir da correção dos valores F-BIO com a curva de calibração dos IBs feita à 121,0 ° C. Os autores também consideram estes resultados fora dos padrões obtidos no resto do estudo.

JONES et alii (1980), determinaram o efeito do peso de enchimento no valor de esterilização aplicado a dois tipos de vagem enlatadas processadas em Sterilmatic (FMC) em condições de campo. Os resultados indicaram que tanto para vagem cortada em pedaços de uma povelada quanto para corte estilo francês (corte longitudinal da vagem madura), à medida que aumentava o peso de enchimento (de 10,5 a 13 onz.) diminuía o valor F-BIO (em média para os dois tipos de 14,0 a 9 minutos).

RODRIGUEZ e TEIXEIRA (1988) projetaram e testaram uma modificação ao modelo

de IB plástico desenvolvido por PFLUG, (1976). O dispositivo, utilizado pelos autores para latas, é um bastão composto por plástico/alumínio, sendo que o orifício para abrigo da suspensão de esporos do organismo indicador é feito de metal, enquanto que a secção por onde é fixo o corpo do carregador ao recipiente é de plástico. Isto garante que o organismo indicador não receba o calor diretamente transferido das paredes das latas. O sistema de fixação às latas também é feito através de um receptáculo convencional C-9 para termopares (Ecklund-Harrison Inc.). Neste estudo, os autores comparam a atuação de bastões de plástico/alumínio, (uma modificação ao modelo de PFLUG, 1976) com amostras comerciais do bastão plástico descrito por PFLUG, na determinação de parâmetros de penetração de calor em latas com água (102,0 mm D.I.x 178,0 mm h) processadas em retorta convencional estática. No corpo dos carregadores foram inseridos termopares de agulha tipo T (CNS, Ecklund-Harrison Inc) para fornecer de dados tempo-temperatura para construção das curvas de penetração de calor. Estes resultados foram comparados com os dados obtidos para o produto a partir de termopares instalados em outras latas. Os resultados obtidos mostraram que o dispositivo de plástico/metal apresentou curvas mais próximas às do produto que as curvas do dispositivo plástico. Devido a alta condutividade térmica, o alimento oferece menos resistência à transferência de calor para o interior do IB. O carregador plástico apresentou um atraso térmico maior, ficando até 5,0 °C abaixo da temperatura média do produto em algumas fases do processamento.

ZECHMAN, (1989) utilizou o mesmo modelo plástico de IBs descrito por PFLUG, (1976) com esporos de *B. stearothermophilus* como organismo indicador. O autor expôs os IBs a vários tipos de tratamentos não isotérmicos para comparar valores Fo-BIO e Fo-FIS. Foi observado que os esporos nos IBs se apresentaram de forma consistente e reproduzível, porém os valores Fo-Fis calculados foram consistentemente menores (de 9 a 24%) que os valores Fo-BIO.

Da mesma forma que para o carregador em forma de bulbo de vidro, uma das vantagens deste sistema é que a calibração dos esporos não tem que ser feita em todo e qualquer produto cujo processamento térmico será monitorado, uma vez que os esporos não entram em contato direto com o meio externo. Tendo sido calibrados no veículo utilizado para estocagem da suspensão, o mesmo gráfico de calibração pode ser

utilizado para determinação do valor de esterilização em qualquer produto. Neste caso também, durante todo o processo os esporos estão no ponto frio dos recipientes, portanto os valores de esterilização calculados se referem às piores condições possíveis de processo, e podem ser comparados com valor F_0 . (PFLUG et alii, 1980a, b).

2.5. MÉTODOS DE USO DE ESPOROS BACTERIANOS COMO INDICADORES BIOLÓGICOS PARA MONITORAÇÃO DE PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO

Ao utilizar-se esporos bacterianos como organismos indicadores, assume-se que sua cinética de destruição seja conhecida e reproduzível. As formas de analisar as informações fornecidas pelos monitores biológicos podem ser divididas em dois métodos básicos disponíveis: os IBs podem ser projetados para ser analisados pelo método de enumeração direta dos sobreviventes ou método de sobrevivência-morte - que incluem o método de análise da fração negativa ou análise da morte total.

- 1) No método de **contagem dos sobreviventes**, ou análise da **enumeração direta** avalia-se o número de esporos sobreviventes depois da aplicação do processo. Este é um método simples e direto em conceito. Para determinar o valor de esterilização de um processo, o número de células recuperadas após um ciclo de esterilização é determinado por contagem de colônias em placas. Este resultado do número de sobreviventes é relacionado com a curva de calibração da resistência do organismo indicador ao agente esterilizante utilizado. Nesta curva semilogarítmica, construída com o número de sobreviventes na ordenada versus o valor de esterilização do processo em minutos equivalentes à temperatura de calibração na abcissa, tem-se o padrão de morte estudado sob condições conhecidas e rigorosamente controladas. (PFLUG E SMITH, 1977; PFLUG, 1990)

- 2a) Na **análise quantal** ou da **fração negativa**, as replicatas dos IBs são expostas aos processos de esterilização, e são em seguida incubadas e analisadas para resultados positivos ou negativos para crescimento de sobreviventes. Existem três resultados

possíveis: todas replicatas positivas; todas negativas; ou resultados duvidosos onde ocorrem resultados positivos e resultados negativos. Neste último caso, os resultados podem ser analisados utilizando o procedimento de resposta quantal ou análise da fração negativa, e os resultados são comparados com processos padrão. O número dos sobreviventes pode ser também determinado a partir da fração negativa.

2b) **Análise da morte total.** Neste método, as replicatas dos IBs depois do processamento e incubação, não apresentam crescimento, indicando eficiência do processo, isto é, a carga está livre de contaminação. Porém este tipo de método não tem como informar quanto acima do projetado está o processo aplicado, ou seja não pode-se quantificar o processo pela análise de morte total.

As pequenas tiras ou discos de esporos bem como os IB auto-contidos são exemplos do uso de indicadores projetados para análise da morte total, ou fração negativa. PFLUG e SMITH, (1977) e COOPER (1985) sugerem que para obtenção de resultados confiáveis, os IBs devem ser utilizados com o método de análise para o qual foram projetados. IBs projetados para o método de ponto final, não devem ser empregados em métodos de redução de contagem, e vice-versa. A quantidade de informações geradas quando um sistema IBs é usado para determinar o número efetivo de sobreviventes através do método de redução de contagem, ou pela fração negativa, é muito maior do que a quantidade obtida quando se utiliza os métodos de ponto final, visando obter apenas informações sobre sobrevivência ou morte. (PFLUG e SMITH, 1977).

Na Fig.2 estão indicadas as áreas de medida em que se estendem cada método de acordo com o número de sobreviventes por unidade após exposição aos ciclos de esterilização. A análise por enumeração direta dos sobreviventes permite contagem de até 1 sobrevivente por unidade esterilizada. Já a faixa de medida biológica da análise da fração negativa se estende de 5 até 0,01 organismos por unidade, e abaixo deste valor, número de sobreviventes menor que 0,01 ou 0,001 é determinado somente pela análise da morte total. (PFLUG, 1990)

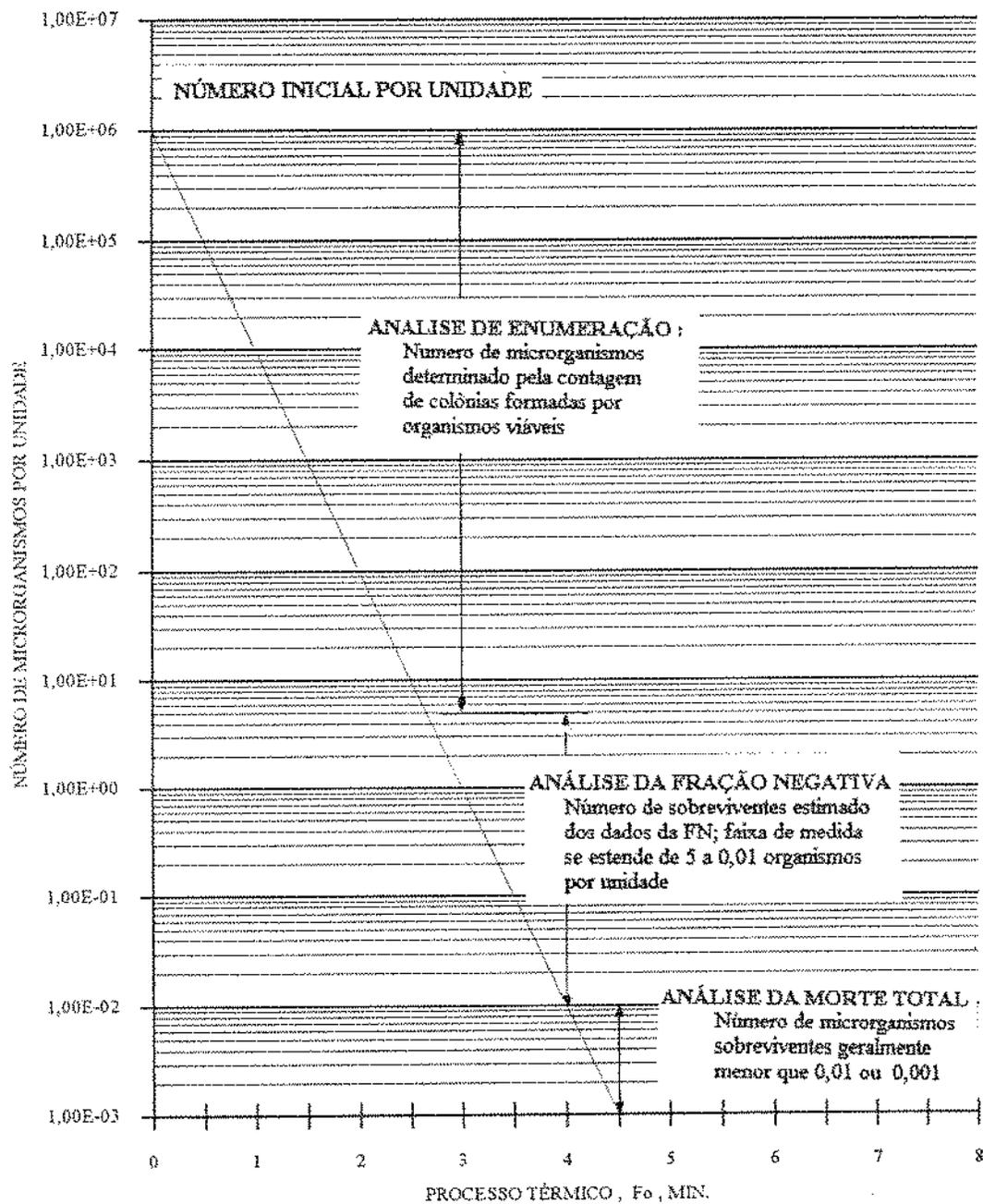


FIGURA 2 - Áreas de medida biológica em função do número de sobreviventes ao processo por unidade. (Fonte: PFLUG, 1990)

2.6. CALIBRAÇÃO DOS IBs

Os IBs representam um sistema de medição razoavelmente preciso e reproduzível quando são usados de forma adequada. A calibração da resistência de um organismo indicador que é parte de um sistema IB deve ser feita através de métodos padronizados para medir o efeito de uma certa dose de agente letal sobre os organismos indicadores em um dado conjunto de condições. Normalmente, temperatura, concentração de gases e umidade relativa, quantidade de radiação etc. são mantidas a um nível constante, enquanto que a dose é determinada pelo tempo de exposição. (PFLUG e SMITH, 1977; ODLAUG et alii, 1981; PFLUG e ODLAUG, 1986; SPICHER, 1988)

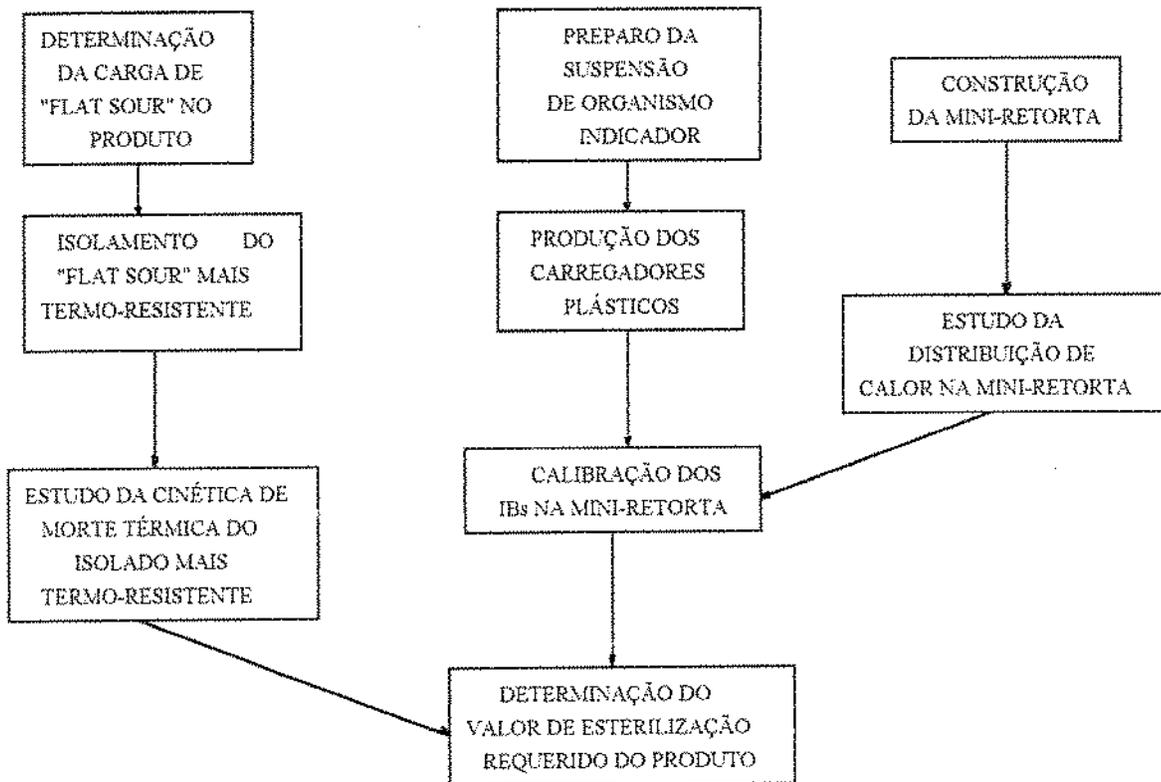
A calibração é feita para cada organismo indicador, e em cada condição de processo de esterilização. Para preparar-se uma curva de calibração, determina-se o número de sobreviventes por unidade após diferentes tempos de exposição ao agente esterilizante. São utilizadas em geral três replicas do sistema indicador a ser estudado, e cinco intervalos regulares de tempo de exposição). A curva é construída graficando-se o número de sobreviventes versus o tempo em minutos (U min. = minutos equivalentes à temperatura de calibração). (PFLUG e SMITH, 1977; ; MYERS & CHRAI, 1980; SPICHER, 1988; MACCORMICK, 1988, PFLUG, 1990).

Os testes de calibração devem ser realizados nas mesmas condições em que um determinado sistema será empregado como indicador (i.e., na mesma solução nutritiva, usando a mesma proteção, no mesmo teor de umidade relativa, etc.), de modo que o único parâmetro desconhecido seja a morte do organismo indicador como resposta ao processamento monitorado/validado. (PFLUG e SMITH, 1977; ODLAUG et alii, 1981; PFLUG e ODLAUG, 1986; SPICHER, 1988).

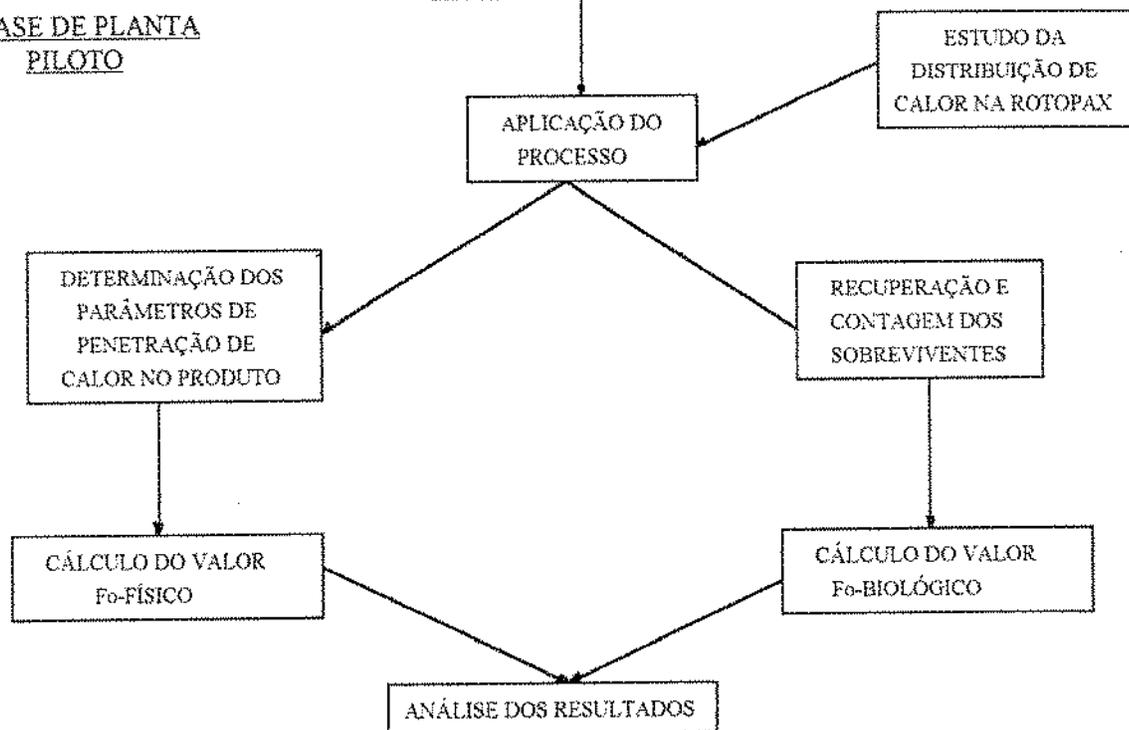
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. FLUXOGRAMA DO TRABALHO PRÁTICO

FASE DE LABORATÓRIO



FASE DE PLANTA PILOTO



3.2. MICRORGANISMO UTILIZADO

As suspensões de esporos produzidas foram obtidas a partir de uma cultura de células vegetativas de *Bacillus stearothermophilus*, derivado do ATCC 7953, existente no Laboratório de Termobacteriologia do Departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

3.3. ALIMENTO UTILIZADO

Para realização deste trabalho foi escolhido como alimento teste purê de cenouras diluído (50%). No preparo do purê foram utilizadas cenouras frescas (*Daucus Carota* L. variedade Imperatur), adquiridas na região de Campinas.

3.3.1. Preparo do purê de cenoura diluído.

Após lavagem das cenouras e retirada dos pedúnculos, as cascas foram raspadas por abrasão e as cenouras cortadas em cubos de aproximadamente 1,0 cm³. Os cubos foram branqueados com vapor, à pressão atmosférica, por 15 minutos. Em seguida foram transferidos ainda quentes para moinho coloidal (METEOR Ind. Bras., Mod. REX-1-AL) e homogeneizados até obtenção de purê liso (três passagens consecutivas). (LOPEZ, 1987; KALPALATHIKA et alii, 1988). O purê pronto foi armazenado em freezer, acondicionado em sacos plásticos com capacidade para 2,75 Kg. Doze horas antes de ser utilizado, quantidade suficiente de purê para preparo de cada batelada foi retirado do freezer e descongelado em geladeira.

3.3.2. Envase do purê

Para o processamento, o purê foi envasado em latas (volume nominal 500 g) de folha de flandres, revestidas com verniz F, com as seguintes dimensões: 73,0 mm diâmetro interno (D.I.) x 91,0 mm altura interna, fabricadas pela Rheem Ind. Metalúrgica Ltda, SP.

O purê foi utilizado nos ensaios na forma diluída com água 50% (1:1), para tanto, as latas foram preenchidas primeiro com purê puro (167,0 g), e em seguida com igual quantidade de água para formação do purê diluído. O conteúdo foi agitado manualmente com bagueta de vidro, e em seguida as latas foram recravadas à vácuo (10 polegadas de Hg). O volume final de purê em cada lata (334,0g) foi calculado para deixar 10% de espaço livre. Todo o procedimento de enchimento foi feito à temperatura ambiente. (pH final do purê diluído $5,3 \pm 0,1$). A temperatura inicial do produto utilizada nos processos foi $30,0^{\circ}\text{C}$, assim, uma vez recravadas, as latas foram mantidas em estufa à $30,0^{\circ}\text{C}$ até estabilização à esta temperatura.

3.4. PREPARO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DE *Bacillus stearothermophilus*.

Foram preparados três lotes de esporos desde o início do trabalho. A primeira suspensão (denominada **Série I**) foi produzida conforme metodologia descrita em PFLUG (1990), utilizando-se como meio de esporulação ágar nutriente fabricado pela Biobrás, suplementado com 5,0 ppm de Sulfato de manganês, Merck. Foi produzida a suspensão em duas fases:

Fase 1. Produção da suspensão de pré-esporulação: foi dado um choque térmico (15 min. a $100,0^{\circ}\text{C}$, seguido de banho de gelo) em 5,0 ml de uma suspensão de esporos de *B. stearothermophilus*, (derivado do ATCC 7953) em concentração de aproximadamente 10^7 ; foram preparados 20 tubos de ensaio de rosca (25,0 mm D.E. x 150,0 mm h), contendo 20,0 ml de meio de esporulação, e cada tubo foi inoculado com 0,1 ml desta suspensão; os tubos foram deixados com as tampas abertas por 20 minutos na câmara de fluxo laminar para garantir secagem e adesão do inóculo na superfície do ágar; os tubos foram incubados em pé, por 48 h/ $55,0^{\circ}\text{C}$; antes da coleta dos esporos, o condensado foi colhido do fundo dos tubos com pipetas de 1,0 ml estéreis, com cuidado para não prejudicar o crescimento na superfície do ágar; o crescimento foi lavado da superfície do ágar com 2,0 ml de água estéril tentando soltá-lo cuidadosamente com alça de platina e transferindo todo o volume dos 20 tubos para um único tubo de rosca estéril.

Fase 2. Produção da suspensão de esporulação: após aplicação de um choque térmico na suspensão de pré-esporulação (15 min. a $100,0^{\circ}\text{C}$, seguido de banho de gelo,

PFLUG,1990),0,2 ml foi inoculado em placas de Petri contendo 30,0 ml do mesmo meio de esporulação; o inóculo foi espalhado com uma espátula de Drigalsky; uma vez seco o inóculo, as placas foram incubadas invertidas em dessecador por 48h/55° C; o exame microscópico destas placas indicava mais de 20% de esporulação, o que segundo o método, é a condição satisfatória para coleta dos esporos. O crescimento foi lavado com 2,0 ml de água estéril e soltado da superfície do ágar com auxílio de uma alça de Drigalski; o volume foi coletado diretamente em tubos de centrifuga estéreis e os resíduos de meio de cultura, bem como as células vegetativas, foram retirados da suspensão através de 4 centrifugações sucessivas (20 min, 3500 rpm, 4,0 ° C), e uma ultrasonificação (3 min). Os esporos foram finalmente re-suspensos em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015 M, pH 7,2), e estocados sob refrigeração (4,0 ° C).

Na produção de indicadores biológicos é importante utilizar esporos com alta resistência térmica, assim, durante o desenvolvimento do estudo, e com o objetivo de testar a possibilidade de haver diferença na resistência térmica dos esporos ocasionada pela utilização de meio de esporulação com mesma composição química, porém de fabricantes diferentes, foi utilizado ágar nutriente Biobrás e ágar nutriente Difco, suplementado com 5,0 ppm de sulfato de manganês Q&M para produzir mais dois lotes de esporos.

Foram produzidos portanto, um lote de esporos utilizando-se ágar nutriente Difco (denominado **Série II**) e um lote utilizando-se ágar nutriente Biobrás (denominado **Série III**), suplementado com 5 ppm de MnSO₄, conforme metodologia descrita para série I (PFLUG,1990). Uma vez que os esporos da série I apresentaram resistência térmica menor que a desejável para indicadores biológicos (ver resultados e discussão, item 4.1.2) decidiu-se , além de testar dois fabricantes do meio de cultura, elevar a temperatura de incubação das placas nas fases de pré-esporulação e esporulação (dos dois lotes de esporos) para 57,0° C, pois é conhecido que esporos produzidos em temperaturas mais elevadas que a temperatura ótima de crescimento possuem resistência térmica maior. (STUMBO, 1973; GRAHAM, 1986).

Outra modificação na metodologia foi o número de centrifugações para limpeza das suspensões. GORMAN et alii, (1985) sugerem que a presença de resíduos de células vegetativas e meio de cultura na suspensão de esporos pode afetar a resistência da mesma ao longo do tempo. Foram então realizadas 9 centrifugações sucessivas das suspensões (3500 rpm por 20,0 min.), e um procedimento de ultrasonificação (3,0 min.) até

observação microscópica da presença do mínimo possível de células vegetativas nas suspensões. Em seguida os esporos coletados foram re-suspensos em tampão fosfato de Butterfield (50X; 0,015 M) e estocados a 4,0° C. (ver composição de meios de cultura e soluções tampão em Apêndice 1)

3.4.1. Quantificação das suspensões

A quantificação da suspensão foi feita de acordo com metodologia para contagem de colônias em placa descrita em SWANSON et alii (1992). Foi feita uma ativação da suspensão de esporos antes da subcultura para contagem, (15 min. em água fervendo seguido de banho de gelo). Foi utilizado como meio para recuperação e contagem, ágar de soja tríptica (TSA, Difco, 30 ml/placa), com incubação de 48h/55,0° C.

3.4.2. Determinação da resistência térmica dos lotes de esporos em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015M, pH 7,2) em banho de óleo

Para a Série I de esporos de *B. stearothermophilus*, a resistência térmica foi determinada somente em mini-retorta, à temperatura de 121,0° C, com tempos variando de 120 a 230 segundos. Neste estudo os carregadores foram preenchidos com 0,25 ml de suspensão de esporos.

Para as Séries II e III, foi utilizado o método de tubo TDT (tempo de morte térmica) em banho de óleo termostaticado a 121,0°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) (Banho Precision Scientific, Mod 16-AB-3), por tempos de estudo reais de 0; 3,5; 5,5; 7,5; e 9,5 min., (descontando-se o tempo de atraso térmico do tubo TDT, igual a 2,0 min.). Foram depositados assepticamente 1,0 ml das suspensões de esporos no interior de tubos TDT (7,0 mm D.I x 9,0 mm D.E, 80,0 mm altura); em seguida os tubos foram selados em maçarico; os tubos foram devidamente identificados e em cada tempo de estudo foram retiradas dois tubos de cada suspensão; os tubos foram imediatamente transferidos para banho de gelo e depois de limpos, foram iniciados os procedimentos de subcultura para contagem de sobreviventes; como meio de recuperação e contagem foi utilizado TSA, (Difco, 30 ml/placa); as placas foram incubadas por 48 h a 55,0° C. (STUMBO, 1973; PFLUG, 1990)

3.5. PRODUÇÃO DOS CARREGADORES PLÁSTICOS E PREPARO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS

O modelo de carregador produzido para uso neste trabalho é semelhante ao descrito por PFLUG, 1976. A Fig. 3 mostra um esquema do dispositivo montado na tampa de uma lata conforme utilizado. O dispositivo (1), foi fabricado em Nylon 6,6 (Rhodia), pela Indaco Ind. e Com. Ltda. (SP), com dimensões 70,0 mm h e 6,0 mm D.E., tendo a cavidade para depósito da suspensão de esporos 40,0 mm h x 3,0 mm D.I. (2). O parafuso rosqueado na extremidade que abriga a suspensão (3), possui as seguintes dimensões: cabeça (3a) - 4,0 mm h x 6,0 mm D.E., e rosca (3b) - 6,0 mm h x 3,0 mm D.E.. Um anel tipo "O"-ring (4) de Teflon (6,0 mm D.E. x 4,0 mm D.I. x 1,0 mm espessura) auxilia a vedação da cavidade. As dimensões dos IBs foram selecionadas para que a suspensão de esporos ficasse no ponto frio de latas 73,0 D.I. x 91,0 mm altura interna, uma vez que este tipo de carregadores pode ser produzido com dimensões e características que se adaptem ao recipiente a ser utilizado nos processos de esterilização que se deseja monitorar biologicamente.

Neste estudo os carregadores foram encaixados perfeitamente, pela extremidade superior, em conectores metálicos "C9" (5) para termopares (Ecklund-Harrison Inc.) adaptados nas tampas superiores das latas (6). O ajuste perfeito do bastão ao conector permitiu que estes ficassem firmemente posicionados dentro do recipientes (após enchimento e recravação com o produto) durante a aplicação do processo térmico.

3.5.1. Enchimento dos IBs

O procedimento de enchimento/inoculação dos IBs consistiu na deposição do volume desejado da suspensão de esporos no interior dos bastões com seringa de vidro estéril (seringa de tuberculina, 1,0 cc), seguido pelo rosqueamento firme da tampa

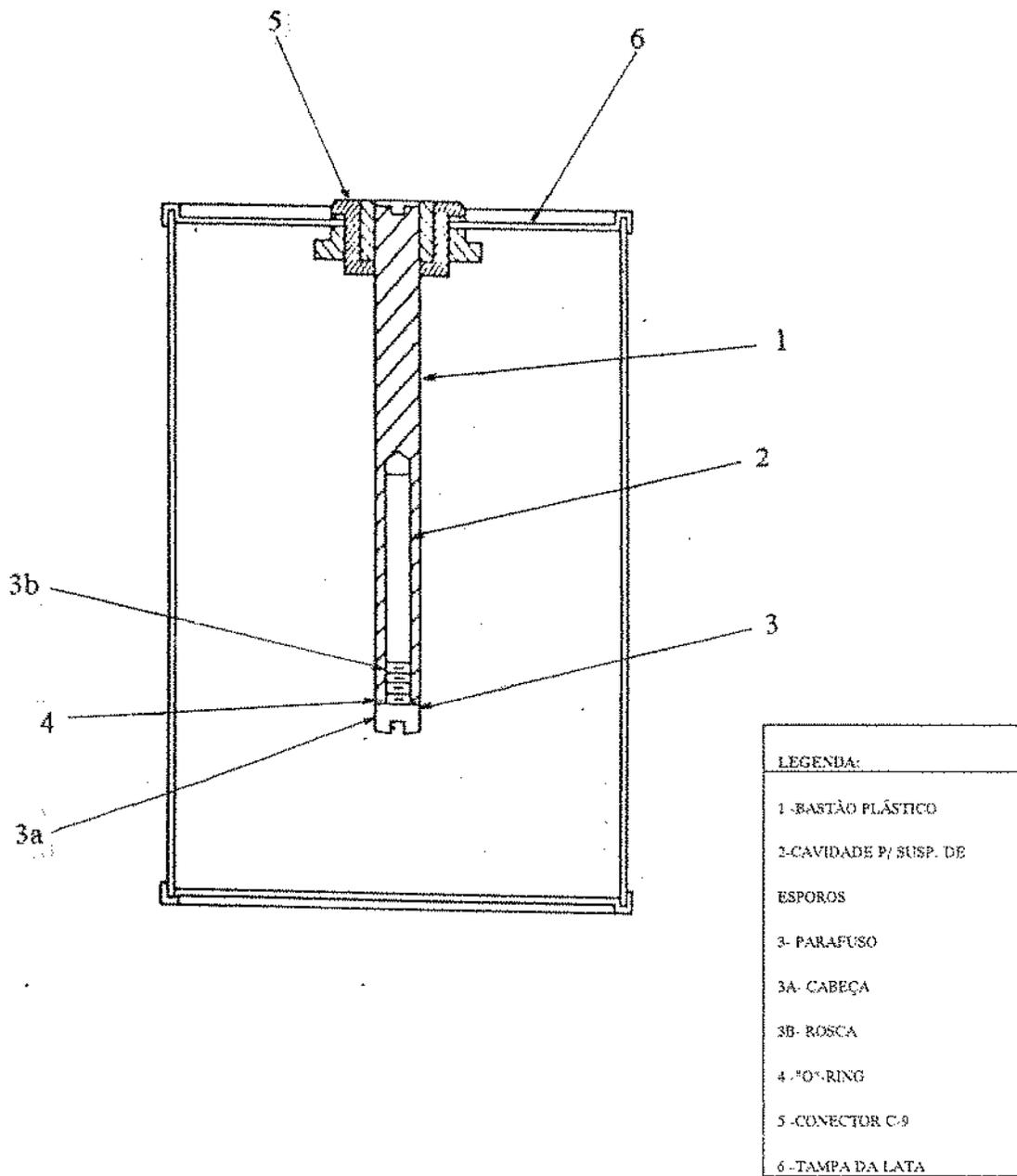


FIGURA 3 - Montagem ilustrativa do indicador biológico acoplado à lata pela tampa

para fechamento. Todo este procedimento, foi feito em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Uma vez preenchidos, os IBs foram mantidos sob refrigeração (4,0 °C) até o momento de uso.

Os carregadores preparados para os primeiros estudos de determinação do atraso térmico, foram preenchidos com 0,25 a 0,28 ml da suspensão de esporos (produzida conforme item 3.4). Este volume foi utilizado por medidas de segurança para evitar vazamento e contaminação com a suspensão nas extremidades do carregador e/ou possível perda de inóculo.

Durante o estudo de distribuição de temperatura na mini-retorta, observou-se que o espaço livre deixado no bastão provocava um efeito de sobre aquecimento do sistema, desenvolvendo no interior do carregador temperatura em torno de 0,3°C a 0,5° C acima da temperatura interna da mini-retorta (ver resultados e discussão itens 4.2.2. e 4.2.3). Decidiu-se então na seqüência do estudo, por eliminar o espaço livre residual e preencher os carregadores com 0,3 ml da suspensão de esporos, ocupando totalmente a cavidade do bastão.

3.6. PROJETO E CONSTRUÇÃO DA MINI-RETORTA

3.6.1. Construção da mini-retorta

Levando-se em consideração que todo sistema IB para ciclos de esterilização à vapor deve ser calibrado em resistômetros de aquecimento quase imediato, uma mini-retorta (MR) foi projetada e construída para utilização neste projeto. A mesma consiste de uma câmara de vapor construída em aço inox AISI 316 (100,0 mm D.I. x 220,0 mm h x 5,0 mm de espessura) isolada termicamente com lã de vidro e alumínio corrugado em todo seu corpo, acoplada a um tanque pulmão de vapor.

A Fig.4 apresenta um esquema do sistema de mini-retorta /tanque pulmão construído e utilizado. Uma autoclave vertical DIXIE (1) com capacidade para 300 l, controlada por programador Taylor (controlador e registrador de pressão e temperatura, Mod.420 A), existente na planta piloto da FEA-UNICAMP, foi adaptada para funcionar como tanque

pulmão para alimentação de vapor para a MR (5). Esta adaptação foi feita visando garantir o enchimento rápido da MR; obtenção quase instantânea da temperatura de ajuste no interior da câmara; e um controle adequadamente rígido das condições de pressão e temperatura dentro da câmara. Estas medidas foram tomadas para que o equipamento atendesse às exigências de atuação de câmaras/resistômetros para avaliação da resistência térmica de indicadores biológicos (AAMI,1982; USP XXIII,1995).

A linha de entrada de vapor para a MR foi isolada termicamente e nela foi instalado um manômetro (2), e uma válvula de esfera (1") para entrada de vapor para a MR (3). No fundo da MR foi derivada uma linha utilizada como dreno (1/2") (4). A tampa (100,00 D.I. x 5,0 mm espessura) foi projetada para obter fechamento rápido do sistema. Foi construído um suporte metálico especial para disposição dos carregadores plásticos no interior da câmara (à 25,0 mm do fundo) durante a exposição ao vapor. À tampa foi adaptado um encaixe para o suporte removível, de modo que uma vez terminada a exposição ao calor, com um único movimento, a tampa e os indicadores pudessem ser retirados da MR e transferidos para banho de gelo, para esfriamento imediato. À tampa foi soldado um "T" de 1/4" de onde derivam uma saída de 1/8" para entrada de termopares (6), e uma saída de 1/4" onde foi rosqueada uma válvula globo (1/4") para desaeração da câmara (7). A MR foi também equipada com um termômetro de mercúrio tipo capela (8) (Automax, Sistemas de Medição e Controle Ltda, faixa de 95,0 a 130,0° C, divisão 0,5 /0,5° C). O bulbo do termômetro foi fixo no corpo da MR, de modo a ficar localizado à 110,0 mm do fundo da câmara.

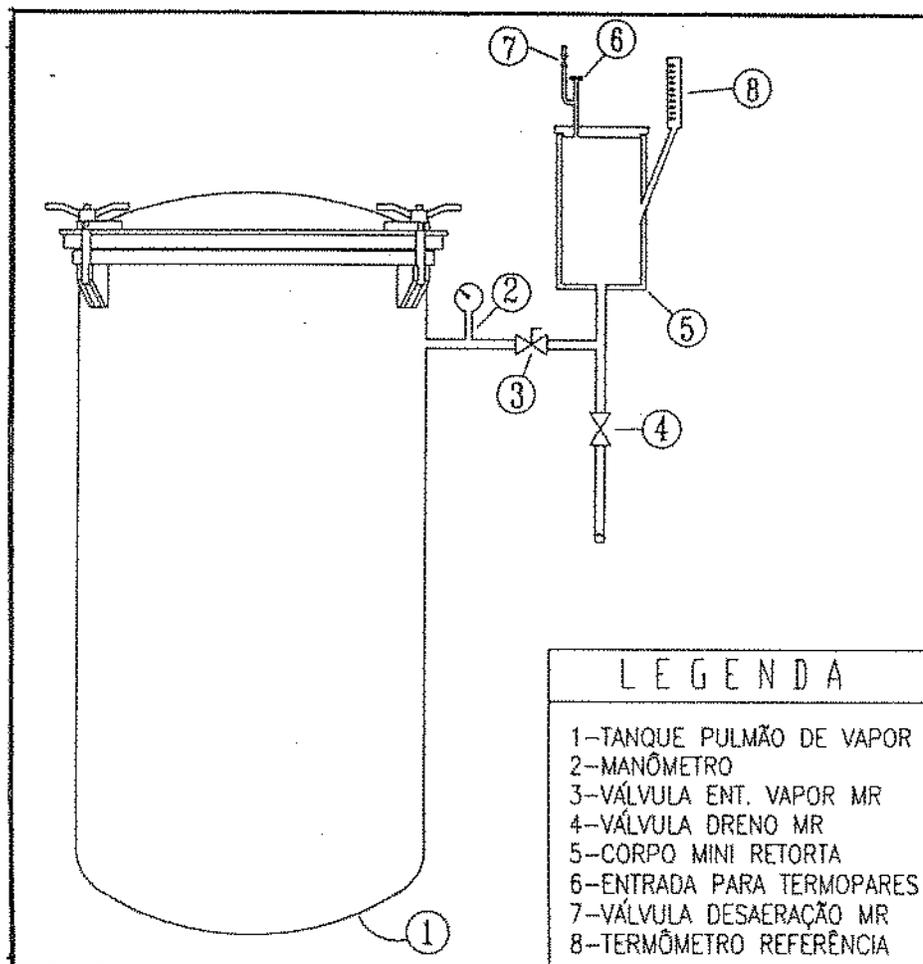


FIGURA 4 - Esquema geral da mini-retorta acoplada à autoclave Dixie

A MR foi projetada para ter funcionamento e operação semelhante à mini-retortas TDT (Thermal Death Time) descritas e utilizadas por alguns autores, (SCHMIDT et alii, 1955; NCA, 1968; LOPEZ, 1987; PFLUG, 1990). As retortas TDT são utilizadas na determinação da resistência térmica dos microrganismos alvos de processamento térmico de alimentos pastosos. Uma vez que se encontra dificuldade de utilização de tubos TDT para produtos pastosos ou altamente viscosos, estes são acondicionados em latas TDT com dimensões especiais para adaptação às retortas TDT.

A MR utilizada neste trabalho foi construída pela Metalúrgica Harmonia, Limeira, SP, com base no projeto desenvolvido por nós seguindo modelos de retorta TDT descritos anteriormente por NCA, (1968), LOPEZ (1987), e PFLUG (1990). Seguiu-se também as orientações da AAMI (1982) para atuação de resistômetros utilizados para determinação da resistência térmica de indicadores biológicos. O projeto também contou com sugestões e orientações dos professores: Prof. Dr. Antony Lopez, em correspondência pessoal, 1991, Prof. Dr. Irving. John Pflug, em comunicação pessoal, 1992, e Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali, em comunicação pessoal 1992.

3.6.2. Determinação do tempo de subida e método de desaeração da mini-retorta

Os primeiros estudos com a MR consistiram em determinar qual o melhor sistema de fechamento da válvula de desaeração para que se pudesse obter, no interior da câmara, temperatura igual à de ajuste da autoclave Dixie quase instantaneamente. Foram então, testadas duas diferentes porcentagens de fechamento da válvula até a última volta, após injeção de vapor na câmara. Estes ensaios foram feitos à temperatura de 121,0° C, uma vez que nesta temperatura conseguiu-se o melhor controle e ajuste do tanque pulmão. Com a válvula de desaeração totalmente aberta, foi permitida entrada de vapor na câmara, e após 5,0 seg. (foram testados também os tempos de 7,0 e 10,0 seg.), a válvula de desaeração foi fechada até 1/4 e 1/8 da última volta. Foi então determinada a melhor combinação capaz de produzir o menor tempo de subida da MR (CUT) para ser utilizado nos ensaios posteriores.

Para acompanhar a temperatura no interior da câmara, foram posicionados 3 termopares flexíveis, fixos no suporte metálico para IBs no eixo central da câmara, à 50,0 mm da lateral e 25,0; 55,0; e 110,0 mm do fundo da câmara:

3.6.3. Estudo da distribuição de calor na mini-retorta

Os ensaios de distribuição de calor dentro da mini-retorta foram realizados em três replicatas, às temperaturas de 115,0, 121,0 e 123,0 °C, por tempos programados de 15,0, 10,0 e 8,0 minutos respectivamente (medidos após tempo de subida).

No interior da câmara da MR foram distribuídos e fixos, 7 termopares flexíveis (fio Omega TT-T-36, calibrados conforme norma ASTM E220-86, 1987) nas seguintes posições (ver também Fig. 5):

TABELA 1. DISPOSIÇÃO DOS TERMOPARES NA MINI-RETORTA PARA ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE CALOR

POSIÇÃO DO TERMOPAR	DISTÂNCIA DO FUNDO DA MR	DISTÂNCIA DO EIXO LONGITUDINAL DA MR
P1	5,0 mm	0,0 mm
P2	25,0 mm	0,0 mm
P3	110,0 mm	0,0 mm
P4	25,0 mm	25,0 mm
P5	25,0 mm	50,0 mm
P6	190,0 mm	0,0 mm
P7	110,0 mm	50,0 mm

LEGENDA

MR = MINI-RETORTA

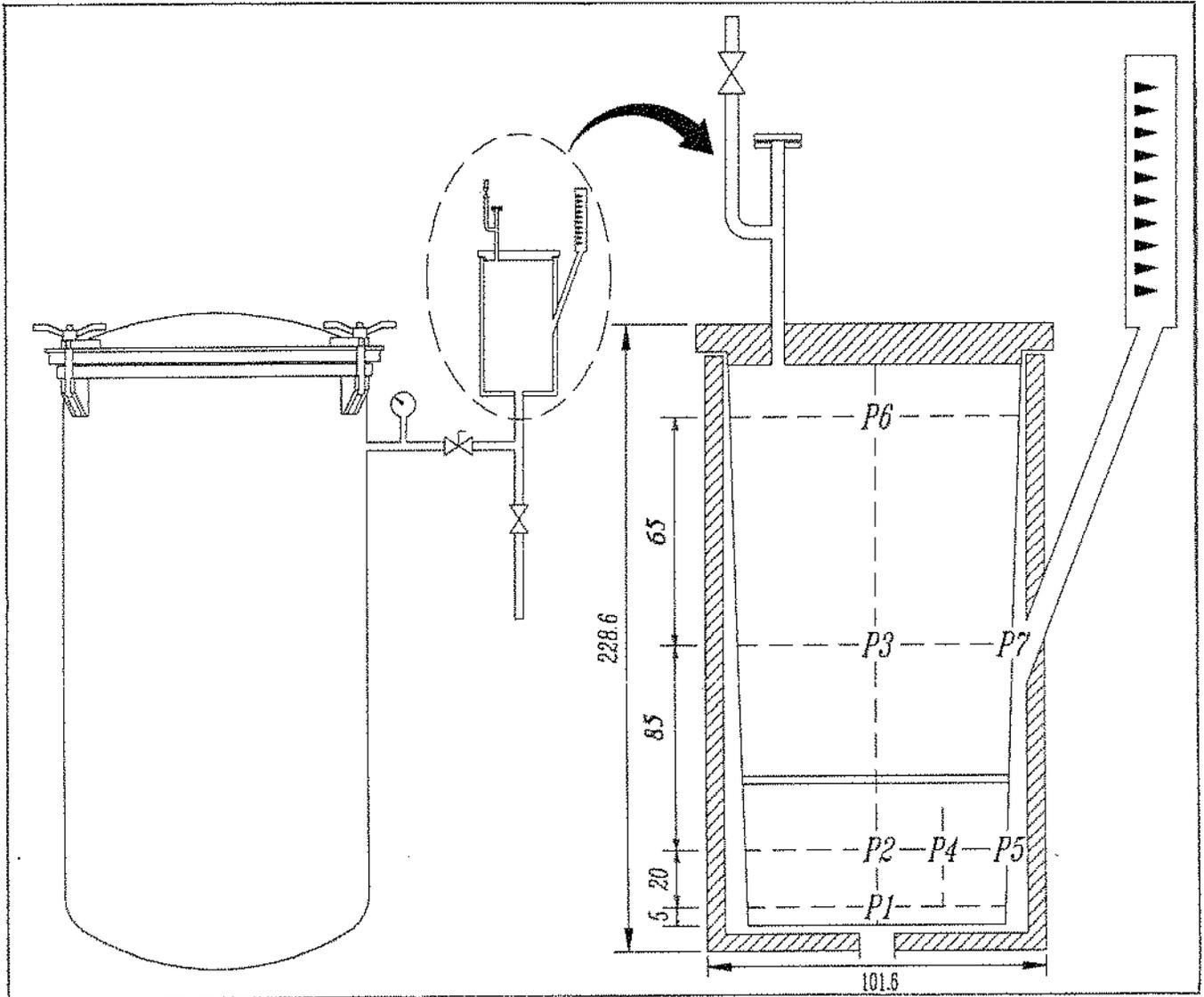


FIGURA 5 - Detalhe da disposição dos termopares flexíveis no interior da mini-retorta para estudo da distribuição de calor

O termopar 7 foi posicionado especialmente no ponto mais próximo possível do bulbo do termômetro de mercúrio da câmara para observar-se diferenças em relação ao termômetro.

Estes estudos foram acompanhados por 3 IBs equipados com termopares flexíveis Omega (T-TT-36, previamente calibrados conforme norma ASTM E220-86, 1987) inseridos na cavidade dos carregadores posicionando-se a junta de medida no centro da região onde se localiza a suspensão de esporos. O parafuso de fechamento foi cuidadosamente apertado, tomando-se o cuidado para não danificar os termopares e não permitir vazamento da suspensão. Estes IBs foram posicionados na região central do suporte à 25,0 mm do fundo da câmara da MR de modo a simular a mesma situação dos IBs nos ensaios de calibração.

3.6.3.1. Coleta e tratamento dos dados de distribuição de calor

Os dados fornecidos pelos termopares foram captados com frequência de 15 segundos através de um aquisitor de dados Doric (Mod. 245A - Beckman Industrial Inc., precisão de 0,1°C) e conectados a um micro-computador PC-XT mediante emulador ST240. Ao final de cada experimento, todos os dados coletados foram corrigidos para as equações de calibração dos termopares, e foi feito o cálculo das temperaturas médias por posição na mini-retorta, e por tempo, utilizando-se os valores obtidos a partir do momento em que todos termopares apresentaram leitura igual ou superior à programada para o ensaio. Estes valores foram graficados e tabulados para viabilizar o estudo da uniformidade de distribuição e estabilidade da temperatura ao longo da câmara da mini-retorta.

Os resultados foram estudados tendo como objetivos 1) encontrar o ponto mais frio da câmara, 2) observar existência de homogeneidade de distribuição de calor na câmara; e 3) conhecer o tempo de subida da mini-retorta para cada uma das temperaturas de estudo.

3.7. ESTUDO DOS IBs NA MINI-RETORTA

3.7.1. Determinação do fator de atraso térmico dos IBs

Foram realizados estudos para conhecer fator de atraso térmico dos carregadores já inoculados com suspensão de *B. stearothermophilus* preparada e estocada conforme descrito no item 3.4.

Três IBs foram equipados com termopares flexíveis (Omega T-TT-36) conforme descrito no item 3.6.3, e em seguida preenchidos com 0,25 ml de suspensão de esporos nos primeiros ensaios, e com 0,30 ml da suspensão de esporos nos ensaios subsequentes. Estes IBs foram posicionados no suporte removível à 25,0 mm do fundo da MR. Mediu-se em seguida, o tempo necessário para que os IBs atingissem as temperaturas de 115,0, 121,0, e 123,0° C . Cada ensaio foi realizado com três replicatas. Para cada replicata foram calculadas as médias das temperaturas obtidas nos três carregadores a partir do momento que estes atingiram temperatura de trabalho. Os dados de tempo e temperatura foram coletados conforme descrito no item 3.6.3.1, com frequência de 5 segundos.

3.7.2. Determinação da resistência térmica dos IBs em mini-retorta

Para o estudo da cinética de destruição térmica dos esporos nos carregadores foram realizados ensaios de determinação do valor-D dos IBs em MR. As temperaturas e tempo de estudo foram:

TABELA 2. CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DE ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DO VALOR-D DOS ESPOROS DE *B.stearothermophilus* NOS IBs EM MR.

TEMPERATURA DE ESTUDO (°C)	TEMPO DE AQUECIMENTO ¹ (MIN)
115	0,0, 5,0, 15,0, 25,0, 35,0, 45,0
118	0,0, 8,0, 12,0, 18,0, 24,0
121	0,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0,14,0
123	0,0, 2,0, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0

1-MEDIDO APÓS DEDUÇÃO DO TEMPO DE ATRASO TERMICO



Foram preparados IBs conforme item 3.5.1 (com 0,3 ml de suspensão de esporos **Série II** e estocados em geladeira por um período mínimo de 2 semanas. Para cada tempo de estudo, foram utilizados dois IBs que foram retirados da geladeira antes do ensaio e agitados por 20 s em agitador automático (Vortex Mixer). Terminado o tempo de estudo os IBs foram retirados imediatamente da MR e transferidos para banho de gelo. Em seguida foram iniciados os procedimentos de recuperação dos sobreviventes. Após agitação dos IBs por 20 segundos, cada unidade foi aberta em câmara de fluxo laminar, e o volume de suspensão de seu interior foi depositado em placa de Petri estéril (50,0 mm x 20,0 mm). Com um micropipetador automático (Micro Pipetor, Eletrapette, Cole Parmer Mod. 7004) foi retirado uma alíquota de 0,1 ml da suspensão e transferida para 9,9 ml de água para diluição decimal subsequente até a necessária para plaqueamento. Foi utilizado TSA, (Difco) como meio de recuperação e contagem de sobreviventes, e as placas foram incubadas por 48 h a 55,0° C. Com as contagens obtidas as curvas de sobreviventes foram construídas e o índice de redução decimal (valor-D) para cada temperatura estabelecido mediante regressão linear.

Com os resultados obtidos de valor-D, foi construída a curva "fantasma" de morte térmica para determinação do valor-z dos IBs.

3.7.3. Ensaio de calibração dos IBs

Nesta etapa, os IBs foram assépticamente preenchidos com 0,3 ml da suspensão de esporos **Série II** (preparada com ágar nutriente Difco, conforme descrito no item 3.4), e estocados sob refrigeração (4,0 °C) até o momento do uso.

O tempo de exposição dos IBs às duas temperaturas de estudo estão descritos na Tab. 3 abaixo. Nestes tempos, já foi subtraído o atraso térmico das unidades (2,5 min, conforme determinado no item 3.7.1).

TABELA 3. CONDIÇÕES DOS ESTUDOS DE CALIBRAÇÃO DOS IBs

TEMPERATURA DE ESTUDO (°C)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (MIN)
121,0 ± 0,2	3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0; 14,0
123,0 ± 0,2	2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0

Terminado o aquecimento, os IBs foram rapidamente resfriados transferindo-se o suporte metálico para banho de gelo . Foram realizadas quatro replicatas de cada ensaio de calibração. Para cada replicata, dois IBs selecionados ao acaso, não aquecidos em MR, foram avaliados após choque térmico (15 minutos em água fervendo seguido de banho de gelo) para determinação do número inicial de esporos por unidade. Após os tratamentos de aquecimento e esfriamento, os IBs foram agitados por 20 segundos. Em câmara de fluxo laminar, a suspensão foi retirada do interior do IB e depositada em placa de Petri estéril, e com auxílio de um micropipetador automático (Micro Pipetor, Eletrapette, Cole Parmer Mod.7004) foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e depositadas em tubos de diluição para plaqueamento em profundidade e contagem dos sobreviventes aos diferentes tempos de exposição às temperaturas estudadas. Para cada diluição, foram preparadas placas em duplicata contendo aproximadamente 30,0 ml de TSA,(Difco). As placas foram incubadas à 55,0° C por 48 horas e realizada a contagem expressa em UFC. Para o cálculo do número de sobreviventes, foi utilizada a média de cada 2 IBs expostos a cada tempo, e para cada teste foi construída uma curva encontrando-se o polinômio de segunda ordem que melhor se ajustou aos dados experimentais utilizando o pacote SAS (1985) procedimento GLM. Para construção dos gráficos semi-logarítmicos de calibração, foram plotados o número de sobreviventes por IB na ordenada, em função do tempo de exposição à temperatura de aquecimento na abcissa. (PFLUG et alii, 1980a,b; 1992)

3.8. ESTUDO DA CARGA TERMOFÍLICA NO ALIMENTO TESTE

3.8.1. Determinação da biocarga de termófilos totais e produtores de acidez plana em cenoura fresca e em purê de cenoura

Foram coletadas um total de 5 amostras de **cenouras frescas** (Daucus Carota L. variedade Imperatur). As amostras coletadas foram analisadas para determinação de organismos termófilos esporulados conforme metodologia descrita em OLSON & SORRELS (1992).

Para avaliação de termófilos na matéria prima, foi considerada contagem apenas na superfície, sem trituração das amostras. (LEITÃO et alii, 1983; CERNY et alii 1991). Cada amostra foi pesada, identificada, e seu peso anotado. Com pinças e estiletes estéreis as amostras foram cortadas e os pedaços colocados em frascos erlenmeyer (previamente tarados) até atingir peso de 25,0 g. Em seguida foi adicionado igual volume de solução salina peptonada estéril. Os erlenmeyers tampados foram agitados manualmente por cinco minutos. De cada frasco contendo uma amostra de cenoura, foram coletados 20,0 ml e transferidos para erlenmeyer estéril (vol. 250,0 ml) sendo em seguida o volume completado até marca prévia de 100,0 ml com água destilada estéril.

Para a análise do **purê de cenoura**, nesta fase foram coletados 20,0 ml do purê diluído e transferidos para erlenmeyer, completando-se o volume até 100,0 ml conforme descrito acima.

Para choque térmico dos organismos termófilos esporulados, os frascos foram colocados diretamente no fogo até fervura da amostra, e mantidos em fervura por cinco minutos. Em seguida, os frascos foram então transferidos para banho de gelo e esfriados até o conteúdo atingir temperatura ambiente. De cada amostra foram retiradas 5 alíquotas de 2,0 ml e depositadas em 5 placas de Petri estéreis, e foi adicionado aproximadamente 30,0 ml de ágar dextrose triptona (DTA, Difco) em cada placa. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi feita após a incubação das placas à 55,0 °C por 48 h.

3.8.1.1. Cálculo das contagens

As colônias de termófilos produtores de acidez plana (flat sour termofílico) formam halos amarelos com centro marrom em DTA. A contagem das cinco placas reflete o total em 2,0

g de produto. A soma das contagens das 5 placas deve ser multiplicada por 5 para expressar-se o resultado em total de UFCs por 10,0 g de produto. A partir das placas foram coletadas com agulha as colônias com características típicas de "flat-sour" termofílico e transferidas para tubos com 10,0 ml de ágar nutriente 2%, e incubados à 65,0° C. Isto foi feito para isolamento de organismos suspeitos de *B. stearothermophilus*.

Nos isolados que apresentaram crescimento vegetativo à 65,0 °C no período de 48 horas foram feitos os testes de catalase, crescimento em anaerobiose e teste de Voges Proskauer (VP) à 55,0° C para confirmar a suspeita de *B. stearothermophilus* (Gallo 1986; FIELDS, 1970). Os isolados que apresentaram resultados negativos para estes três testes foram selecionados para a fase seguinte, sendo que o teste de catalase pode ser positivo ou negativo uma vez que esta espécie é catalase variável.

A contagem dos termófilos totais se refere à todas colônias que apresentaram crescimento nas placas de DTA após incubação à 55,0°C. O cálculo foi feito para cada 10,0 g de produto conforme indicado acima.

3.8.2. Seleção do isolado termófilo produtor de acidez plana mais termo -resistente

A partir das amostras de cenoura fresca foram preparadas e quantificadas suspensões de esporos de 13 isolados com crescimento positivo à 65,0° C. Foi utilizada a mesma metodologia de PFLUG, 1990, descrita no item 3.4. As suspensões de esporos em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015 M, pH 7,2) foram mantidas sob refrigeração.

Para este estudo, o número inicial de esporos/ml de suspensão foi igualado para todas suspensões (aproximadamente $1,0 \times 10^6$). Em ampolas TDT estéreis (7,0 mm D.I. x 9,0 mm D.E. x 100,0 mm l), foram depositadas assepticamente 2,0 ml de cada suspensão de esporos. Após enchimento, as ampolas foram seladas em maçarico e mantidas em refrigeração (4,0° C) até o momento do uso. Em banho de óleo termostatizado (Precision Scientific Mod 16-AB-3 precisão $\pm 0,5$ °C) regulado para as temperaturas de estudo, as ampolas devidamente identificadas foram submergidas e expostas pelos tempos de estudo selecionados, (conforme Tab.4), e em seguida retiradas com pinça e transferidas para

banho de gelo até temperatura ambiente. Para recuperação dos sobreviventes, cada ampola foi agitada por 20 s em agitador Vortex Mixer, limpa e aberta em câmara de fluxo laminar com auxílio de uma vódea. O conteúdo foi transferido para tubo contendo 8,0 ml de caldo de soja tríptica (TSB , Difco). Os tubos devidamente identificados foram agitados e incubados por 48 h à 55,0° C. Considerou-se crescimento positivo, os tubos que apresentaram turvamento do meio e formação de precipitado no fundo dentro do período programado de incubação.

TABELA 4. TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E TEMPERATURAS DE ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DO ISOLADO PRODUTOR DE ACIDEZ PLANA MAIS TERMO-RESISTENTE

TEMPERATURA (C)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (MIN)
117,0 ±0,5	50; 70
119,0 ± 0,5	10; 15; 20
120 ,0 ± 0,5	5; 10; 15

O isolado que sobreviveu aos choques foi considerado o mais termo-resistente da flora natural de cenoura. Quando o último tempo de exposição à uma temperatura de estudo não teve sobreviventes, todos os isolados que apresentaram crescimento no tempo anterior, foram expostos ao primeiro tempo da próxima temperatura estudada.

3.8.3. Determinação da resistência térmica do isolado produtor de acidez plana mais termo-resistente em purê de cenoura

O purê de cenoura preparado conforme descrito em 3.3.1, foi esterilizado à 121,0°C por 15 minutos em autoclave. Foi depositado 0,1 ml da suspensão de esporos do **isolado No 10**, (selecionado no item 3.8.2), em cada tubo TDT estéril (8,0 mm D.I. x 10,0 mm D.E.x 100,0 mm l), e em seguida colocou-se 0,9 ml do purê diluído estéril. Após selagem

em maçarico, os tubos foram agitados e mantidos sob refrigeração até o início do procedimento de determinação da resistência térmica em cada temperatura de estudo. O "lag" térmico das ampolas foi estabelecido. O ensaio foi realizado à 121,0 e 118,0 ° C, pelos tempos reais de exposição (já retirado o "lag") de 0,0, 3,0, 6,0, 8,0, e 10,0 min e 0,0, 4,0, 6,0, 8,0, e 10,0 min respectivamente. Uma vez estabilizado o banho de óleo termostaticado, as ampolas foram submergidas no óleo, e ao final de cada tempo, 2 ampolas foram retiradas e transferidas para banho de gelo até temperatura ambiente. As ampolas identificadas foram então encaminhadas para os procedimentos de recuperação dos sobreviventes. Uma vez agitadas as ampolas, estas foram limpas e abertas em câmara de fluxo laminar com auxílio de uma vódea. Sendo o produto viscoso e para que a contagem refletisse o número real de sobreviventes, decidiu-se por transferir todo o conteúdo das ampolas para tubos de ensaio de rosca contendo 8,0 ml de água estéril, e a partir desta 1ª diluição foi feita diluição decimal até a selecionada para plaqueamento e contagem. As placas foram preenchidas com aproximadamente 30,0 ml de TSA, (Difco), e depois de secas incubadas à 55° C/ 48 h para realização da contagem das UFCs.

3.9-ESTUDO DA RETORTA ROTATIVA ROTOPAX

3.9.1. Descrição do sistema e funcionamento e retorta rotativa Rotopax

O ROTOPAX (Mod. 1RRI-IIIBA, ALLPAX Prod. Inc. USA), instalada nas dependências da FEA-UNICAMP, é uma retorta rotativa de imersão total em água construída em escala piloto, contendo um cesto de confinamento de recipientes (600,0 mm de largura (b) x 600,0 mm h x 800,0 mm l). O sistema consiste de dois tanques: um onde é feita a estocagem da água de aquecimento, e outro, onde ocorre o processamento, denominado tanque de trabalho. O aquecimento é dividido em três fases: esterilização I, fase de transferência da água pré-aquecida no tanque de estocagem para o tanque de trabalho; esterilização II, onde ocorre a desaeração do tanque de trabalho, e a subida da retorta até as condições programadas de temperatura e pressão; e, esterilização III, fase da esterilização do produto. O esfriamento também ocorre em três passos : esfriamento I, onde há a volta da água quente para o tanque de estocagem e entrada de água fria no tanque de trabalho, sob pressão; esfriamento II, fase de esfriamento com pressão caindo

até a atmosférica, e esfriamento III, onde se dá o esfriamento com recirculação da água à pressão atmosférica. A agitação pode ser programada entre 0 e 45 rpm. Os recipientes no interior do cesto fazem um trajeto tipo "end-over-end" quando dispostos em orientação vertical nas prateleiras. Os comandos de controle e execução são emitidos mediante um computador IBM PS/2 ligado ao PLC interno (Mod. PL-A015). O processo é controlado pelo *software* ControlView (Allan Bradley), e no momento de funcionamento, as informações de programação e condições do processo são transferidas para a retorta através do PLC interno localizado no painel de controle elétrico e pneumático das válvulas.

A Fig. 6 mostra uma vista geral da retorta rotativa Rotopax , onde pode-se observar o tanque de trabalho à direita e o tanque de estocagem à esquerda, com o painel de controle elétrico-pneumático à frente.

A Fig. 7 mostra detalhe do tanque de trabalho com o cesto de confinamento de recipientes. Observa-se nesta figura, as latas dispostas sobre a prateleira conforme carregamento total para realização dos estudos de distribuição de calor e aplicação dos processos térmicos deste trabalho.

3.9.2. Calibração dos termopares na retorta ROTOPAX

Foram utilizados nos experimentos termopares de agulha tipo T (CNS, Ecklund-Harrison Tech. Inc.) de 1 13/16" de comprimento, calibrados conforme Norma ASTM E220-86, (1987). A calibração dos termopares foi feita na retorta, e para tanto, os fios foram fixos na prateleira de modo a formar um feixe em círculo com as juntas o mais próximo possível umas das outras, porém sem se tocarem. A calibração foi feita contra um termopar flexível (Omega T-TT-36, AGW-E, previamente calibrado em banho de óleo contra termômetro padrão, conforme norma acima citada) que foi posicionado firmemente no centro deste feixe. As equações de calibração de cada termopar foram feitas a partir da regressão linear de dados colhidos na faixa de 100,0 a 125,0°C, com intervalos de 5,0°C. (para obter as equações foi empregado o *software* LOTUS, 2.01.

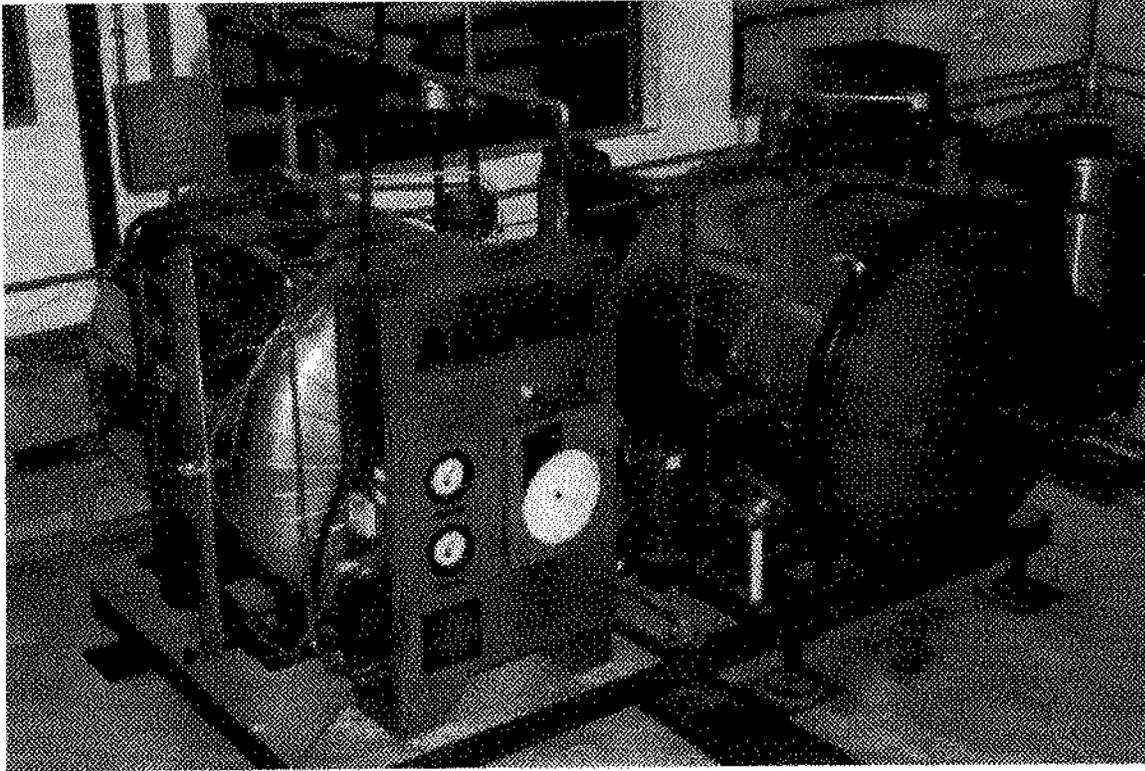


FIGURA 6 Vista geral da retorta Rotopax (Allpax Prod. Inc). Obsrva-se o tanque de trabalho (dir) e o tanque de estocagem (esq. 2^o plano) com o painel de controle (esq. 1^o plano).

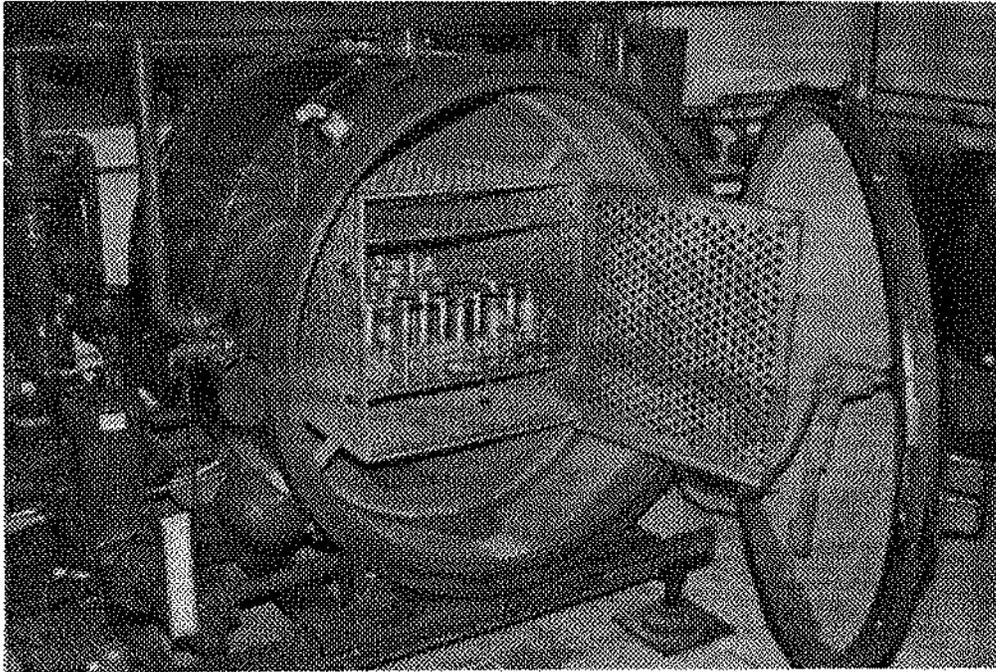


FIGURA 7 - Vista do tanque de trabalho da retorta Rotopax, mostrando a cesta com a prateleira para latas, conforme utilizada neste trabalho.

3.9.3. Ensaio de distribuição de calor na retorta Rotopax

Foi adaptada uma prateleira para suporte das latas, (construída em aço inox AISI 304) posicionada em um plano à 300,00 mm do plano inferior da cesta. A prateleira tem capacidade para 45 latas, e dimensões de 590,0 mm b x 790,0 mm l. Com o objetivo de não impor qualquer resistência à passagem do meio de aquecimento/esfriamento durante os processos, a prateleira foi perfurada em toda sua extensão imitando-se o padrão de distribuição das perfurações da cesta (orifícios de 18,0 mm D.I., espaçados 15,0 mm entre si).

Seis termopares de agulha tipo T (CNS Ecklund , 1 13/16" comprimento) foram fixados em latas-suporte (73,0 D.I.x 91,0 mm h), sem fundo e sem tampa perfuradas por todo o corpo para favorecer a passagem do meio de aquecimento (PFLUG, 1975) . Para localização dos termopares na prateleira suporte das latas, foi assumido simetria lateral dentro da cesta devido à rotação da mesma, portanto os termopares foram localizados no lado direito e centro da cestas nas posições indicadas na Tab 5.

TABELA 5. LOCALIZAÇÃO DOS TERMOPARES NA PRATELEIRA DA CESTA DA RETORTA ROTOPAX

POSIÇÃO N°	LOCALIZAÇÃO NA CESTA	DISTÂNCIA DA PORTA (mm)	DISTÂNCIA DA LATERAL (mm)
1	FRENTE/LADO	20,0	20,0
2	MEIO/LADO	460,0	20,0
3	FUNDO/LADO	720,0	20,0
4	FRENTE/CENTRO	20,0	230,0
5	MEIO/CENTRO	460,0	230,0
6	FUNDO/CENTRO	720,0	230,0

Na Fig.8 é apresentado um esquema simples da cesta, mostrando apenas o posicionamento das latas-suporte para os termopares na prateleira, sendo que para todos os ensaios, o resto da prateleira foi completada com mais 39 latas cheias com água para simular carga total da cesta nestas condições - com apenas uma prateleira.

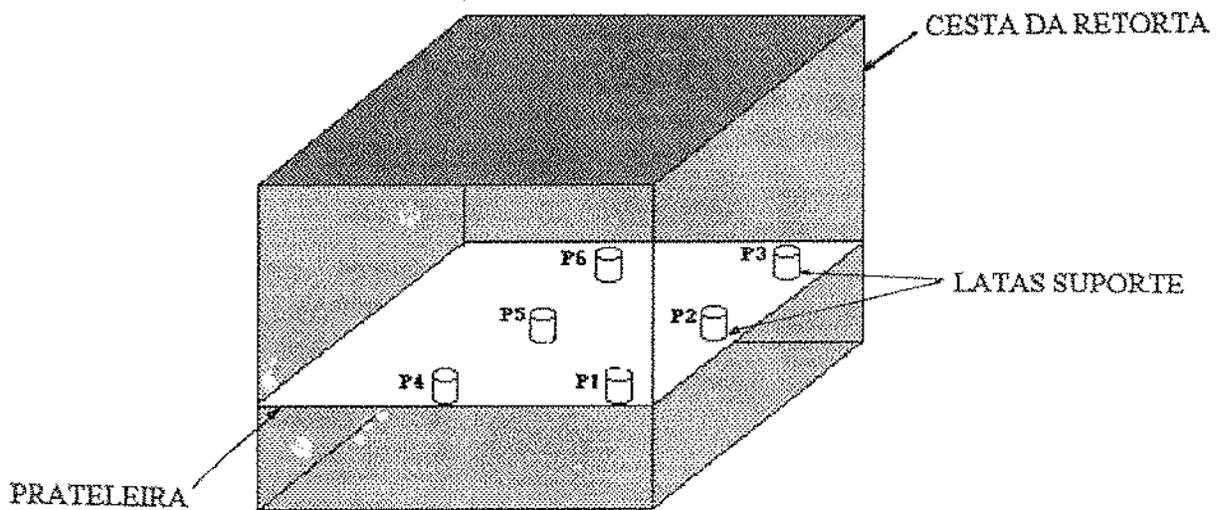


FIGURA 8 - Ilustração da disposição das latas-suporte para os termopares na prateleira para o estudo da distribuição de calor na cesta da retorta Rotopax

Para determinação da temperatura da água de esfriamento, dois termopares foram instalados na posição mais próxima às entradas de água (450,0 mm da porta e 350,00 mm do plano inferior do tanque), fixos diretamente no corpo da cesta.

3.9.3.1 Coleta dos dados de distribuição de calor na retorta Rotopax

Os dados de tempo-temperatura foram colhidos via aquisitor de dados Doric (245-A, Beckman Ind.) com frequência de 1,0 minuto. Os dados foram transferidos para PC-XT (Scopus, Ltda) e foram corrigidos para as equações de calibração de cada termopar. Os valores assim obtidos foram utilizados para construção de gráficos de estudo da distribuição de temperatura na autoclave por tempo (média dos seis termopares ao longo do tempo de exposição), e por posição (média da temperatura obtida por cada termopar/posição após estabilização da temperatura no interior da retorta). As condições empregadas em cada processo estão resumidas na Tab.6. Cada ensaio foi realizado em triplicata .

TABELA 6. CONDIÇÕES DE PROCESSO PARA ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE CALOR NA RETORTA ROTOPAX

TEMPERATURA PROGRAMADA DA RETORTA (° C)	PRESSÃO (PSIG)	TEMPO DE PROCESSO (MIN)	ROTAÇÃO (RPM)
123,0	20	8	20
121,0	20	10	20
115,0	15	15	20

3.10-ENSAIOS DE COMPARAÇÃO DE F₀ FIS X F₀ BIO

3.10.1. Preparo das latas

Para cada ensaio, foi preparada uma batelada composta por 30 latas, sendo cada 10 latas preparadas com um objetivo:

Para o **ensaio de esterilidade comercial** foram preparadas 10 latas/ensaio conforme descrito em 3.3.2 preenchidas somente com purê diluído, homogeneizadas, identificadas e recravadas.

Foram preparadas 10 latas/ensaio para determinação do **valor de esterilização físico**, equipadas com termopares de agulha tipo T (1¹³/16", Ecklund-Harrison Inc, calibrados na ROTOPAX, segundo norma ASTM, E220-86, 1987.) . Os termopares foram adaptados pelas tampas das latas através de receptáculos C-9 (Locking type, Ecklund Harrison Inc.) sendo que após enchimento e recravação (conforme item 3.3.2), as juntas de medida se posicionavam no centro geométrico das latas

Para determinação do **valor de esterilização biológico**, foram preparadas 10 latas/ensaio com IBs. A instalação foi feita da seguinte maneira: IBs preenchidos e armazenados sob refrigeração foram escolhidos ao acaso e no momento do ensaio foram encaixados nos conectores C9 (Ecklund-Harrison Inc.) instalados nas tampas das latas. Uma vez preenchidas as latas, as tampas foram colocadas imediatamente antes da recravação.

Antes e depois de cada processo, o peso das latas foi registrado para identificar-se qualquer tipo de vazamento ocasionando perda ou ganho de peso.

3.10.2. Estabelecimento do valor de esterilização requerido

Foram realizadas 2 séries de ensaios à 121,0°C (Serie I e II) e duas séries à 115,0°C (Serie I e II), fazendo-se duas replicatas de cada ensaio (R1 e R2). O processo térmico de cada série foi desenhado com base no valor de esterilização requerido para preservação contra deterioração por organismos esporulados termofílicos não patogênicos, utilizando-se o modelo semi-logarítmico de morte térmica:

$$FT = D (\log N_o - \log N_f) \quad (\text{eq. 2})$$

O termófilo produtor de acidez plana empregado como alvo para o cálculo deste processo foi o isolado de cenoura No 10 (ver resultados item 4.4.2) que apresentou valor- $D_{121^{\circ}\text{C}} = 1,75$ min em purê de cenoura diluído (ver resultados item 4.4.3)

Com o objetivo de testar a eficiência das curvas de calibração preparadas foram projetadas duas séries de experimentos de modo a obter sobreviventes no meio e no final da curva.

Para a série I , foi projetado um processo severo para conservas tropicais, cujo ponto final de preservação empregado (PUNE) foi $10\text{E}-6$. Objetivo deste processo é a preservação contra termófilos esporulados com temperatura de distribuição e armazenamento dos recipientes superior a 30°C . (PFLUG,1990) Assim, o valor de esterilização requerido foi de 15 min, considerando-se a carga inicial de termófilos produtores de acidez plana por lata igual a $4,3 \times 10\text{E}2$ (ver resultados item 4.4.1) e aplicando-se a eq.2 temos:

$$15,0 = 1,75 (\log 4,3 \times 10\text{E}2 - \log 1,0 \times 10\text{E}-6) \quad (\text{eq } 3)$$

Na série II, foi projetado um processo de preservação contra termófilos esporulados com temperatura de distribuição e armazenamento dos recipientes inferior a 30°C , com ponto final de preservação (PUNE) de $10\text{E}-3$. Neste caso, o valor de esterilização requerido foi de 10 min, aplicando-se a eq.2 da mesma forma que no processo:

$$10,0 = 1,75 (\log 4,3 \times 10\text{E}2 - \log 1,0 \times 10\text{E}-3) \quad (\text{eq.4})$$

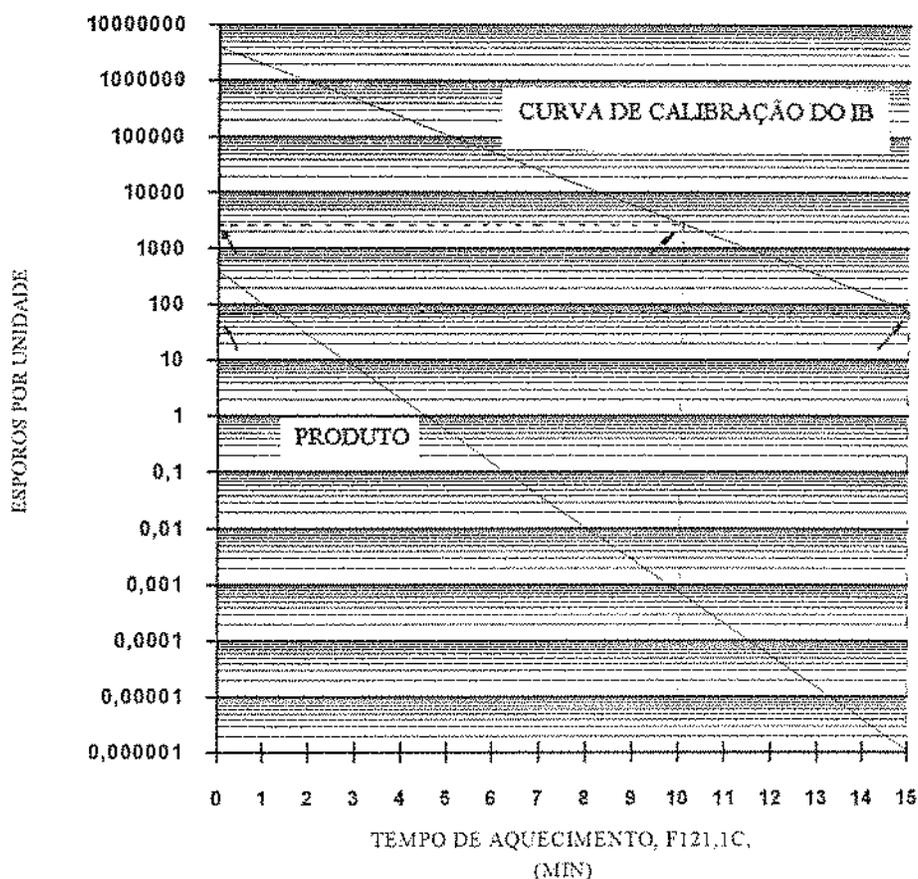


FIGURA 9 - Desenho do processo de preservação do purê de cenoura e a curva de calibração dos IBs mostrando o Nf/IB correspondente.

A Fig 9 ilustra o desenho dos processos (nas duas séries), indicando-se a PUNE programada e número de sobreviventes esperado em cada processo, relacionando-se com o número esperado de sobreviventes por IBs para validação biológica dos processos.

3.10.3. Aplicação dos processos térmicos

Uma vez desenhado o processo, a retorta foi programada para execução dos ensaios. Nas tabelas 7 a 10 estão indicadas as condições programadas para realização das duas séries de ensaios para cada temperatura de estudo, e suas replicatas. Existem fases onde não é possível programação de algumas variáveis, as quais são exclusivamente dependentes do funcionamento automático da retorta.

Um ciclo de pré-aquecimento da retorta (com fase esterilização III de 5,0 min) foi efetuado antes de cada ensaio.

A temperatura programada foi a do RTD de controle sempre 1,0 °C acima dos valores que se desejava atingir no interior da retorta (ver resultados item 4.5.1).

TABELA 7. PROGRAMAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO A 121,0 °C, PARA APLICAÇÃO DE VALOR DE ESTERILIZAÇÃO (VALOR-FT)= 15,0 MIN

FASE	TEMPER. PROGRAM. (C)	PRESSÃO PROGRAM. (lb)	ROTAÇÃO (R.P.M.)	TEMPO (MIN)
ESTERILIZAÇÃO I	122,0	-	20,0	-
ESTERILIZAÇÃO II	122,0	20,0	20,0	4,3
ESTERILIZAÇÃO III	122,0	20,0	20,0	21,5
ESFRIAMENTO I	-	5,0	20,0	-
ESFRIAMENTO II	45,0	2,7	20,0	8,0
ESFRIAMENTO III	35,0	-	20,0	12,0

TABELA 8 PROGRAMAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO A 121,0 °C, PARA APLICAÇÃO DE VALOR DE ESTERILIZAÇÃO (VALOR-FT)= 10,0 MIN

FASE	TEMPER. PROGRAM. (C)	PRESSÃO PROGRAM. (lb)	ROTAÇÃO (R.P.M.)	TEMPO (MIN)
ESTERILIZAÇÃO I	122,0	-	20,0	-
ESTERILIZAÇÃO II	122,0	20,0	20,0	4,3
ESTERILIZAÇÃO III	122,0	20,0	20,0	16,5
ESFRIAMENTO I	-	5,0	20,0	-
ESFRIAMENTO II	45,0	2,7	20,0	8,0
ESFRIAMENTO III	35,0	-	20,0	12,0

TABELA 9. PROGRAMAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO A 115,0 °C, PARA APLICAÇÃO DE VALOR DE ESTERILIZAÇÃO (VALOR-FT)= 15,0 MIN

FASE	TEMPER. PROGRAM. (C)	PRESSÃO PROGRAM. (lb)	ROTAÇÃO (R.P.M.)	TEMPO (MIN)
ESTERILIZAÇÃO I	120,0	-	20,0	-
ESTERILIZAÇÃO II	116,0	20,0	20,0	4,3
ESTERILIZAÇÃO III	116,0	20,0	20,0	59,0
ESFRIAMENTO I	-	5,0	20,0	-
ESFRIAMENTO II	45,0	2,7	20,0	8,0
ESFRIAMENTO III	35,0	-	20,0	12,0

TABELA 10. PROGRAMAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO A 115,0 °C, PARA APLICAÇÃO DE VALOR DE ESTERILIZAÇÃO (VALOR-FT)= 10,0 MIN

FASE	TEMPER. PROGRAM. (C)	PRESSÃO PROGRAM. (lb)	ROTAÇÃO (R.P.M.)	TEMPO (MIN)
ESTERILIZAÇÃO I	122,0	-	20,0	-
ESTERILIZAÇÃO II	116,0	20,0	20,0	4,3
ESTERILIZAÇÃO III	116,0	20,0	20,0	43,0
ESFRIAMENTO I	-	5,0	20,0	-
ESFRIAMENTO II	45,0	2,7	20,0	8,0
ESFRIAMENTO III	35,0	-	20,0	12,0

Considerando-se um CUT de 6,0 min. (em média, para as temperaturas estudadas), os tempos de Ball para os ensaios à 121,0 °C foram de: série I = 24,0 min e série II = 19,0 min. Nos ensaios à 115,0°C, os tempos de Ball foram de: série I = 61,5 min e série II = 45,5 min

Em cada ensaio, foram expostas às condições indicadas acima a batelada de 30 latas preparadas conforme descrito em ítem 3.10.1. As latas de cada grupo (com IBs, com

termopares e para esterilidade comercial) foram distribuídas aleatoriamente no suporte/prateleira na região previamente determinada como zona de aquecimento mais lento da cesta - do centro da cesta para a região frontal próxima à porta, ocupando uma área de 400,0 mm b x 600,0 mm l, situada à 40,0 mm da porta e 40,0 mm da lateral direita da cesta (MASSAGUER et alii, 1994). Para completar toda capacidade do suporte da cesta (45 latas) foram colocadas outras 15 latas preenchidas apenas com água . A mesma região foi utilizada em todos os ensaios.

Três termopares foram fixados no suporte por entre as latas para fornecer a temperatura média do meio de aquecimento/esfriamento em cada ensaio, nas posições:

- 1- 400,0 mm da porta, 150,0 mm da lateral direita da cesta
- 2- 300,0 mm da porta, 300,0 mm da lateral direita da cesta
- 3- 400,0 mm da porta, 400,0 mm da lateral direita da cesta

Após os processos, as latas foram novamente pesadas. As latas contendo IBs foram então abertas para retirada dos IBs e início dos procedimentos de recuperação dos sobreviventes conforme descrito em item 3.10.6.1.

3.10.4. Estudo dos parâmetros de penetração de calor do purê de cenoura diluído

A partir dos dados fornecidos pelas latas equipadas com termopares conforme descrito em 3.10.1 foram coletados dados de tempo-temperatura para a determinação dos parâmetros de penetração de calor do produto para cada ensaio.

As condições de processo aplicados para os estudos de penetração de calor foram as mesmas empregadas nos estudos de distribuição de calor (ver Tab.6), com exceção do tempo de aquecimento que foi estendido até o momento em que a lata de aquecimento mais lento atingisse 1,0°C abaixo da temperatura do meio de aquecimento programada para o ensaio. (PFLUG,1975; LOPEZ, 1987) Os ensaios foram feitos em triplicata às temperaturas de 115,0 e 121,0°C. Os dados de tempo-temperatura foram colhidos com frequência de 30 segundos através de um aquisitor de dados Doric (245-A, BECKMAN

IND.), e transferidos mediante interface serial com emulador ST240 a um PC-XT (SCOPUS). Após o término dos ensaios, os dados foram formatados e corrigidos pelas equações de calibração de cada termopar com auxílio do *software* PGC7 (ANDREOLLI, 1994). Após desconto do tempo de subida, estes dados foram transferidos para o programa "MFIJOT", em FORTRAN, (MASSAGUER, 1983) para cálculo dos parâmetros de penetração de calor : **fh** (taxa de aquecimento) **fc** (taxa de esfriamento), e **jh** (fator de atraso térmico de aquecimento) e **jc** (fator de atraso térmico de esfriamento). Os valores dos parâmetros de penetração de calor assim obtidos, foram avaliados obtendo-se a média, e desvio padrão do grupo de latas componentes de cada repetição.

3.10.5. Determinação do valor de esterilização físico (Fo-FIS)

Uma vez terminado o processo, os dados foram corrigidos para as equações de calibração de cada termopar e calculado o valor de esterilização aplicado a cada lata pelo programa em FORTRAN, "FPEXP" (MASSAGUER, 1983) que utiliza a integração de Simpson (1964), pelo Método Geral. Estes dados foram tabulados e analisados para comparação com Fo-BIO. (ver item 4.6.2)

3.10.6. Determinação do valor de esterilização biológico (Fo-BIO)

3.10.6.1. Recuperação dos sobreviventes

Uma vez terminados os processos térmicos, os IBs foram retirados assepticamente das latas, e lavados com água estéril. Em câmara de fluxo laminar, cada IB foi agitado por 20 segundos com agitador mecânico (Vortex Mixer), aberto, e o conteúdo depositado em uma placa de Petri (50,0 mm x 25,0 mm) estéril. A partir deste volume, uma alíquota de 0,1 ml foi retirada com auxílio de um micropipetador (Eletrapette MicroPipetor Mod 7004) e transferida para tubo de diluição contendo 10,0 ml de água destilada estéril. Após agitação, 0,1 ml desta diluição foi plaqueada em superfície, e 1,0 ml foi plaqueada em profundidade em placas contendo 30,0 ml de TSA , (Difco). As placas foram feitas em duplicata e incubadas à 55,0°C por 48 h para contagem de sobreviventes. Os valores F-BIO foram calculados a partir dos dados de contagem de colônias em placa. O número de

unidades formadoras de colônias por placa foi multiplicado pelo fator de diluição adequado para obter o número de esporos sobreviventes por IB.

3.10.6.2. Conversão dos valores F-Bio para Fo-Bio

Com o valor obtido a partir da curva de calibração (F_{T_c, z_1}) foi feita uma correção levando em consideração a diferença entre o valor-z dos esporos do *B. stearothermophilus* dos IBs ($z_1 = 7,2 \text{ }^\circ\text{C}$), e o valor-z de *C. botulinum*. ($z_2 = 10,0^\circ\text{C}$), para o qual comumente se define F_o . Esta conversão foi realizada em três etapas, seguindo metodologia descrita por PFLUG e CHRISTENSEN (1980), e utilizando-se em sequência as equações indicadas a seguir:

$$Y_1 = 10E[(T_c - T_1)/z_1] \quad (\text{eq.5})$$

$$\text{Etapa 1- } F(T_1, z_1) = F(T_c, z_1) \times Y_1 \quad (\text{eq.6})$$

$$\text{Etapa 2- } F(T_1, z_2) = F(T_1, z_1) \times Y_2 \quad (\text{eq.7})$$

$$Y_3 = 10E[(T_1 - T_{ref.})/z_2] \quad (\text{eq.8})$$

$$\text{Etapa 3- } F(T_{ref.}, z_2) = F(T_1, z_2) \times Y_3 \quad (\text{eq.9})$$

onde:

T_1 = Média da temperatura da retorta durante esterilização III

T_c = Temperatura de calibração da suspensão de esporos nos IBs ($121,0 \text{ }^\circ\text{C}$)

z_1 = valor-z do organismo indicador ($z_1 = 7,2^\circ\text{C}$)

z_2 = valor-z de *C. botulinum* ($z_2 = 10,0^\circ\text{C}$)

$F(T_1, z_1)$ = Valor de esterilização do IB à temperatura de processo com base em valor-z = $7,2^\circ\text{C}$

$F(T_c, z_1)$ = Valor de esterilização do IB à temperatura de calibração com base em valor-z = 7,2°C

$F(T_1, z_2)$ = Valor de esterilização do IB à temperatura de processo com base em valor-z de = 10°C

$F(T_{ref}, z_2)$ = Valor de esterilização do IB à temperatura de referência (121,1°C) com base em valor-z = 10°C

O valor Y2 foi obtido de tabelas publicadas em PFLUG e CHRISTENSEN (1980) que relacionam o valor $F(T_1, z_1)$ com o valor $F(T_1, z_2)$ como função da taxa de aquecimento (fh) em minutos. Estas tabelas foram elaboradas calculando-se o valor $F(T_1, z_2)$ pelo método de Ball assumindo-se $fh = fc$ e $jc=1,40$. O valor $F(T_{ref}, z_2)$ assim obtido foi denominado Fo-BIOPF.

Levando-se em consideração que o purê de cenoura diluído processado em retorta agitada (10 % espaço livre), apresentou taxas de aquecimento (fh) muito diferentes das taxas de esfriamento, (fc), inclusive com curva quebrada de aquecimento, (ver resultados e discussão item 4.6.1, e Apêndice 2 de "Parâmetros de penetração de calor ", para resultados integrais) decidiu-se por calcular também $F(T_{ref}, z_2)$ utilizando procedimento computadorizado de HAYAKAWA (1977). Este procedimento permite o cálculo do valor de esterilização quando há curva quebrada de aquecimento, assim, foi utilizado o programa ESPERA (em FORTRAN IV), implementado e modificado por MASSAGUER, (1983) com base na sub-rotina SETU. Para cada processo, com dados de T_o , T_1 , T_w , jh_1 , fh_1 , fh_2 , gb_1 , gb_2 , jc , fc , D_{ref} , z , T_g , T_{mg} , (ver nomenclatura para definições) os valores $F(T_1, z_2)$ foram calculados. Estes dados foram utilizados no cálculo do fator Y2 (conforme descrito abaixo). As saídas originais do programa ESPERA para os processos efetuados estão apresentados no Apêndice 3 de "Valores de esterilização calculados pela sub-rotina SETU".

Os fatores de correção Y1 e Y3 foram obtidos seguindo equações 5 e 8 respectivamente, e o fator Y2 foi obtido a partir da relação:

$$Y_2 = F(T_1, z_2)/F(T_1, z_1)$$

Os valores $F(T_{ref}, z_2)$ obtidos por este procedimento para cada IB foram denominados Fo-BIOHW.

Os valores médios de Fo-BIOPF e Fo-BIOHW foram comparados e analisados em termos de porcentagem de diferença de valor Fo-FIS, sendo que $\%DIF = (Fo-FIS - Fo-BIO)/Fo-FIS$.

3.10.7. Ensaio de esterilidade comercial

Após os processos onde foi aplicada uma $PUNE-T = 10E-6$, 5 latas seleccionadas ao acaso foram transferidas para estufa à 37,0 °C e 5 latas transferidas para estufa à 55,0 C e incubadas por 10 dias. Nos processos onde foi aplicada $PUNE-T = 10E-3$, cinco latas seleccionadas ao acaso foram transferidas para estufa à 37,0 °C e incubadas por 10 dias. Durante o período de incubação, estas latas foram periodicamente examinadas para quaisquer alterações físicas que pudessem indicar deterioração anaeróbica do produto por sobreviventes ao processo. Após o período de incubação, foi medido o pH do produto, para detectar deterioração por produtores de acidez plana, e foram feitos exames microscópicos para detectar presença de sobreviventes ao processo . (F.D.A. 1984)

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus*

4.1.1. Quantificação das suspensões de esporos de *B. stearothermophilus*

Os lotes de suspensão de esporos produzidos foram quantificados e os resultados estão apresentados na Tab.11. Observou-se que com os lotes da série II e III, para os quais foi modificado o meio de esporulação e aumentada a temperatura de incubação, obteve-se a maior produção de esporos por ml de suspensão.

TABELA 11. QUANTIFICAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus*, SÉRIE I, II E III, EM MEIO TSA.

LOTE	MEIO DE ESPORULAÇÃO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	ESPOROS/ML
SÉRIE I	AN BIOBRAS	55,0 °C	6,5 x 10E7
SÉRIE II	AN DIFCO	57,0 °C	1,1 x 10E8
SÉRIE III	AN BIOBRAS	57,0 °C	1,0 x 10E8

Durante o período de estocagem da suspensão Série II, (à 4,0°C), já diluída para que a contagem de esporos por IBs fosse aproximadamente 2,0 x 10E6, a concentração de esporos por ml não apresentou queda significativa. Na Tab.12 estão indicadas as contagens obtidas até 2 meses após a produção. (9 semanas até 01/05/94, data em que terminaram os estudos de calibração dos IBs). De acordo com SMITH et alii, (1976), suspensões de *B. stearothermophilus* secas em tiras de papel de filtro para serem utilizadas como indicadores biológicos para monitoração de ciclos de esterilização à vapor, sofrem queda

significativa na contagem somente a partir de 64 semanas de estocagem sob refrigeração (4,0°C). A partir deste período começa a haver desestabilização da suspensão, chegando a redução de até um ciclo logarítmico na contagem do número inicial de esporos por ml, no período de 80 a 96 semanas.

TABELA 12. CONTAGEM DA SUSPENSÃO DE ESPOROS SÉRIE II DURANTE PERÍODO DE ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO

DATA	ESPOROS/ML
24/02	6,6 x 10E6
10/03	5,3 x 10E6
24/03	4,7 x 10E6
10/04	4,6 x 10E6
24/04	4,1 x 10E6

4.1.2. Determinação da resistência térmica das suspensões de esporos de *B. stearothermophilus* em tampão fosfato de Butterfield (50X, 0,015 M, pH 7,2)

Na Fig.10 apresenta-se as curvas de sobreviventes da suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* Série I. Pode-se observar que o valor- $D_{121,0^{\circ}\text{C}}$ obtido para este lote foi de 46 e 48 segundos respectivamente para 1ª e 2ª replicatas, sendo que esta resistência é considerada baixa para trabalhos com indicadores biológicos de esterilização, uma vez que PFLUG, (1992) sugere que este valor seja superior a 1,5 minutos. A USP XXIII, (1995), sugere que entre as características do organismo indicador para ciclos de esterilização com vapor, depositados em tira de papel, os valores-D devem estar entre 1,5 a 3,0 min.

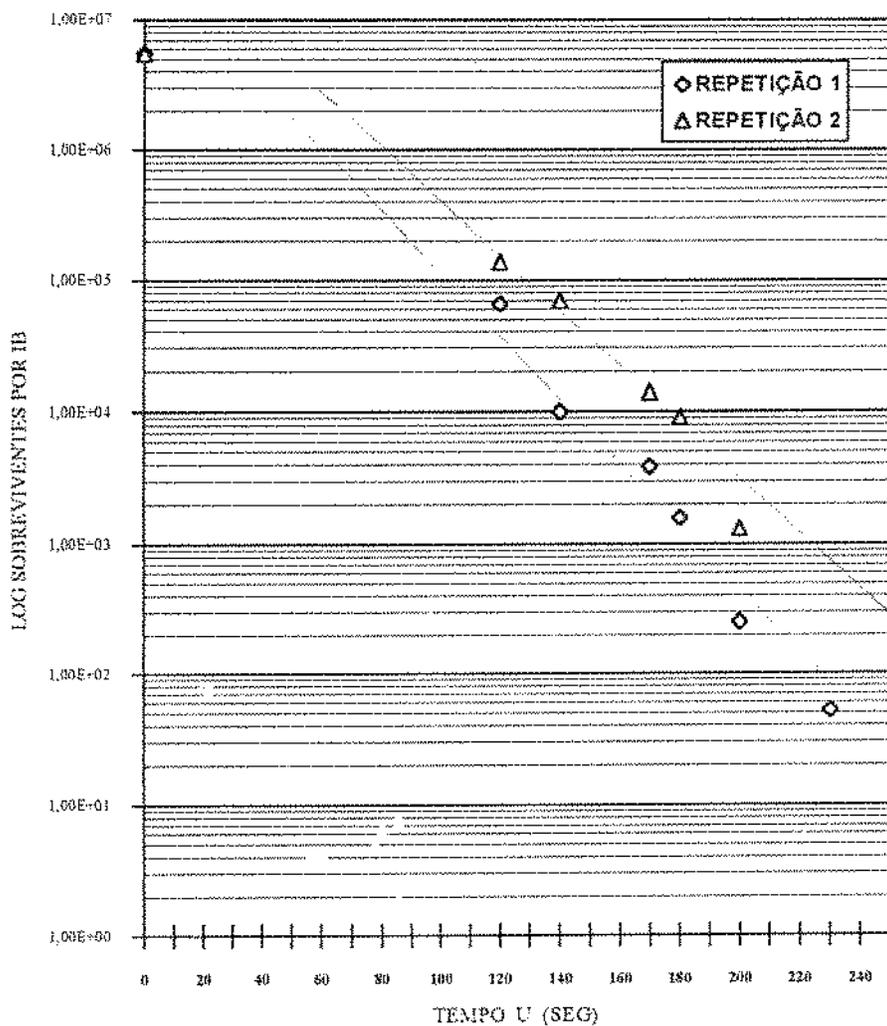


FIGURA 10 - Curva de sobreviventes da suspensão de *Bacillus stearothermophilus* Série I em tampão fosfato de Butterfield (50X) em carregadores plásticos. Ensaio feito em mini-retorta à 121,0°C ($\pm 0,2$)

A resistência térmica das suspensões produzidas, com AN Difco (Série II) e Biobrás (Série III), determinada em banho termostaticado, estão apresentadas na Tab.13. Observa-se que o meio AN Difco mostrou-se mais eficiente na produção de esporos mais termo-resistentes. Isto fica demonstrado pelo seu valor $D_{121,0^{\circ}\text{C}}$ mais alto. No entanto, nem todo crédito pode ser dado ao meio de esporulação, pois neste experimento a temperatura de esporulação também foi aumentada em 2,0 ° C, para 57,0 ° C.

TABELA 13. RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS SUSPENSÕES DE *B.stearothermophilus* SÉRIE II E III EM TAMPÃO DE BUTTERFIELD 50X. ENSAIO FEITO EM BANHO TERMOSTATIZADO A 121,0 C ±0,5 C

TEMPO (MIN) ¹ À 121 C	MEIOS DE ESPORULAÇÃO	
	AN DIFCO ²	AN BIOBRAS ³
0	4,75x10E6	2,75x10E6
3,5	1,42x10E6	2,25x10E5
5,5	8,37x10E5	1,85x10E4
7,5	4,67x10E4	2,10x10E3
9,5	8,45x10E3	8,75x10E2
Valor D _{121 C}	3,4 min	2,2 min

- 1- TEMPO DE EXPOSIÇÃO APÓS TEMPO DE ATRASO TÉRMICO DOS TUBOS TDT
2 - SUSPENSÃO SÉRIE II, PROVENIENTE DE AGAR NUTRIENTE DIFCO
3 - SUSPENSÃO SÉRIE III, PROVENIENTE DE AGAR NUTRIENTE BIOBRÁS

Uma vez que a resistência térmica da suspensão Série II, proveniente do meio de esporulação feito com AN Difco, se apresentou maior, decidiu-se por utilizá-la no preparo e confecção dos indicadores biológicos empregados durante todo este trabalho.

Pode-se observar na Fig.11 a curva de sobreviventes das duas suspensões **Série II e III**.

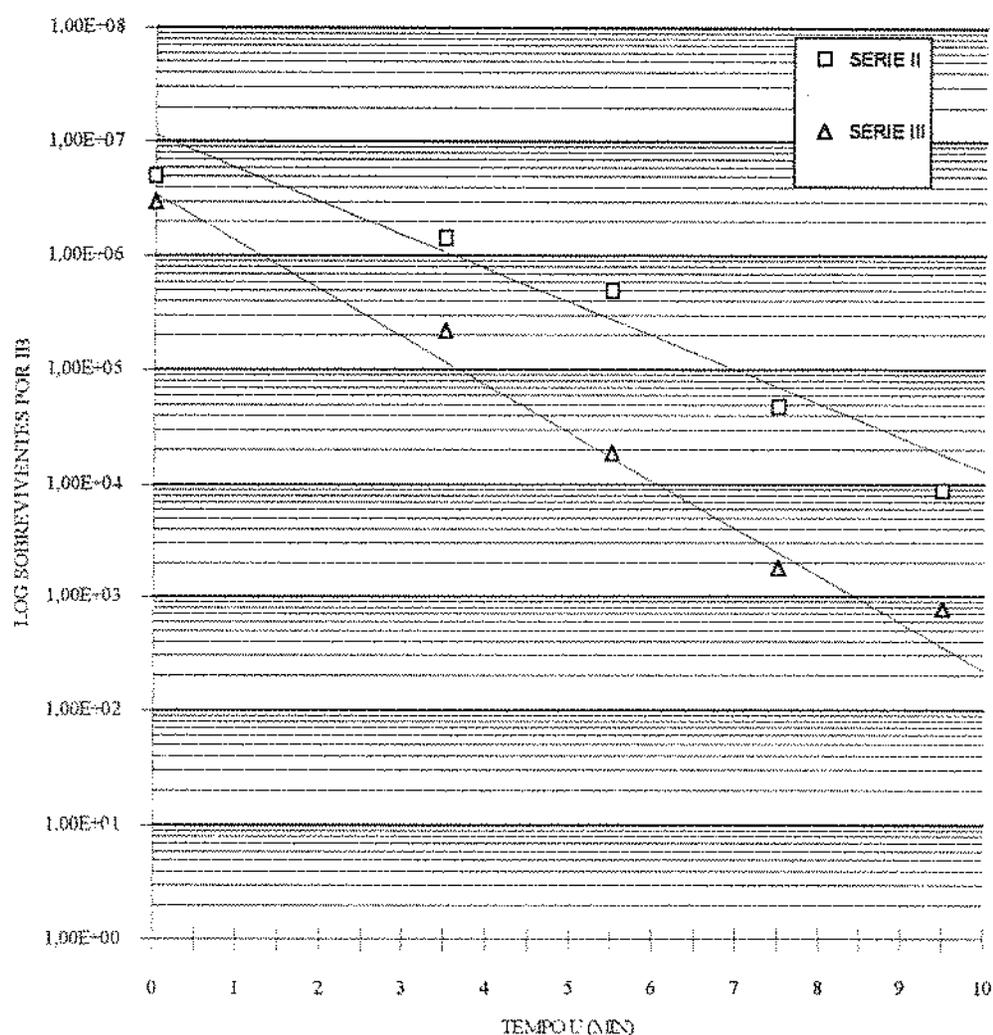


FIGURA 11 - Curva de sobreviventes das suspensões de *B. stearotherophilus* Série II e III em tampão fosfato de Butterfield 50X, em carregadores plásticos. Suspensão Série II valor-D = 3,4 min. Suspensão Série III valor-D = 2,2 min. Ensaio em banho de óleo termostaticado à 121,0 °C (±0,5)

4.2. CONSTRUÇÃO E ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE CALOR NA MINI-RETORTA

Na Fig. 12 observa-se o sistema de mini-retorta instalado nas dependências da FEA/UNICAMP. Nota-se a autoclave Dixie adaptada como pulmão de vapor à esquerda,

e o painel de controle e registro Taylor ao fundo. Observa-se a derivação da autoclave Dixie utilizada como linha de entrada de vapor para a MR, e a câmara da MR coberta pelo isolamento térmico à direita.

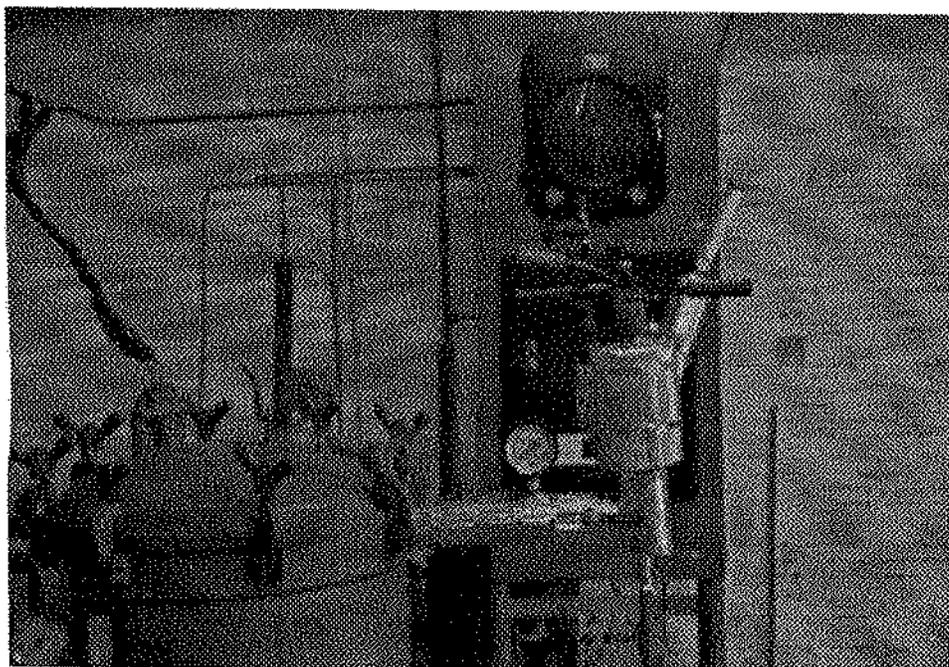


FIGURA 12 - Vista geral da mini-retorta acoplada à autoclave Dixie utilizada como tanque pulmão

Na Figura 13 observa-se um detalhe da tampa da MR para fechamento rápido da câmara. Pode-se ver no alto à direita a entrada para termopares (um feixe de termopares flexíveis desce pelo eixo central do suporte), e à esquerda a válvula de desaeração da câmara. Preso à face inferior da tampa observa-se o suporte metálico com três IBs posicionados como em todos ensaios, para monitorização da temperatura no interior da câmara.

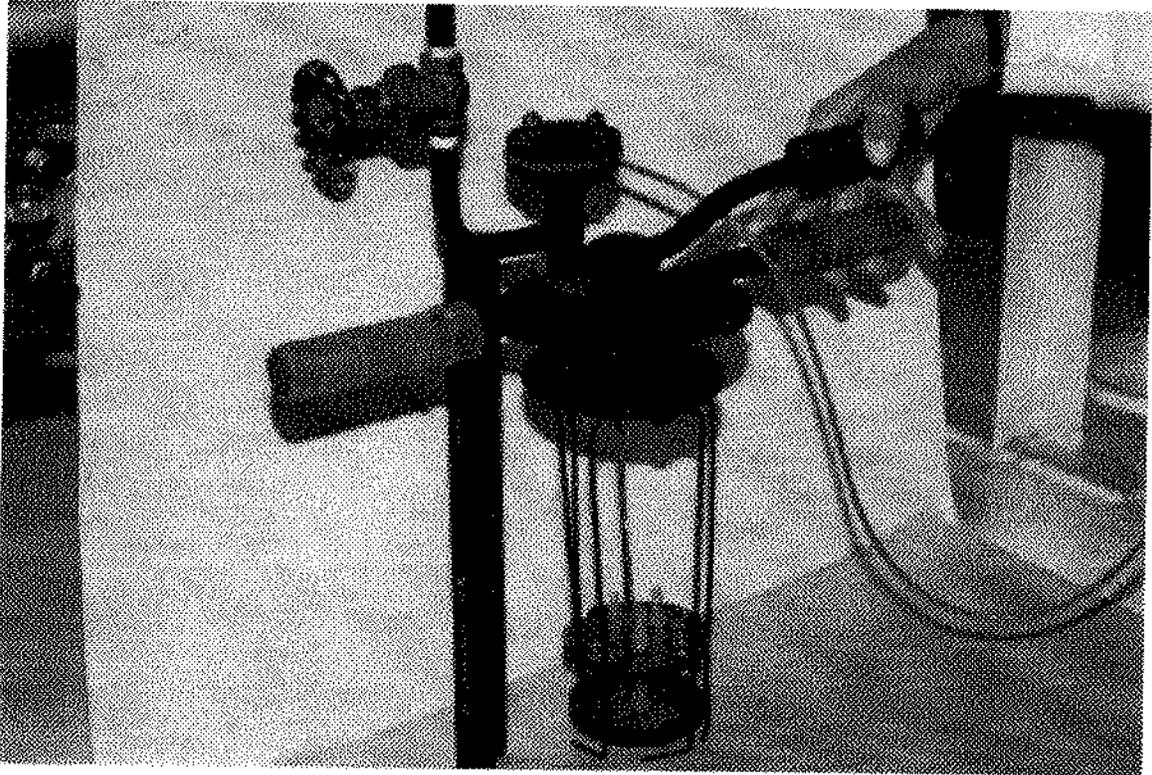


FIGURA 13 - Detalhe da tampa da mini-retorta acoplada ao suporte metálico com IBs

4.2.1. Determinação do tempo de subida e método de desaeração da mini-retorta

A Tab.14 mostra os resultados dos estudos do sistema de desaeração mais adequado para operação da mini-retorta. Observa-se que a combinação de tempo e porcentagem de

fechamento da válvula de desaeração necessários para obtenção de tempo de subida de até 10 segundos foi: fechamento da válvula até 1/8 de volta da última volta, 5 segundos após injeção de vapor na câmara. Observa-se que as outras tentativas em faixas próximas de trabalho produziram tempos de subida maiores. Uma vez que esta faixa de atuação está dentro da exigência da USP XXIII e AAMI, (1982) para resistômetros -que indicam que o tempo de subida deve estar entre 10 e 20 segundos, este método de desaeração foi considerado como padrão para o equipamento e utilizado em todos os ensaios posteriores.

TABELA 14. DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE DESAERAÇÃO DA MINI-RETORTA

\bar{X} TANQUE PULMÃO (°C)	TEMPO DE DESAERAÇÃO (S)	FECHAMENTO DA ÚLTIMA VOLTA DA VÁLVULA	CUT (S)	\bar{X} MR (°C)
122,0	10	1/4	15	121,3
121,8	7	1/4	10	121,1
122,0	7	1/8	13	121,3
122,0	5	1/8	10	121,2
122,0	5	1/8	10	121,2

LEGENDA:

\bar{X} TANQUE PULMÃO = TEMPERATURA MÉDIA NO TANQUE PULMÃO

CUT = TEMPO DE SUBIDA DA CÂMARA ATÉ TEMPERATURA DE ESTUDO

\bar{X} MR = TEMPERATURA MÉDIA NA MINI RETORTA DURANTE ENSAIO

4.2.2. Estudo da distribuição de calor na mini-retorta

A distribuição de calor na MR foi avaliada acompanhando-se a flutuação da temperatura em função do tempo, e a variação entre as temperaturas desenvolvidas nas posições estudadas dentro da câmara. De cada ensaio, a partir do mesmo conjunto de dados de tempo-temperatura fornecidos pelos termopares, foram preparados gráficos da distribuição

de calor por posição - para avaliar sua uniformidade, e por tempo - para analisar sua estabilidade.

As Fig 14 a 25 são exemplos de um gráfico por posição e um gráfico por tempo de uma das replicatas feitas para cada uma das temperaturas estudadas. São apresentados os resultados de estudos onde os IBs foram deixados com e sem espaço livre.

Nos gráficos de distribuição de calor por posição, observa-se as médias das temperaturas obtidas em cada uma das 7 posições estudadas no interior da câmara e as médias das temperaturas dos IBs . As posições denominadas 1-7 são ilustradas na Fig 5, onde indica-se a localização de cada posição dentro da MR em relação ao fundo da câmara.

Observa-se nas Figs. 14 a 19, que nos estudos com temperatura de ajuste 115,0 , 121,0 e 123,0 ° C, as posições mais frias na MR se apresentaram no fundo e centro da câmara (posição 1 e 3 da Fig.5). Estas posições se localizam no eixo vertical central da câmara. É possível que, uma vez entrando o vapor, este se difunda para a parte superior da MR, e depois desça liberando energia e formando condensado no fundo, o que abaixa levemente a média de temperatura nestes pontos, enquanto que, as outras 5 posições se encontram em torno da média geral da MR. Atenção especial foi dada às posições 4 e 5, que são as posições de referência para medida de temperatura no interior do IB, nestas figuras nota-se que os valores médios destas posições se mostram de forma satisfatória ao redor da média do pulmão de vapor, as quais foram apenas indicadas nos títulos das figuras, juntamente com seu desvio padrão.

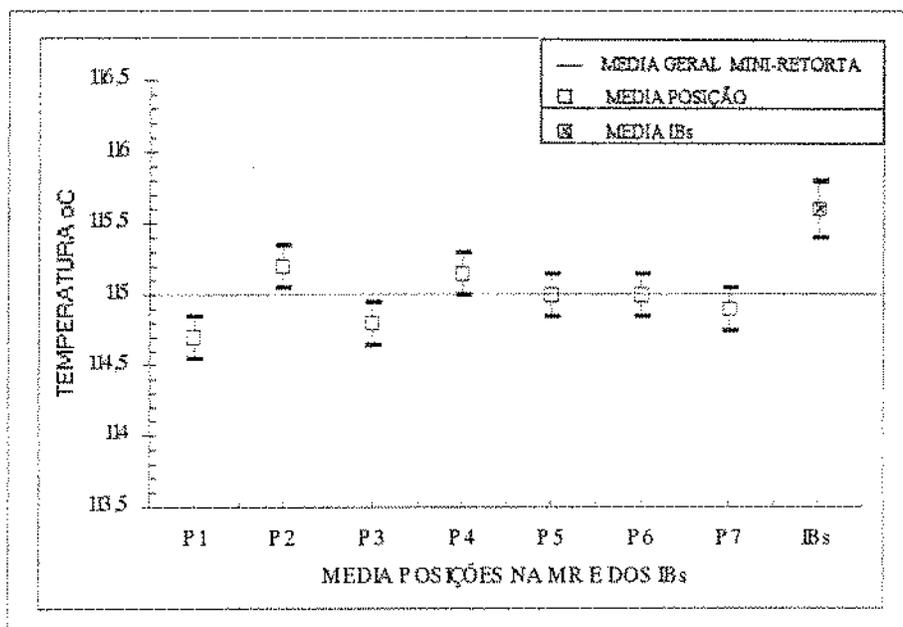


FIGURA 14 - Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão = 115,1 °C (D.P. = .0,1). IBs com espaço livre

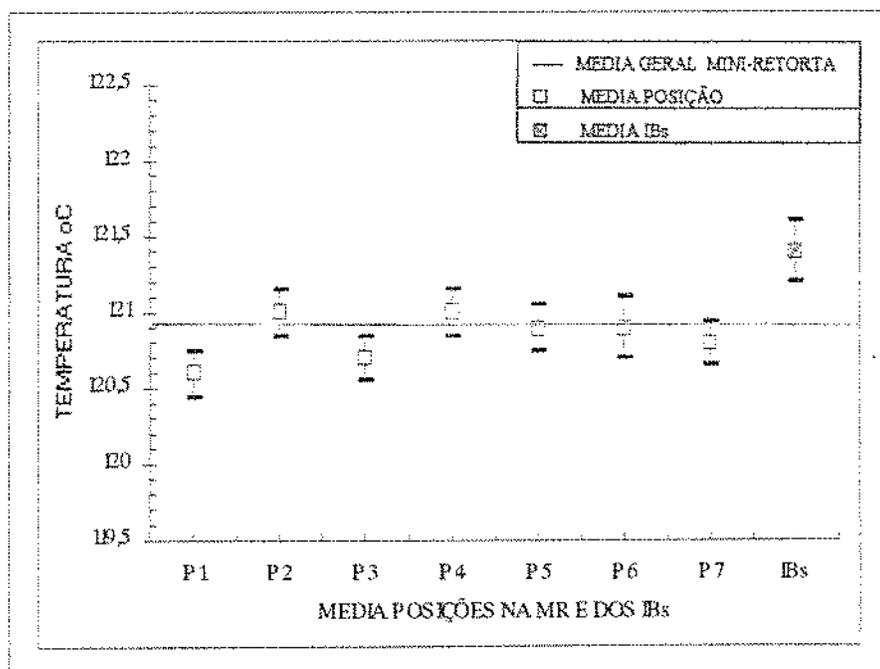


FIGURA 15 - Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão = 121,0 °C (D.P. = .0,2). IBs com espaço livre

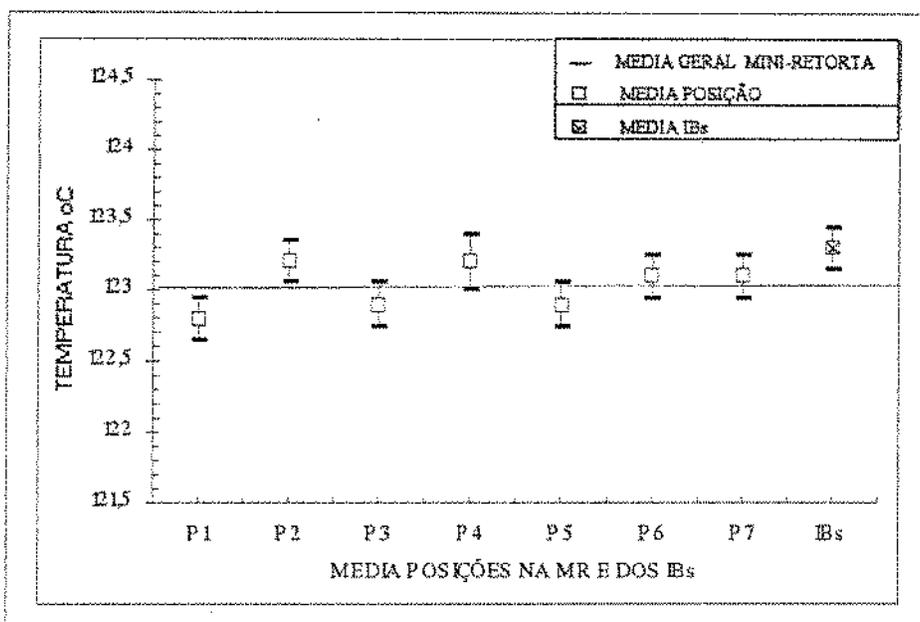


FIGURA 16 - Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão = 123,0 °C (D.P.=0,2). IBs com espaço livre

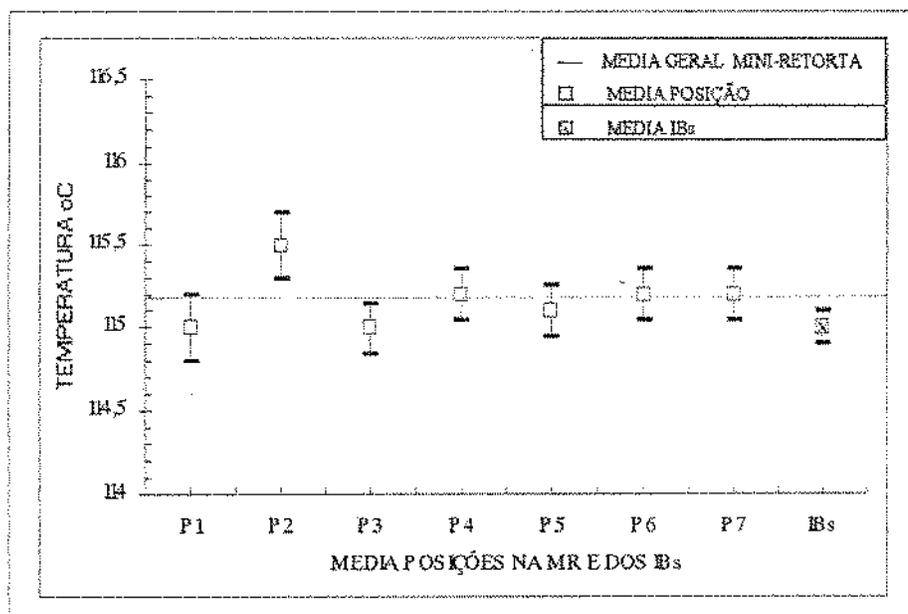


FIGURA 17 - Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão = 115,2 °C (D.P.=0,1). IBs sem espaço livre

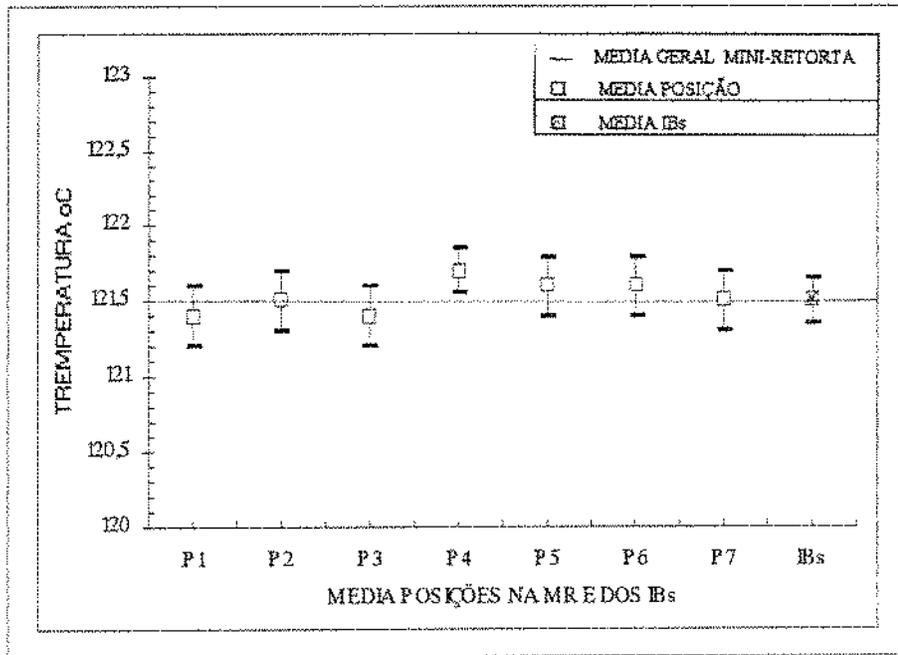


FIGURA 18 - Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão = 121,5 °C (D.P.=0,2). IBs sem espaço livre

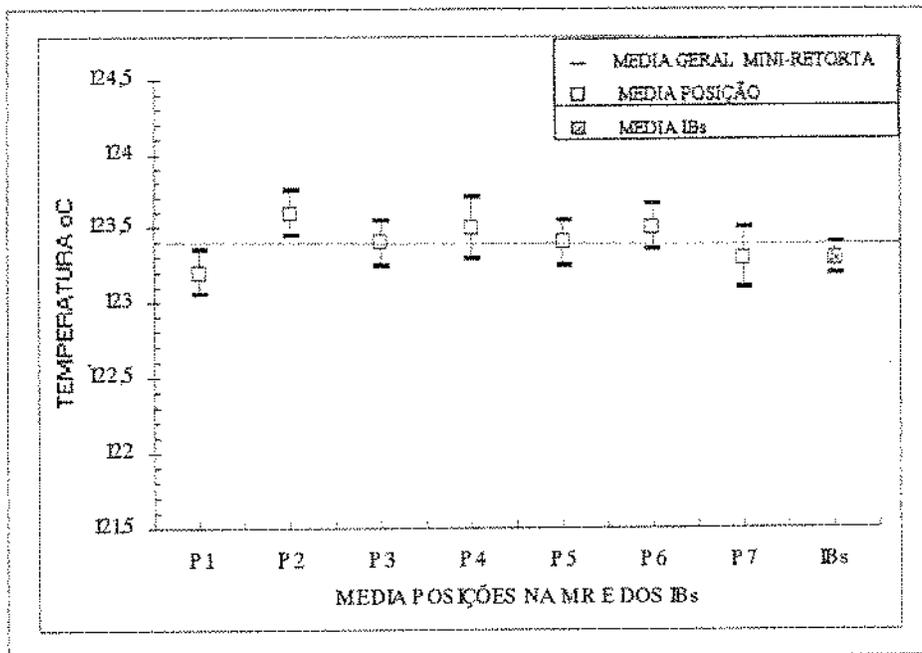


FIGURA 19 - Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por posição. Temperatura média obtida no tanque pulmão = 123,4 °C (D.P. = 0,2). IBs sem espaço livre

Nas Fig. 20 a 25 observa-se o estudo da estabilidade de temperatura no interior da MR, sendo que o efeito do espaço livre deixado nos IBs pode ser melhor visualizado nestes tipos de gráficos.

Nas figuras 20, 21 e 22 , que se referem aos ensaios realizados com os IBs ainda contendo espaço livre (IBs contendo 0,25 ml de suspensão de esporos), pode-se observar que as temperaturas médias dos IBs estiveram entre 0,2 a 0,6°C mais altas que as temperaturas médias dentro da MR. Isto ocorreu devido possivelmente a um efeito de sobre pressão desenvolvida no espaço livre do IB, conforme comentado na discussão da Tab.16 (resultados e discussão, item 4.2.3).

Como pode-se observar nas Fig. 23, 24 e 25, quando não foi deixado espaço livre (IBs com 0,3 ml de suspensão de esporos), as temperaturas médias dos IBs foram inferiores ou iguais às temperaturas no interior da MR e do pulmão de vapor.

Através destas figuras, também foi possível observar que a onda térmica de flutuação de temperatura do sistema ficou entre 2,5 a 3,0 min. A amplitude da oscilação observada ficou ao redor de 0,5°C, tendo estes resultados denotado precisão no controle, bem como homogeneidade suficiente no interior da MR para realização dos estudos aos quais foi destinada.

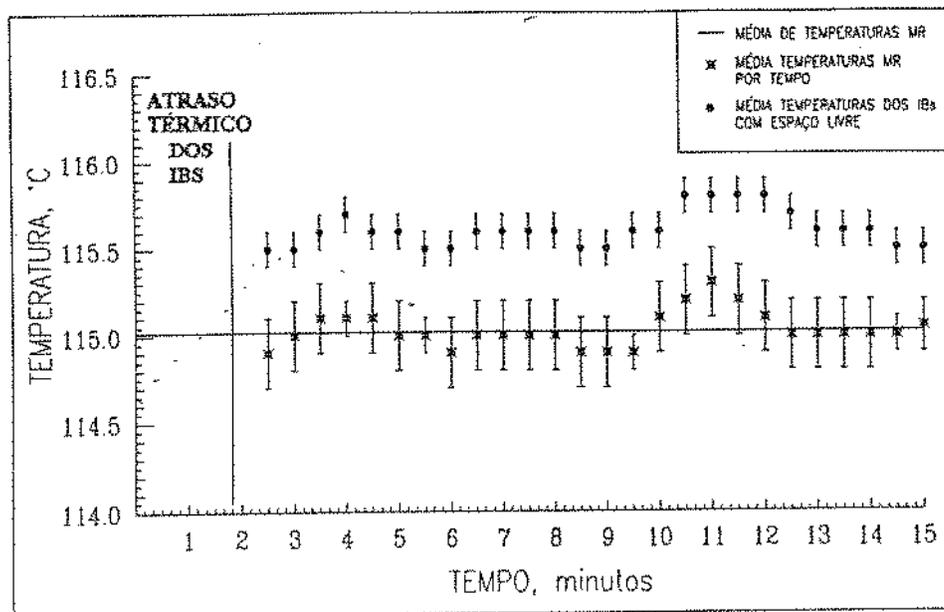


FIGURA 20 . Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 115,1 °C (D.P. = 0,1). IBs com espaço livre.

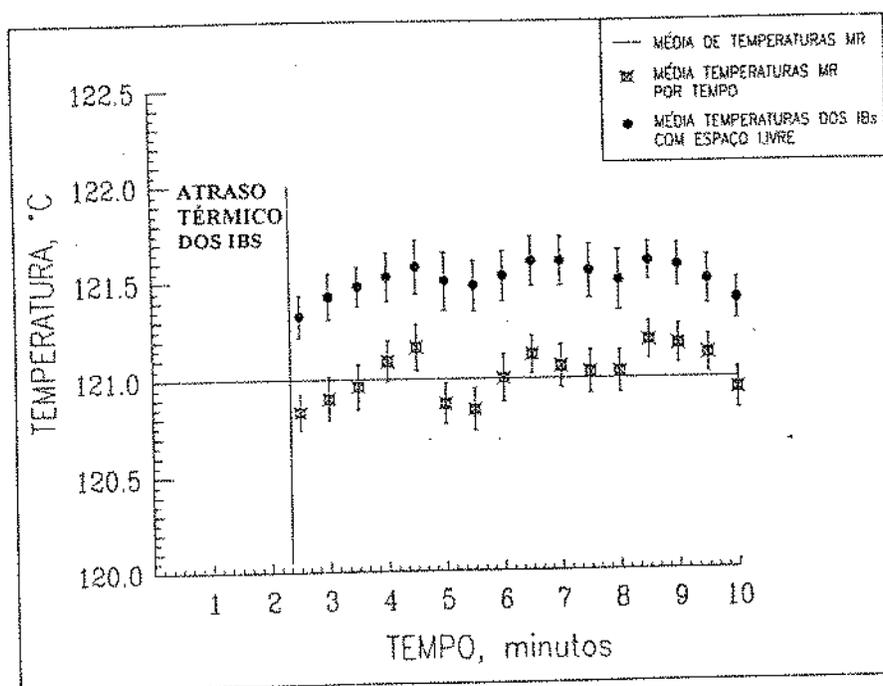


FIGURA 21 . Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 121,0 °C (D.P. = 0,2). IBs com espaço livre.

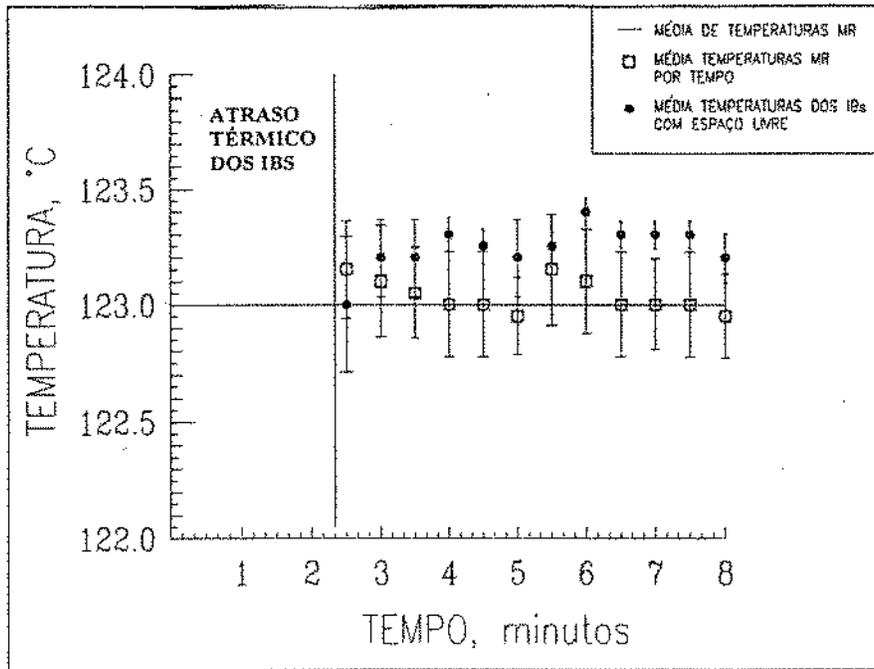


FIGURA 22 . Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 123,0 °C (D.P. = 0,2). IBS com espaço livre.

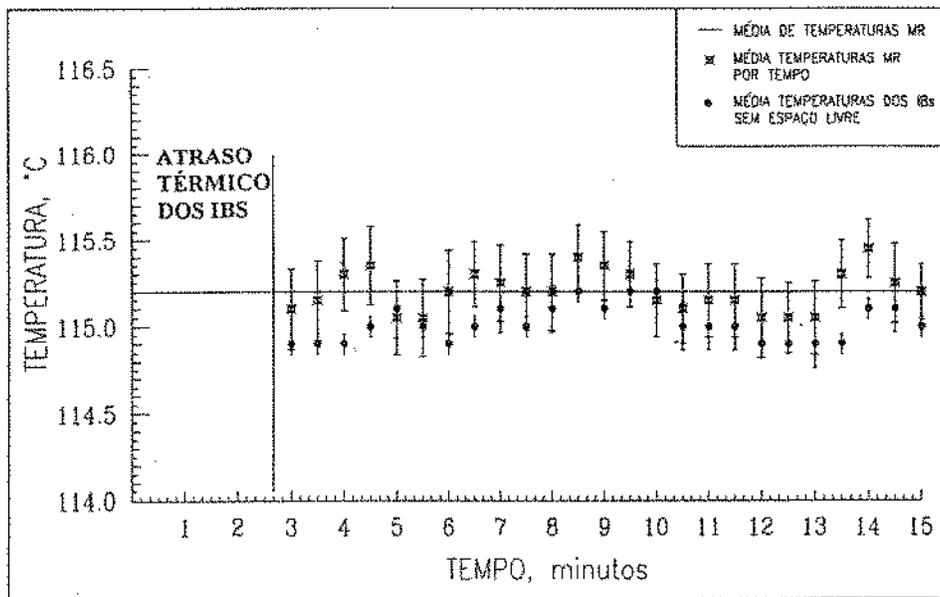


FIGURA 23 . Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 115,2°C (D.P. = 0,1). IBS sem espaço livre.

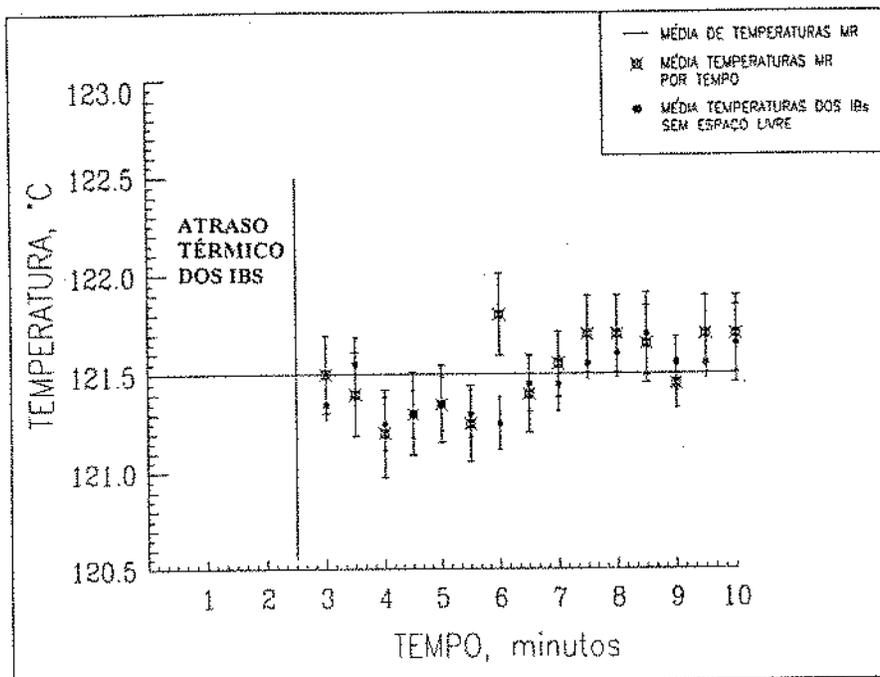


FIGURA 24 . Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 121,5 °C (D.P. = 0,2). IBs sem espaço livre.

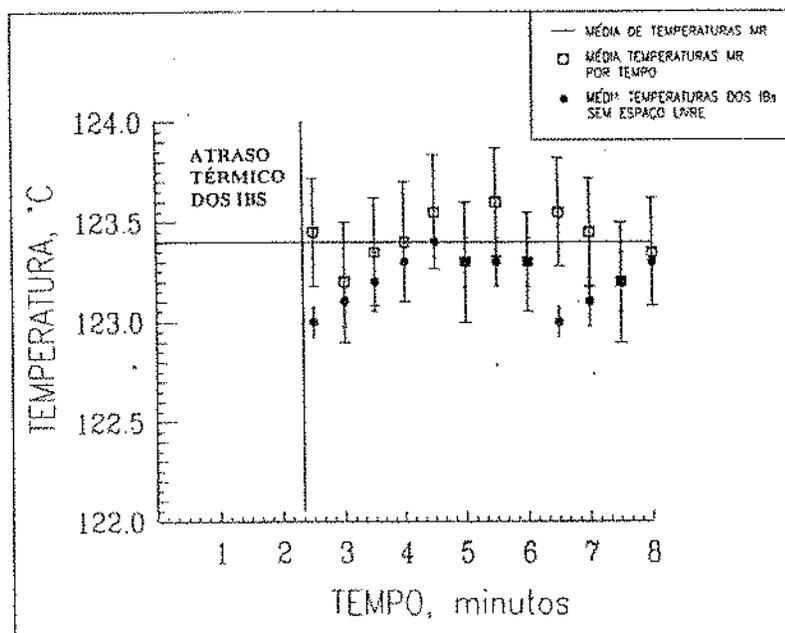


FIGURA 25 . Distribuição de calor na mini-retorta. Estudo por tempo. Tanque pulmão 123,4 °C (D.P. = 0,2). IBs sem espaço livre.

Na Tab. 15 foram resumidos os resultados dos ensaios de distribuição de calor na MR. Estão indicadas as temperaturas de ajuste do processo, as temperaturas médias obtidos no tanque pulmão, as médias de temperatura da MR, e as médias de temperatura do termômetro de referência da MR. Observou-se que as temperaturas do interior da MR ficaram muito próximas das temperaturas de ajuste e das médias do tanque pulmão, indicando que o controle da autoclave Dixie funcionou eficientemente para manter a temperatura homogênea durante os ensaios. Também são apresentadas a maior diferença encontrada entre as posições dentro da câmara (\neq MAX MR), e a diferença entre a temperatura média do termômetro de referência e a temperatura média da MR (\bar{x} MIG - \bar{x} MR). Somente a título de ilustração, nesta tabela foram incluídos os resultados dos ensaios em que foram utilizados IBs com espaço livre, e dos ensaios com IBs sem espaço livre. Estes estudos foram realizados em épocas diferentes, porém, uma vez que os gráficos apresentados se referem a estas duas situações, foi decidido mostrar estes resultados a fim de complementar as informações apresentadas.

Pode-se observar que a diferença máxima entre posições dentro da MR foi de 0,4 a 0,6 °C para os ensaios a 123,0 °C e 115,0 °C, e de 0,3 a 0,5 °C para 121,0° C, o que indica adequação do nosso equipamento para uso em estudos de cinética de destruição térmica de IBs, uma vez os critérios do NFPA (National Food Processors Association) para retortas à vapor, são de que não haja diferença superior a 0,9° C entre as posições dentro da câmara da autoclave a partir de um minuto após o tempo de subida, ou estabilização do sistema (RAMASWAMY et alii, 1991). Este órgão sugere também que se resultados diferentes destes forem encontrados, devem ser conduzidos procedimentos de alterações nos sistemas de circulação do vapor e desaeração da câmara, e/ou no sistema de distribuição ou disposição da carga no interior da retorta. As indicações da USP XXIII, (1995) para resistômetros para IBs são de que esta diferença esteja em torno de 0,5 °C.

Na Tab.15 pode se ainda observar que a máxima diferença encontrada entre as temperaturas obtidas no interior da MR e as temperaturas médias do termômetro de referência (MIG) durante os ensaios foram de 0,5 °C para os ensaios à 123,0°C, IBs com espaço livre. Para os outros estudos esta diferença ficou em torno de 0,3°C para as três temperaturas. As normas do NPFA, admitem diferenças não superiores a 1,8° C entre a temperatura do MIG e a temperatura média do interior da câmara , um minuto após o tempo de subida da autoclave e estabilização do sistema. Estes resultados também

demonstraram atuação satisfatória da MR construída. (CAMPBELL e RAMASWAMY 1992)

TABELA 15. RESUMO DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DE CALOR NA MINI-RETORTA

ESPAÇO LIVRE	TEMP. AJUSTE (°C)	\bar{X} VAPOR (°C)	\bar{X} MR (°C)	\bar{X} MIG (°C)	\neq MAX MR (°C)	\bar{X} MIG- \bar{X} MR (°C)
COM	115,0	115,1	115,1	115,5	0,4	0,4
COM	121,0	121,1	121,0	121,3	0,5	0,3
COM	123,0	123,2	123,0	123,5	0,6	0,5
SEM	115,0	115,1	115,2	115,4	0,6	0,2
SEM	121,0	121,2	121,5	121,8	0,3	0,3
SEM	123,0	123,4	123,4	123,6	0,5	0,2

LEGENDA:

COM ESPAÇO LIVRE = ENSAIO FEITO COM IBs COM 0,25 ML DE SUSPENSÃO DE ESPOROS

SEM ESPAÇO LIVRE = ENSAIO FEITO COM IBs COM 0,30 ML DE SUSPENSÃO DE ESPOROS

\bar{x} VAPOR = TEMPERATURA MÉDIA DO PULMÃO DE VAPOR

\bar{x} MR = TEMPERATURA MÉDIA NA MINI-RETORTA

\neq MAX MR = DIFERENÇA MÁXIMA ENTRE AS TEMPERATURAS DAS 7 POSIÇÕES ESTUDADAS DENTRO DA MINI-RETORTA

\bar{x} MIG - \bar{x} MR = DIFERENÇA ENTRE TEMPERATURA MÉDIA DOS TERMOMETRO DE REFERÊNCIA E TEMPERATURA MÉDIA DA MINI-RETORTA

4.2.3. Determinação do fator de atraso térmico dos IBs em mini-retorta

Conforme mostrado na Tab. 16, o tempo necessário para a MR atingir temperatura programada de processo (CUT), foi 10 segundos para ensaios à 121,0 e 123,0° C, e 5 segundos para 115,0° C. O fator de atraso térmico dos IBs com espaço livre foi de aproximadamente 2,5 minutos, e para os IBs sem espaço livre foi em média de 2,0 minutos. Nota-se ainda nesta tabela, que quando foi deixado espaço livre nos IBs, foram atingidas dentro da unidades, temperaturas superiores às temperaturas médias obtidas no interior da MR, (sendo as maiores diferenças para 115,0°C, de até + 0,6 ° C, e em média + 0,25 °C para as outras duas temperaturas estudadas). O ar deixado no tubo

provavelmente causou uma sobre pressão na cavidade interna do IB. Tendo sido constatado o super-aquecimento do sistema, decidiu-se pelo enchimento total das unidades, não deixando mais espaço livre. Observando-se estes valores pode-se então constatar que com este procedimento, os IBs atingiram temperaturas médias iguais (para os ensaios a 121,0 °C) ou inferiores às desenvolvidas na MR (nos estudos 115,0° C e 123,0 ° C).

RODRIGUEZ e TEIXEIRA, (1988) comparando atuação de dois modelos de IBs (IBs de plástico e IBs plástico-alumínio) na monitorização de processamentos térmicos para alimentos enlatados, observaram um aumento inesperado da temperatura no interior dos IBs plásticos até um nível acima das temperaturas desenvolvidas na retorta. Isto se deu por um breve período de tempo no início do esfriamento com contra pressão de ar (para evitar expansão das latas), imediatamente antes da entrada de água de esfriamento. Os autores aludiram tal comportamento a um amolecimento dos IBs plásticos a altas temperaturas de processo, o que o tornaria capaz de ser espremido quando sob pressão externa, sendo que esta pressão seria transmitida internamente ao seu conteúdo. Este aumento de pressão causaria um aumento concomitante na temperatura de acordo com a lei dos gases perfeitos da termodinâmica para compressão adiabática.

TABELA 16-DETERMINAÇÃO DO ATRASO TÉRMICO DOS IBs EM MINI-RETORTA. IBs COM E SEM ESPAÇO LIVRE

ESPAÇO LIVRE	TEMP. DE AJUSTE (°C)	TEMP MÉDIA DO PULMÃO (°C)	TEMP MÉDIA MR (°C)	TEMP MÉDIA IB (°C)	DIFERENÇA MÉDIA IB-MR (°C)	LAG IBs (MIN)	CUT (SEG)
COM	115,0	115,1	115,1	115,6	0,5	1,8	5
COM	121,0	121,1	121,0	121,3	0,3	2,0	10
COM	123,0	123,2	123,0	123,2	0,2	2,0	10
SEM	115,0	115,1	115,2	115,0	-0,2	2,6	5
SEM	121,0	121,2	121,5	121,5	0,0	2,5	10
SEM	123,0	123,4	123,4	123,3	-0,1	2,5	10

LEGENDA:

IBs COM ESPAÇO LIVRE = 0,25 ML DE SUSPENSÃO DE ESPOROS POR IB

IBs SEM ESPAÇO LIVRE = 0,30 ML DE SUSPENSÃO DE ESPOROS POR IB

TEMP MÉDIA = TEMPERATURA MÉDIA

LAG/IB = FATOR DE ATRASO TÉRMICOS DOS INDICADORES BIOLÓGICOS -VALOR EM MINUTOS

CUT = TEMPO DE SUBIDA DA MINI-RETORTA ATÉ TEMPERATURA PROGRAMADA .CALCULADO A PARTIR DA INJEÇÃO DE VAPOR NO INTERIOR DA CÂMARA

4.3. CINÉTICA DE DESTRUÇÃO TÉRMICA DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* ENCAPSULADA EM IBs E AQUECIDA EM MINI-RETORTA

4.3.1. Determinação da resistência térmica dos IBs na mini-retorta

Na Tab. 17 observa-se os resultados dos ensaios de cinética de destruição térmica da suspensão de *B. stearothermophilus* Série II , nos carregadores plásticos. Nesta tabela foram indicados a temperatura de ajuste do processo, e as condições obtidas com o sistema de operação da MR.

TABELA 17. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *B. stearothermophilus* (ATCC 7953) EM TAMPÃO FOSFATO DE BUTTERFIELD (50 X, 0,015M, pH 7.2) EM CARREGADORES PLÁSTICOS. ENSAIO REALIZADO EM MINI-RETORTA 121,0° C (± 0,2°C)

TEMP. AJUSTE (°C)	\bar{X} MR (°C)	VALOR-D (MIN)	R ²
115	115,1	18,58	0,98
118	118,1	5,53	0,97
121	121,0	2,67	0,96
123	123,2	1,18	0,94
Valor-z		7,2 °C	

\bar{X} MR = TEMPERATURA MÉDIA NO INTERIOR DA MINI-RETORTA
R² = COEFICIENTE CORRELAÇÃO DA RETA

Na Fig. 26 apresenta-se as curvas de sobreviventes obtidas para as quatro temperaturas estudadas : 115,0; 118,0; 121,0 ; e 123,0 °C. Estão indicados os pontos experimentais do número de sobreviventes obtidos em duas replicatas de cada temperatura estudada.

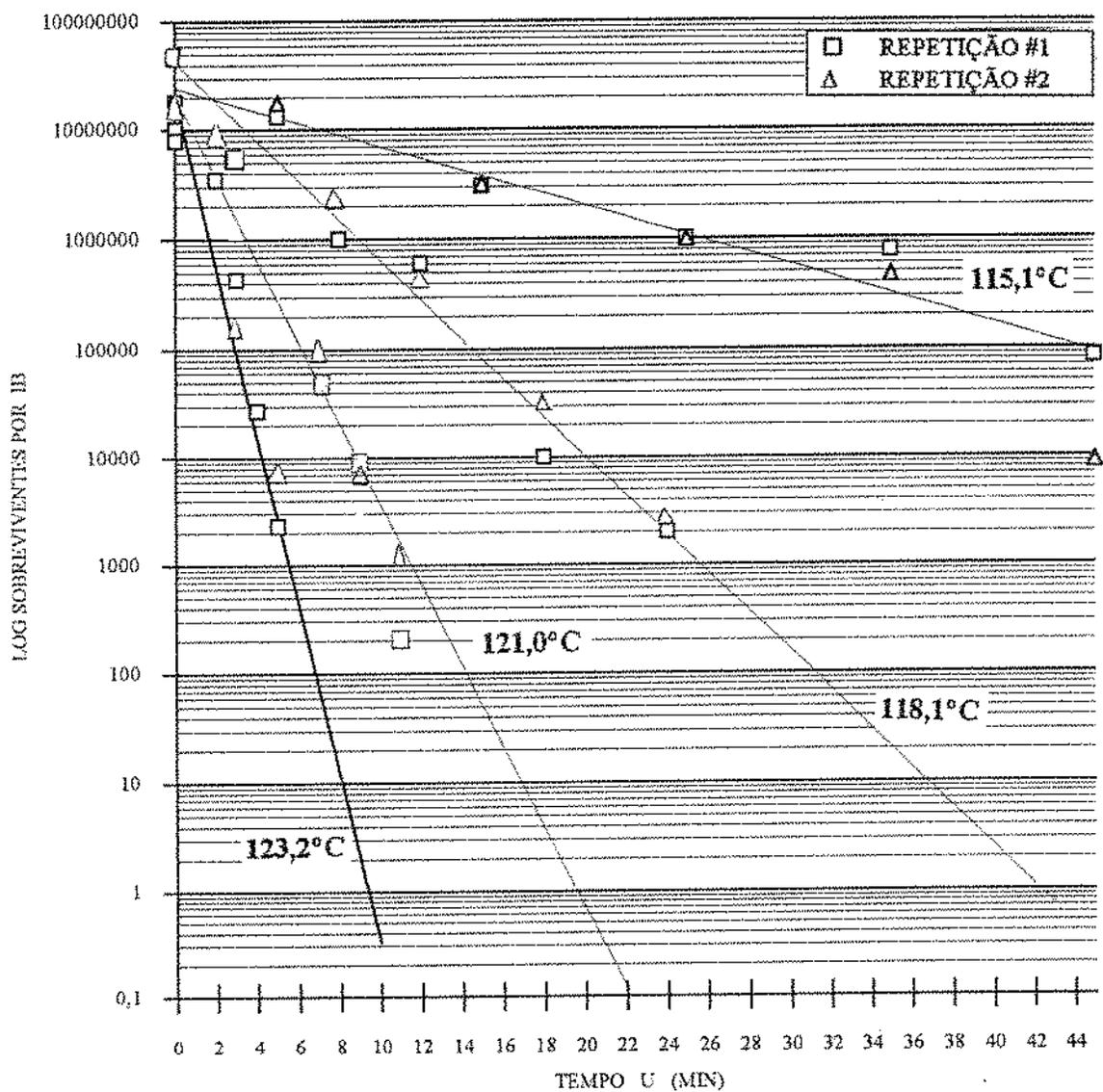


FIGURA 26 - Resistência térmica de suspensão de *B. stearothermophilus*, ATCC 7953, em carregadores plásticos. Ensaio em mini-retorta à 115,1; 118,1; 121,0 e 123,2 °C.

Na Fig 27 observa-se a curva "fantasma" de morte térmica da suspensão de *B. stearothermophilus* Serie II. O valor-z encontrado foi de 7,2 °C.

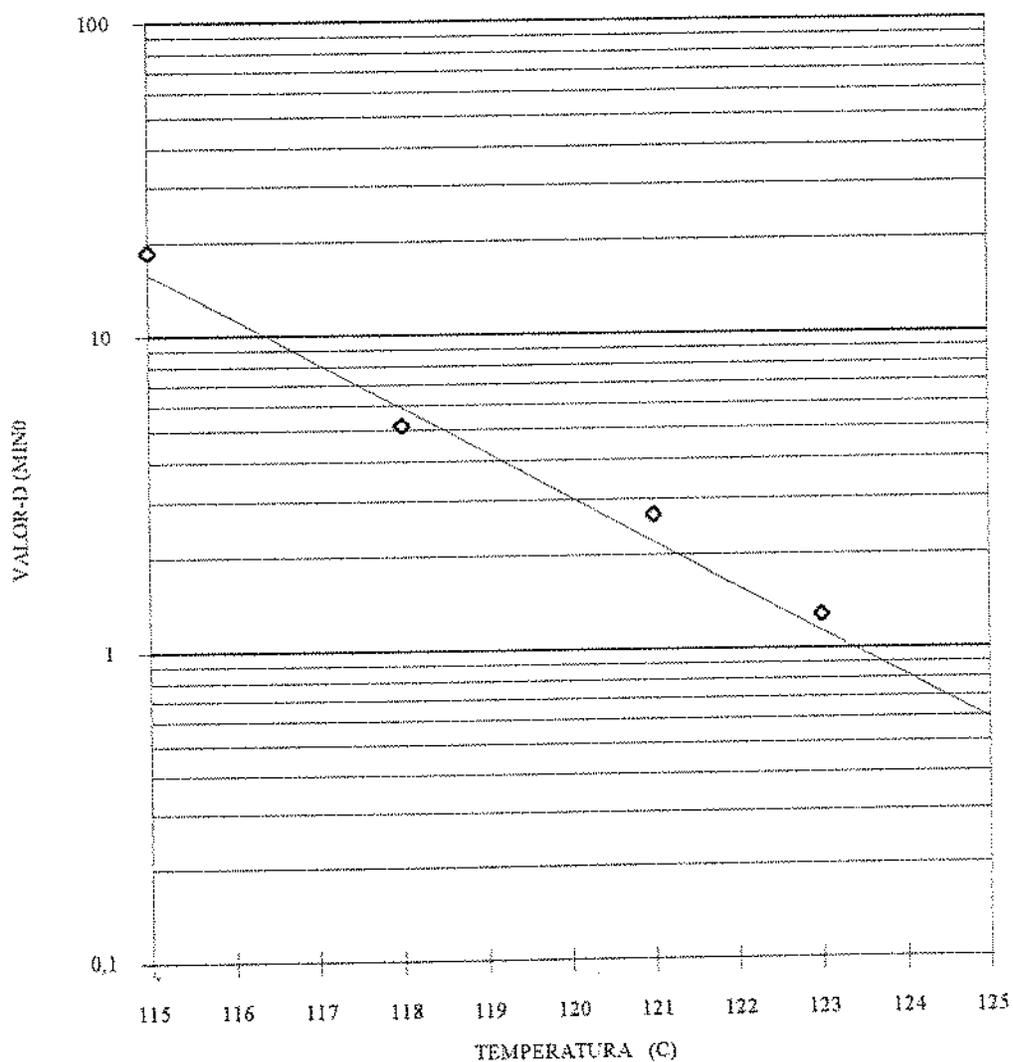


FIGURA 27 - Curva "fantasma" de morte térmica de *B. stearothermophilus* em tampão fosfato de Butterfield (50X), em carregadores plásticos. Valor-z 7,2 °C.

A resistência térmica da suspensão de *B. stearothermophilus* utilizada, conforme caracterização pelos valores D e z, está próxima aos valores citados na literatura para a mesma linhagem. PFLUG et alii (1980b) citam valor-z de 7,8 °C para suspensões de esporos do mesmo organismo em carregadores de Teflon (ensaios feitos em MR). Valores semelhantes também foram determinados por JOHNSON et alii (1977) e FEHEERY et alii (1987) para esporos da mesma linhagem suspensos em tampão de Butterfield, utilizando tubo TDT (tempo de morte térmica), sendo os valores-z determinados entre 8,0 e 8,5 °C

4.3.2-Calibração dos IBS na mini-retorta

Nas Figs. 28 e 29 apresentam as curvas de calibração dos esporos nos IBs à 121,0° C e 123,0° C, obtidas para quatro replicatas. Os dados experimentais de número de sobreviventes foram plotados em função do tempo de exposição às temperaturas de estudo (após subtração do atraso térmico dos IBs de 2,5 minutos). O polinômio de 2º grau que melhor se ajustou a estes dados foram:

a) para a curva à 123,2 °C :

$$\log \text{ de sobreviventes} = 7,2351 - 1,1677U + 0,00441U^2 \quad (\text{eq. 8})$$

$$R^2 = 0,95$$

b) para a curva à 121,0° C:

$$\log \text{ de sobreviventes} = 6,9266 - 0,4346U - 0,0094U^2 \quad (\text{eq.9})$$

$$R^2 = 0,96$$

onde,

U = valor de esterilização determinado à Tc, com base no valor-z específico do organismo indicador. Na prática $U = F(T_c, z_1)$

Os valores médios da temperatura na MR para os ensaios às duas temperaturas de estudo foram 121,0 ° C e 123,2.° C respectivamente. Observe-se que aos tempos finais de aquecimento , 11 e 14 minutos para 121,0 ° C, e 4 a 5,5 min para 123,0 ° C, existe maior dispersão entre as contagens dos sobreviventes nas repetições. Este fato pode ser atribuído ao número menor de sobreviventes recuperados, sendo que resultado semelhante foi também observado por PFLUG et alii (1980 b) quando calibrou suspensões de esporos da mesma linhagem utilizada neste trabalho também em carregadores plásticos em MR.

Decidiu-se por utilizar a curva a 121,0 °C por ter sido feita à temperatura mais próxima à de estudo. Com esta curva foi encontrado o valor de esterilização biológico aplicado no produto durante cada processamento, aplicando-se a correção em tres passos de PFLUG e CHRISTENSEN (1980). (ver resultados e discussão 4.6.2).

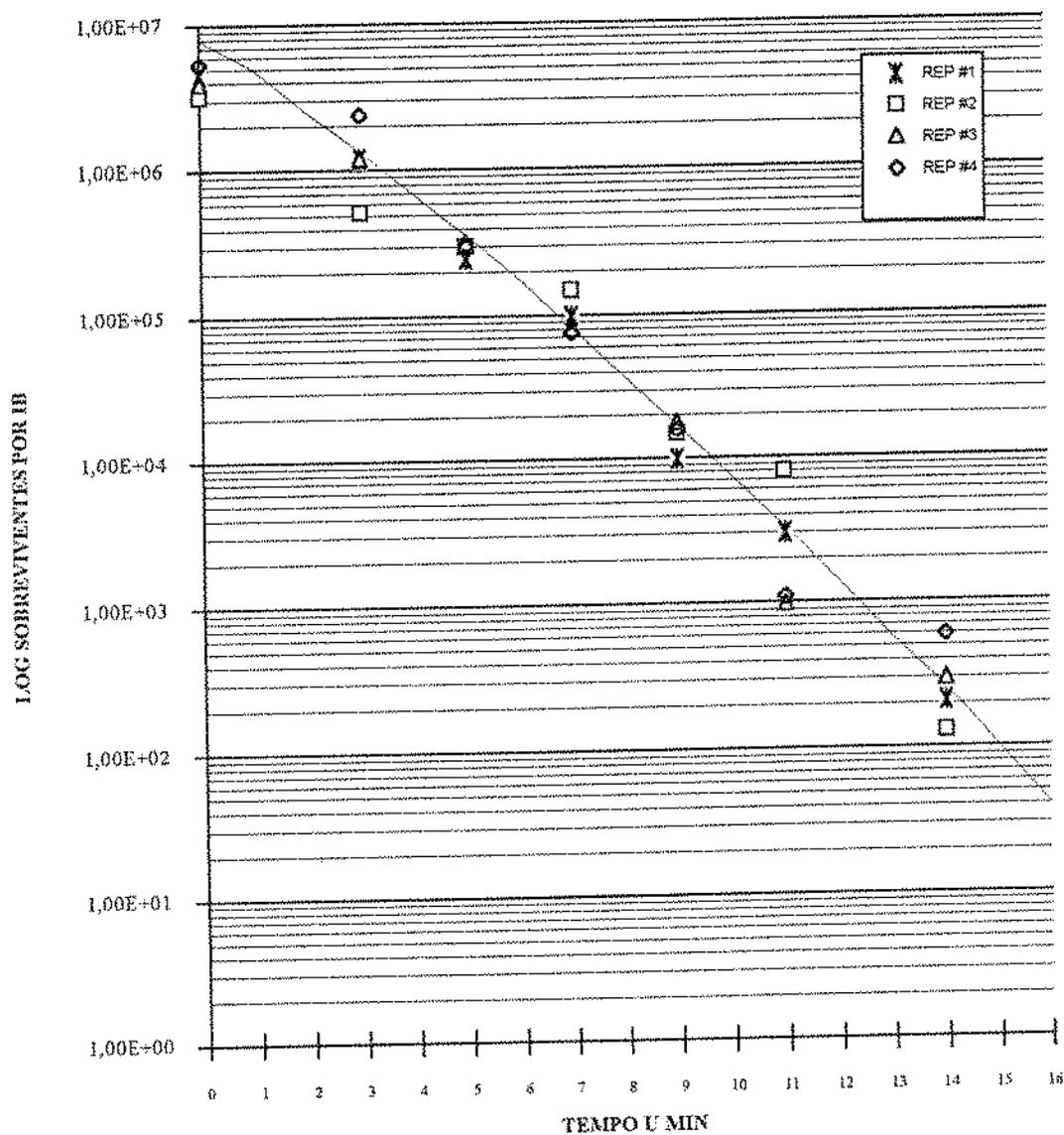


FIGURA 28 - Curva de calibração da suspensão de *Bacillus stearothermophilus* Série II em tampão fosfato de Butterfield (50X), encapsulada em carregadores plásticos. Ensaio em mini-retorta à 121,0 °C (±0,2)

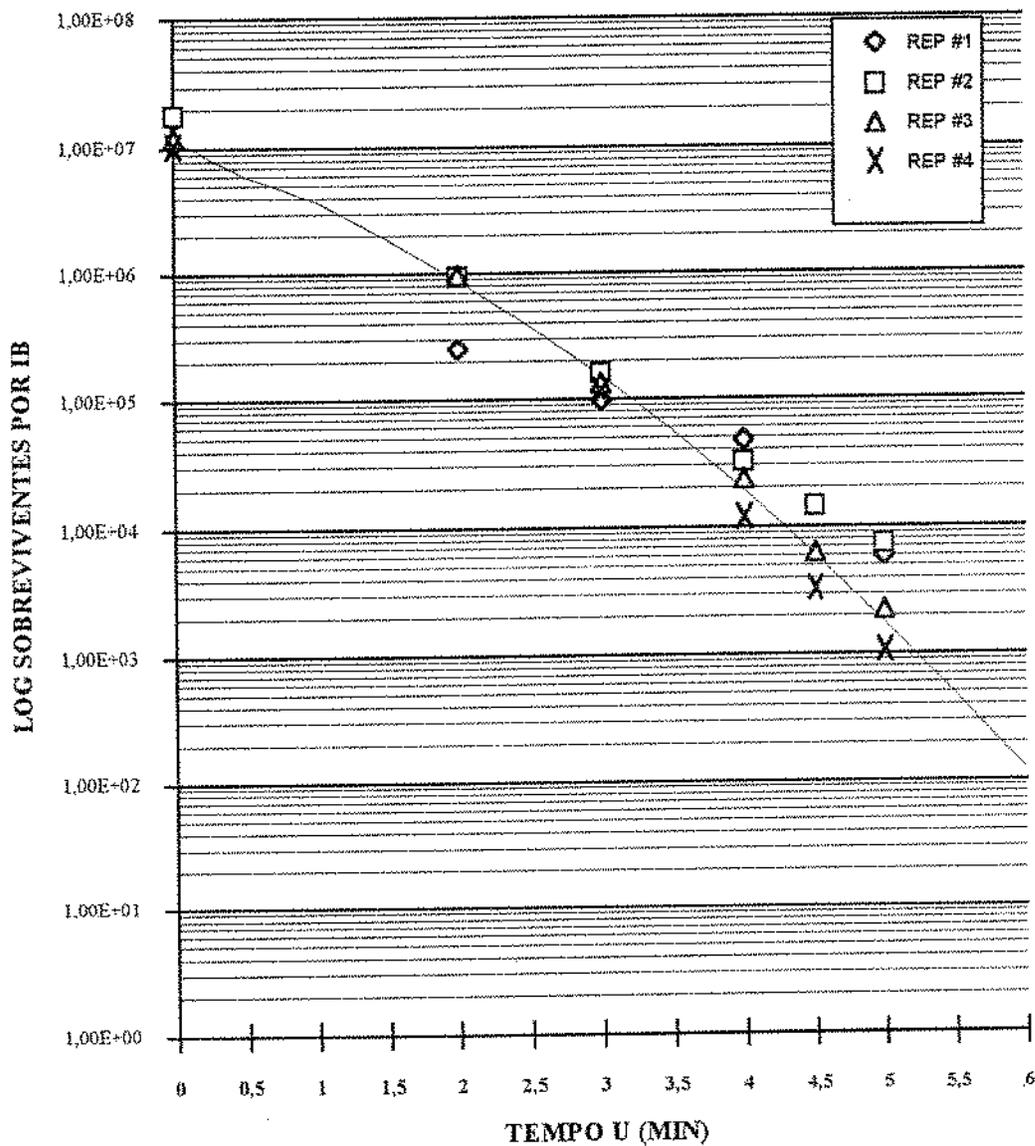


FIGURA 29 - Curva de calibração da suspensão de *Bacillus stearothermophilus* Série II em tampão fosfato de Butterfield (50X), encapsulada em carregadores plásticos. Ensaio em mini-retorta à 123,1 °C ($\pm 0,2$)

4.4. ESTUDO DA BIOCARGA DE TERMÓFILOS NO PRODUTO

4.4.1. Contagem de termófilos totais e produtores de acidez plana em cenoura fresca e em purê de cenoura

Os resultados da contagem de termófilos totais e organismos esporulados produtores de acidez plana suspeitos de *B. stearothermophilus* em cenoura fresca, estão resumidos na Tab 18.

Os resultados se referem à superfície da matéria prima, sendo que a contagem média para 5 amostras foi de $2,9 \times 10^2$ UFC por 10,0 g de produto de termófilos totais, e 14 UFC de organismos esporulados produtores de acidez plana suspeitos de *B. stearothermophilus* em 10,0 g de produto. Este resultado se assemelha aos encontrados por LEITÃO et alii, (1981) que analisaram dois lotes de cenouras frescas colhidas na região de São Paulo, e encontraram 100% para o primeiro lote analisado e 60% para o segundo lote contendo entre 0 e 10 UFC de *B. stearothermophilus* por grama de produto, e 40% do segundo lote contendo entre 10 e 100 UFC de *B. stearothermophilus* por grama de produto.

TABELA 18. CONTAGEM TOTAL DE TERMÓFILOS EM SUPERFÍCIE DE CENOURA CRUA FRESCA.

AMOSTRA No	PESO DA AMOSTRA (g)	TERMÓFILOS TOTAIS (UFC/10 g)	FLAT-SOUR TERMOFÍLICO (UFC/10 g)
1	42,28	$2,2 \times 10^2$	20
2	53,56	$2,6 \times 10^2$	5
3	51,77	$3,7 \times 10^2$	10
4	70,91	$3,5 \times 10^2$	10
5	50,70	$2,6 \times 10^2$	25
MÉDIA		$2,9 \times 10^2$	14

A contagem média para 5 amostras de purê diluído (1:1) foi de 97 esporos de termófilos totais/10 g produto, e 13 esporos de organismos produtores de acidez plana suspeitos de *B. stearothermophilus* por 10,0 g de produto. Considerando o processamento do produto em

latas com 334,0 g de purê diluído, a carga de termófilos totais foi de $3,2 \times 10^3$ esporos/lata, e a concentração de organismos esporulados produtores de acidez plana suspeitos de *B. stearotherophilus* foi $4,3 \times 10^2$ esporos/lata.

TABELA 19. CONTAGEM TOTAL DE TERMÓFILOS EM PURÊ DE CENOURA DILUÍDO

AMOSTRA No	TERMÓFILOS TOTAIS (UFC/10 g)	FLAT-SOUR TERMOFÍLICO (UFC/10 g)
1	$1,6 \times 10^2$	25
2	$5,0 \times 10^1$	10
3	$6,0 \times 10^1$	15
4	$6,5 \times 10^1$	5
5	$1,5 \times 10^2$	10
MÉDIA	$9,7 \times 10^1$	13

Considerando-se uma população inicial de $4,3 \times 10^2$ esporos/lata de produto, e sendo o ponto final de preservação para conservas tropicais (armazenadas à temperaturas acima de $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$) $PUNE = 10E-6$, oito reduções decimais foram requeridas para assegurar a estabilidade microbiológica do produto. Para o processo com $PUNE-T = 10E-3$ (armazenamento à temperaturas abaixo de $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$), cinco reduções da carga inicial foram necessárias.

4.4.2. Seleção do organismo termofílico produtor de acidez plana isolado de cenoura fresca mais termo-resistente

Para esta fase foram selecionados 13 isolados de cenoura fresca com crescimento positivo à $65,0 \text{ }^\circ\text{C}$, e resultado negativo para os testes de VP e crescimento em anaerobiose. (GALO, 1990, FIELDS, 1970)

Na Tab. 20 são mostrados os resultados obtidos nos ensaios de seleção dos suspeitos de *B. stearothermophilus* mais termo-resistentes. O isolado mais termoresistente foi o de No 10, sendo o único a apresentar crescimento em caldo TSB à 55,0°C após exposição à 120,0 °C por 10 minutos.

TABELA 20. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE SELEÇÃO DO *B. stearothermophilus* MAIS TERMO-RESISTENTE, ISOLADO DE CENOURA CRUA FRESCA.

ISOLADO No	TEMPERATURAS DE ESTUDO (C)								
	117,0			119,0			120,0		
	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (MIN)								
	50	70	10	15	20	5	10	15	
1	+	+	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	-	-	+	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	-	-	-	-	-	-	
5	+	+	-	-	-	-	-	-	
6	+	+	+	+	-	+	-	-	
7	+	+	+	+	-	-	-	-	
8	+	+	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	+	-	+	+	-	
11	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	
13	+	+	-	-	-	-	-	-	

LEGENDA:

+ = CRESCIMENTO, TURBIDEZ E FORMAÇÃO DE PRECIPITADO NO FUNDO DO TUBO

- = NÃO HOUVE CRESCIMENTO

4.4.3. Resistência térmica do isolado mais termo-resistente em purê de cenoura

A cinética de destruição térmica do isolado No 10 foi estudada em purê de cenoura com o objetivo de utilizar estes resultados na determinação do valor de esterilização requerido pelo produto de acordo com a especificação do processo. Na Tab. 21 observa-se os valores-D das três temperaturas e as equações das curvas de sobreviventes. Na Fig.30,

pode-se observar as duas curvas de sobreviventes e os pontos experimentais regressionados para determinação das mesmas.

TABELA 21. DETERMINAÇÃO DO VALOR-D DO ISOLADO Nº 10 EM PURÊ DE CENOURA PH = 5,3. TUBO TDT. BANHO DE ÓLEO.

TEMPERATURA (C)	VALOR-D (MIN.)	EQUAÇÃO DA RETA	R ²
118,0	3,20	$\log N = 6,28 - 0,312t$	0,93
121,0	1,75	$\log N = 6,02 - 0,568t$	0,93

A resistência térmica de *B. stearothermophilus* em alimentos de baixa acidez, apresenta grande variação entre linhagens. É conhecido que em pH menores que seu ótimo de crescimento, a resistência térmica dos esporos reduz. GAZE et alii, (1990) relatam que para *B. stearothermophilus* FS 2223 em mistura de batata-alginato o valor- $D_{120,0}^{\circ C}$ encontrado foi 3,1 min e $D_{125,0}^{\circ C}$ foi de 2,2 min, enquanto que para FS 210 no mesmo produto o valor- $D_{120,0}^{\circ C}$ foi de 7,33 min. BARRY e BRADSHAW (1980) encontraram para *B. stearothermophilus* 1503 em sopa de aipo condensada, valor- $D_{121,0}^{\circ C}$ de 3,8 min. A mesma linhagem em solução de amido 7% apresentou valor- $D_{121,0}^{\circ C}$ de 2,5 min e $D_{118,0}^{\circ C}$ de 5,9 min. (BERRY e BRADSHAW, 1986).

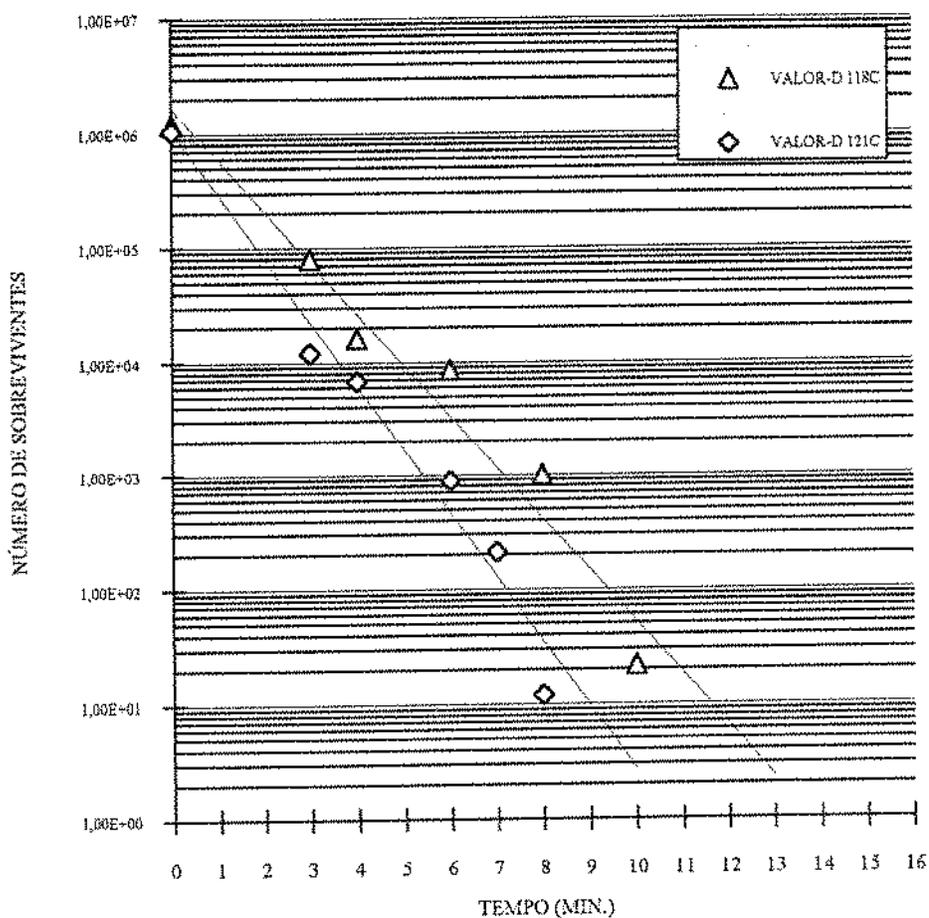


FIGURA 30 - Curvas de morte térmica do isolado No 10 em purê de cenoura. Estudo feito às temperaturas de 118,0 e 121,0°C

4.5. ESTUDO DA RETORTA ROTOPAX

4.5.1-Estudos de distribuição de calor na retorta Rotopax

Uma vez que o equipamento era novo, houve necessidade de se fazer este estudo para que se pudesse determinar o padrão de distribuição de temperatura na cesta, nas condições de estudo - ou seja, com somente uma prateleira, e assim, localizar a região de aquecimento mais lento (ponto frio), para que os recipientes fossem posicionados nesta região nos ensaios subsequentes.

Os dados obtidos nos estudos de distribuição de calor foram tabulados e utilizados no preparo de diversos gráficos de distribuição da temperatura por tempo e por posição no interior da retorta.

Na Tab 22 são apresentados os resultados do estudo de uniformidade de distribuição de calor na cesta para as três temperaturas de estudo. Isto foi feito através da observação da faixa de variação de temperatura dentro da cesta, calculada pela diferença entre a temperatura registrada na posição mais quente e a da posição mais fria, a partir de 1 minuto após o tempo de subida da retorta até temperatura programada. Os resultados apresentados se referem às médias de três replicatas para cada temperatura estudada. Pode-se observar que a variação ao longo do tempo foi pequena, sendo que para 123,0 , 121,0 e 115 °C, a variação média ficou em torno de 0,3 °C. PARK et alii (1990) relatam que para retortas agitadas de imersão total em água, diferenças da ordem de 1,5 a 2,0°C são comuns. Os requerimentos do NPFA (1985 citado por CAMPBELL e RAMASWAMY, 1992) são de que esta diferença não seja superior a 0,9 ° C após estabilização da temperatura no interior da retorta. Desta forma, os resultados aqui apresentados se mostram satisfatórios em relação à uniformidade de distribuição de temperatura na cesta durante o período de cozimento.

Quando a variação entre estes valores médios das diferentes posições dentro da retorta é maior que a requerida pelo NPFA, há necessidade de modificações do sistema de confinamento dos recipientes no interior da retorta incluindo desenho e disposição do suporte para embalagens (PARK et alii, 1990; RAMASWAMY et alii 1991). Para o projeto dos processos térmicos seguros, o conhecimento da zona mais fria dentro da retorta é fundamental uma vez que a determinação dos parâmetros de processamento térmico deve ser feita na zona de aquecimento mais lento da retorta. (PFLUG, 1975; TUNG et alii 1986; RAMASWAMY et alii 1991)

TABELA 22 UNIFORMIDADE DE DISTRIBUIÇÃO DE TEMPERATURA DENTRO DA CESTA DA RETORTA ROTOPAX DURANTE FASE DE ESTERILIZAÇÃO III

TEMPO ^a	DIFERENÇA DE TEMPERATURA MAX-MIN (°C) ^b		
	TEMPERATURA PROGRAMADA (°C)		
	123	121	115
0-1	0,40	0,30	0,50
1-3	0,43	0,26	0,40
3-5	0,43	0,26	0,23
5-7	0,43	0,26	0,23
7-9	0,43	0,20	0,30
9-11	-	0,25	0,23
11-13	-	-	0,20
13-15	-	-	0,20

a = TEMPO EM MINUTOS APÓS TEMPO DE SUBIDA DA RETORTA ATÉ TEMPERATURA PROGRAMADA PARA TRABALHO

b = DIFERENÇA ENTRE TEMPERATURA MÁXIMA E MÍNIMA NA CESTA

As Figs. 31 a 33 são exemplos típicos de estudos da estabilidade da temperatura na retorta feitos à 115,0, 121,0 e 123,0°C. Nestes gráficos, são mostradas as temperaturas médias no interior da retorta em cada tempo registrado, durante a fase de esterilização III. Observa-se que houve pequena variação no interior da cesta, por entre a prateleira, e que a oscilação de temperatura durante o período de manutenção à temperatura de aquecimento (esterilização III), foi bastante reduzida, apresentando uma variação média de 0,3 °C. PARK et alii. (1990) relatam que variações entre 0,5 a 0,9 °C durante o período de cozimento é comportamento típico de retortas agitadas. Através destes estudos verificou-se a capacidade do sistema de controle da retorta em manter as condições desejadas durante o processo. Oscilações de temperatura são comuns à todos sistemas de controle, e as estas estabilizam depois que a retorta atinge estado estacionário. A amplitude da oscilação indica a precisão dos sistema de controle.

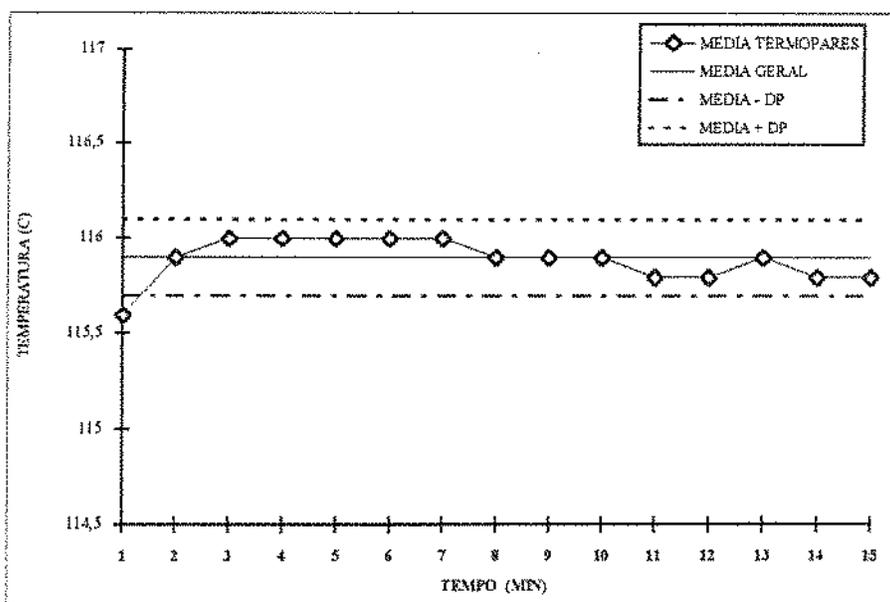


FIGURA 31 - Estabilidade de temperatura em retorta rotativa Rotopax, durante ensaio à 115,9° C. As três linhas paralelas representam a temperatura média geral dentro da retorta (centro) e a média acrescida (superior) e subtraída de um desvio padrão (inferior). (D.P. = 0,2)

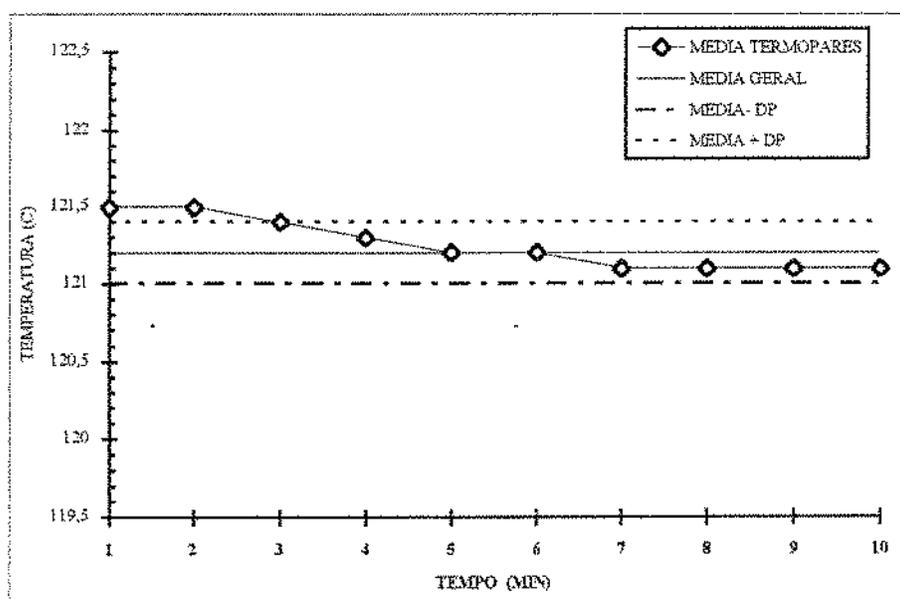


FIGURA 32 - Estabilidade de temperatura em retorta rotativa Rotopax, durante ensaio à 121,2° C. As três linhas paralelas representam a temperatura média geral dentro da retorta (centro) e a média acrescida (superior) e subtraída de um desvio padrão (inferior). (D.P. = 0,2)

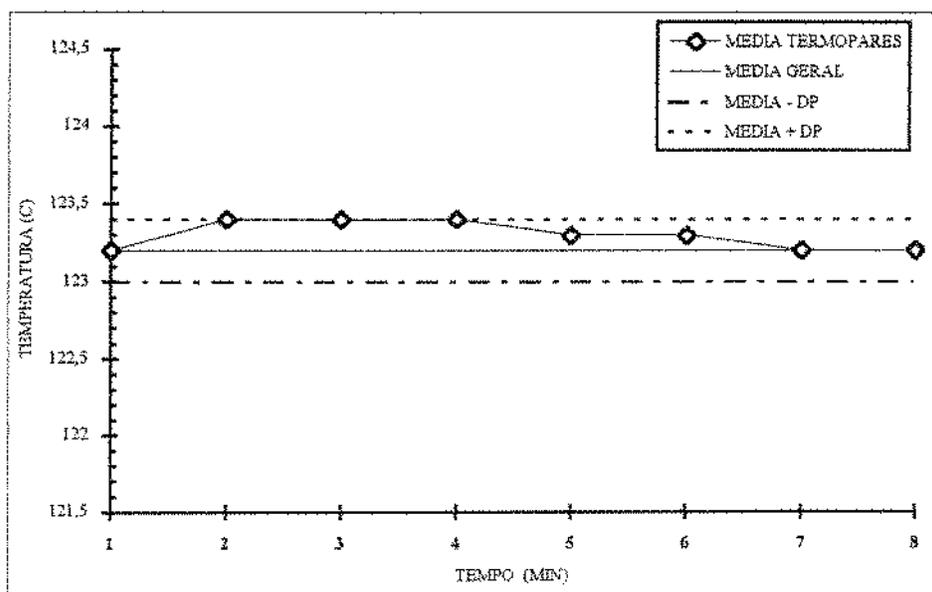


FIGURA 33 - Estabilidade de temperatura em retorta rotativa Rotopax, durante ensaio à 123,2°C. As três linhas paralelas representam a temperatura média geral dentro da retorta (centro) e a média acrescida (superior) e subtraída de um desvio padrão (inferior). (D.P. = 0,2)

Na Tab.23 observa-se os resultados obtidos para cada uma das temperaturas estudadas em relação à posição mais fria de cada ensaio, a temperatura média geral e desvio padrão do ensaio, temperatura média do MIG (termômetro de referência), e do RTD, e a diferença entre a média obtida após estabilização do equipamento e o MIG. Estes resultados mostram que as temperaturas lidas no MIG são em média 1,0°C mais baixas que as obtidas no interior da cesta. Isto deve-se ao fato da localização da sonda situada no dreno do tanque de trabalho. O NPFA sugere que a diferença máxima entre o MIG e a média no interior da retorta não ultrapasse a 1,8 °C após a estabilização da temperatura na retorta. Nota-se ainda, que as temperaturas do RTD, que controla a injeção de vapor no tanque de trabalho, estão em média 0,7°C acima da temperatura média geral dos ensaios. Isto se explica pela localização do RTD imediatamente após a saída do injetor de vapor, na linha de entrada para o tanque de trabalho. O controle de temperatura permite obter uma temperatura média geral na cesta a $\pm 0,5^\circ\text{C}$ da temperatura programada para o ensaio.

Observa-se também na Tab. 23, que para as três temperaturas estudadas, a posição mais fria esteve localizada na frente da cesta próximo à porta, deslocando-se para o centro. As médias das temperaturas registradas na posição mais fria estiveram em torno de 0,3 °C abaixo da temperatura média da retorta durante a fase de esterilização III.

TABELA 23. RESUMO GERAL DA DISTRIBUIÇÃO DE TEMPERATURA EM RETORTA ROTATIVA ROTOPAX*

TEMP. DE AJUSTE (°C)	LOCALIZAÇÃO POSIÇÃO MAIS FRIA	MÉDIA POSIÇÃO MAIS FRIA (°C)	MÉDIA GERAL (°C)	DESVIO GERAL (°C)	RTD ^a (°C)	MIG ^b (°C)	\bar{X} GERAL - \bar{X} MIG ^c
115,0	MEIO/CENTRO	115,6	115,9	0,2	116,6	114,9	0,9
115,0	FRENTE/CENTRO	115,3	115,5	0,1	116,1	114,6	0,9
115,0	FRENTE/LADO	115,4	115,7	0,2	116,5	114,5	1,1
121,0	FRENTE/CENTRO	121,4	121,7	0,2	122,1	120,5	1,2
121,0	MEIO/CENTRO	121,0	121,2	0,3	122,1	120,2	0,6
121,0	MEIO/CENTRO	121,1	121,7	0,2	122,5	120,5	1,2
123,0	FRENTE/LADO	123,0	123,2	0,2	124,0	122,6	1,1
123,0	FRENTE/CENTRO	123,3	123,5	0,2	124,0	122,2	1,0
123,0	FRENTE/CENTRO	123,6	123,9	0,1	124,6	122,5	1,1

LEGENDA:

* MÉDIA DE TRÊS REPETIÇÕES

^a RTD = TEMPERATURA MÉDIA DO RTD

^b MIG = TEMPERATURA DO TERMÔMETRO DE REFERÊNCIA DA RETORTA

^c \bar{X} GERAL - \bar{X} MIG = DIFERENÇA ENTRE A TEMPERATURA MÉDIA DA RETORTA E A TEMPERATURA MÉDIA DO MIG

Foram também preparados gráficos para estudo da uniformidade de distribuição da temperatura no interior da cesta, onde podem ser observadas as temperaturas médias durante o período de esterilização, nas seis posições estudadas.

As Figs. 34 a 36 são exemplos típicos deste tipo de estudo realizado à 115,0, 121,0 e 123,0 °C. Cada ponto indica a média de temperatura de cada posição com seu desvio padrão (acima e abaixo) , e a linha inteira representa a média geral do ensaio. (ver Tab.5 e Fig. 8 no item 3.9.3 de Materiais e métodos para localização das posições)

Para as três temperaturas programadas, a região frontal (na frente da prateleira - perto da porta - tanto na fileira do centro quanto na lateral), e a região central (no meio da prateleira, na fileira central), foram identificadas como as mais frias, tendo as temperaturas médias destas posições ficado abaixo da linha da temperatura média geral do ensaio. Este resultado está de acordo com o relatado por PARK et alii. (1990), que indicaram que para retortas agitadas como a "Rotomat" (FMC) e a "Rotopax" (ALLPAX) , devido à uniformidade do sistema, a região mais fria pode se localizar em qualquer ponto dentro da cesta, porém, em geral, situa-se na região central.

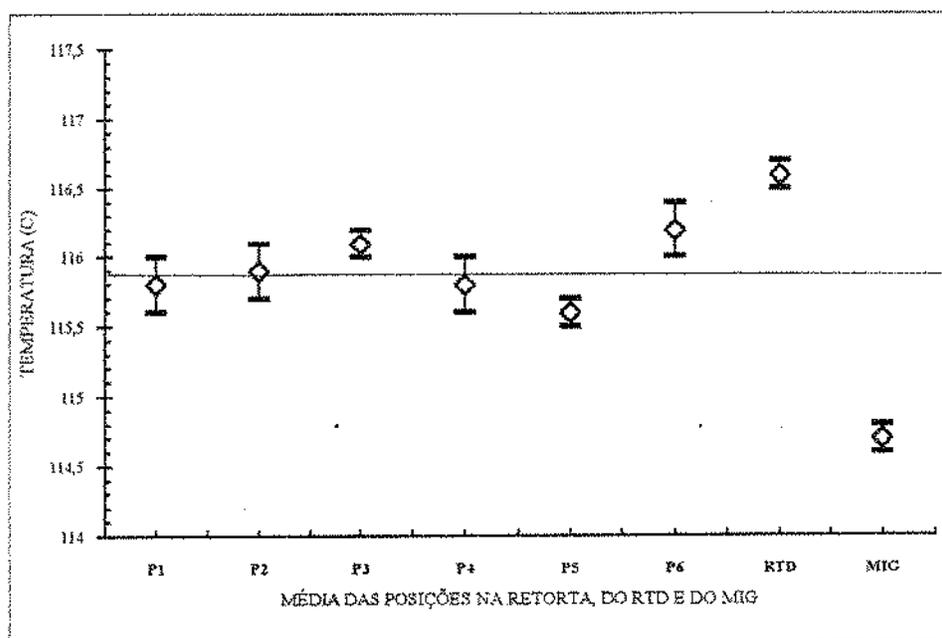


FIGURA 34 - Estudo da distribuição de temperatura por posição durante o período de esterilização III . Ensaio à 115,9 °C. (D.P. = 0,2)

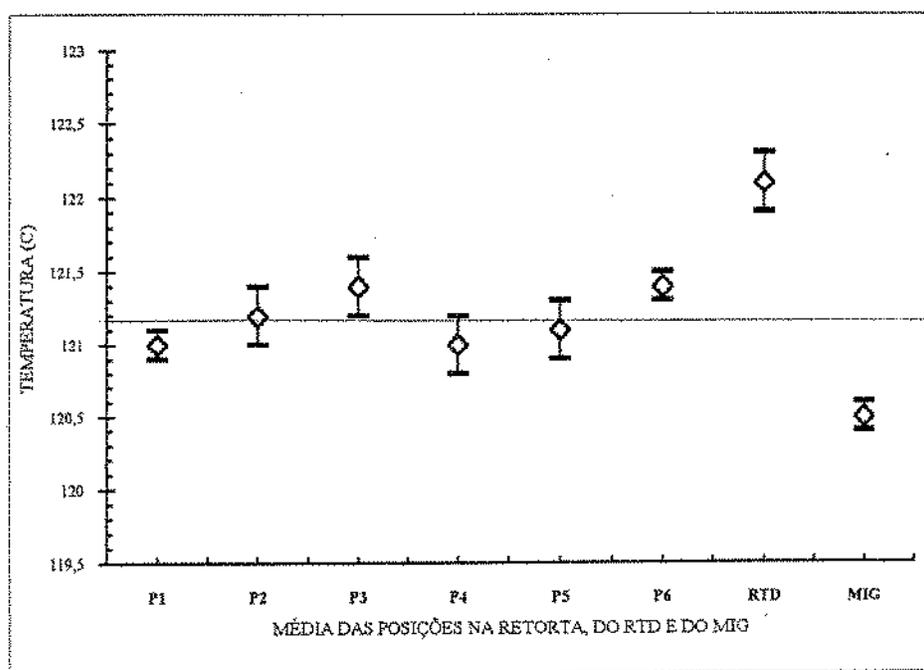


FIGURA 35 - Estudo da distribuição de temperatura por posição durante o período de esterilização III . Ensaio à 121,2 °C. (D.P. = 0,2)

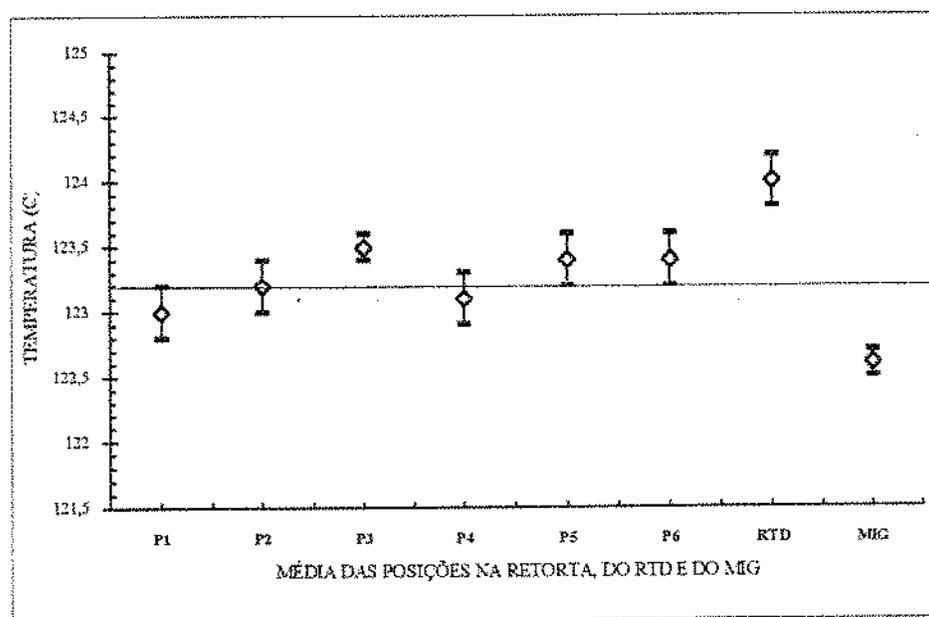


FIGURA 36 - Estudo da distribuição de temperatura por posição durante o período de esterilização III . Ensaio à 123,2 °C. (D.P. = 0,2)

4.6. COMPARAÇÃO DE FO-BIO E FO-FIS

4.6.1 Estudo da penetração de calor em purê de cenoura

Os resultados obtidos nos estudos de penetração de calor estão resumidos na Tab.24, (e mostrados na íntegra no Apêndice 2, de "Parâmetros de penetração de calor"). Nota-se que o aquecimento do produto mostra uma curva quebrada, com duas taxas e aquecimento, (fh_1 e fh_2 , ver Fig. 37). Para as duas temperaturas estudadas, os valores de fh_1 , referente a primeira porção da parte retilínea da curva de aquecimento, são maiores que fh_2 , referente à segunda porção da mesma curva. Isto denota aquecimento mais lento no início do processo seguido de uma fase mais rápida de aquecimento convectivo. Observa-se que a taxa de esfriamento é maior que a taxa de aquecimento, possivelmente devido às limitações de fluxo de água de esfriamento da instalação.

TABELA 24. RESUMO DOS PARÂMETROS DE PENETRAÇÃO DE CALOR EM PURÊ DE CENOURA PROCESSADO EM LATAS 73,0 mm x 91,0 mm. 10 % ESPAÇO LIVRE

TEMP. MÉDIA NA RETORTA (°C)	ENSAIO/ REPLICATA	fh_1^a MIN.	fh_2^b MIN.	fc MIN.	jh_1	jc
121,5	SERIE I/R1	8,9	5,2	29,2	2,3	1,4
121,5	SERIE I/R2	9,2	5,2	31,9	2,7	1,3
121,6	SERIE II/R1	8,5	4,8	29,5	2,8	1,3
121,6	SERIE II/R2	8,3	4,6	29,4	3,5	1,3
115,5	SERIE I/R1	9,3	4,0	31,0	2,3	1,3
115,4	SERIE I/R2	8,3	4,2	30,9	2,4	1,2
115,5	SERIE II/R1	9,4	5,2	31,7	2,7	1,3
115,5	SERIE II/R2	8,6	4,2	31,2	4,1	1,3

a = TAXA DE AQUECIMENTO PARA A PRIMEIRA PORÇÃO DA CURVA

b = TAXA DE AQUECIMENTO PARA A SEGUNDA PORÇÃO DA CURVA

Os valores obtidos indicam que com 10% de espaço livre, a convecção forçada no purê de cenoura diluído processados nas latas 73,0 mm D.I. x 91,0 mm h, somente ocorreu após os primeiros minutos de esterilização, onde predomina a natureza condutiva do produto, tendo este tempo sido de 8 a 10 minutos para as temperaturas estudadas.

Resultados similares foram obtidos por BERRY e BRADSHAW (1980) trabalhando com retortas rotativas, que encontraram altos valores j_h , o que levou-os à conclusão de que o produto apresentava predominância de um padrão de aquecimento por condução no início do processo. Estes autores sugerem que a convecção forçada de alimentos viscosos, em baixas rotações, começa somente após determinado tempo de aquecimento (em geral de 6 a 10 minutos) quando as forças viscosas do produto são superadas pela força de inércia, induzida pela agitação da lata. Estas forças são relacionadas com a consistência do produto. Os autores encontraram que para sopa de aipo processada em retorta agitada contínua ("Sterilmatic" FMC) em latas 404 x 700, o espaço livre não influenciou a agitação no centro geométrico da lata nos primeiros estágios (valores j_h altos), e que somente após um determinado tempo é que a agitação da bolha formada pelo espaço livre aumenta a temperatura no centro da lata (baixo j_h) seguido normalmente de curva quebrada.

A mesma natureza de resultados foram encontrados por NAVEH e KOPELMAN, (1979), trabalhando com xarope de glucose em diversas concentrações. Os autores também observaram altos valores de j_h e indicaram que estes atrasos térmicos não seriam esperados para produtos que apresentassem padrão de aquecimento por convecção.

DENISTON et alii (1992) trabalhando com concentrado de tomate processado em "Steritort" (FMC), encontraram altos valores de j_h , sendo que os autores sugerem que tais valores incomuns encontrados em seus ensaios pode ser devido ao fato de terem considerado curva de aquecimento simples para o produto. Os autores indicaram ainda que, em uma análise posterior dos dados pode ser observado que o produto apresentava curva quebrada de aquecimento, de onde concluíram também, que a convecção só foi realmente induzida após queda da viscosidade devido ao aquecimento do produto.

RAMASWAMY et alli (1993) trabalhando com solução de amido 3 e 4% não utilizaram curva quebrada para descrever o padrão e taxa de aquecimento do produto, porém, confirmaram que valores j_h acima dos convencionais foram encontrados quando houve convecção induzida no processamento de alimentos viscosos processados em retortas rotativas. Os autores relatam valores j_h da ordem de 4,0.

A Fig. 37 apresenta apenas a curva de aquecimento da lata mais lenta de um processamento à 121°C (lata # 3 do processo Série I/Replicata D), que apresentou temperatura média geral em esterilização III = 121,5 °C. Os valores dos parâmetros de aquecimento para esta lata foram de: $fh_1 = 10,6$ min e fh_2 de 5,2 min., com $j_h =$ igual a 1,8. Os valores para os parâmetros de esfriamento desta lata (não mostrado no gráfico) foram de: $fc = 31,3$ min. e $jc = 1,4$.

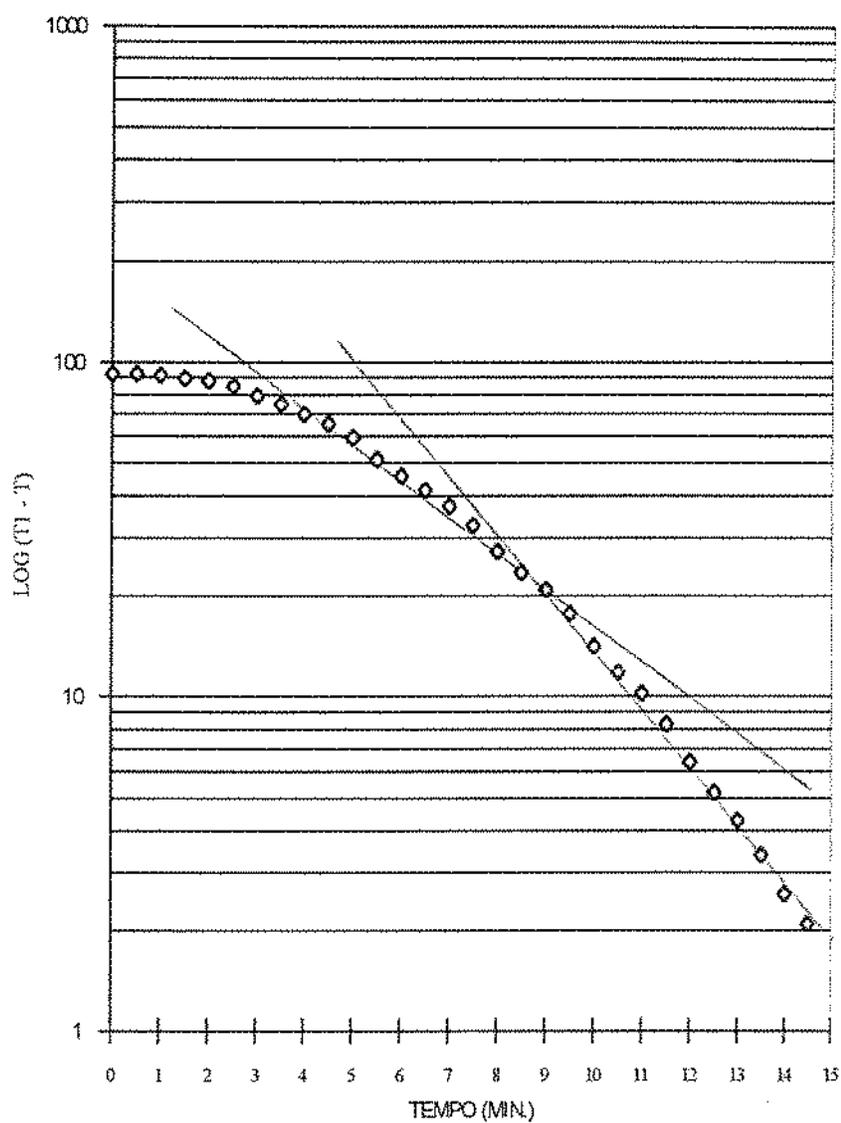


FIGURA 37 - Curva de aquecimento para purê de cenoura processado em latas 73,0 mm D.I. x 91,0 mm, h à 121,5°C, em retorta rotativa com 10% de espaço livre.

4.6.2. Comparação dos valores Fo-BIO e Fo-FIS

Na Figura 38 pode-se observar uma ilustração do posicionamento dos IBs e dos termopares de agulha no interior das latas (seccionadas) através da tampa, conforme utilizados neste trabalho.



FIGURA 38 - Latas seccionadas ilustrando a montagem dos IBs (esq) e termopares de agulha (dir) pela tampa conforme utilizado neste trabalho

Na Tab 25 e 26 estão resumidos os resultados dos ensaios de comparação dos valores Fo-BIO e Fo-FIS aplicado à purê de cenoura diluído, nos estudos à 121,0 e 115,0°C respectivamente. Os resultados na íntegra estão apresentados no Apêndice 4 de "Estudos de comparação entre Fo-BIO e Fo-FIS.

TABELA 25. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE COMPARAÇÃO ENTRE Fo-FÍS E Fo-BIOPF e Fo-BIOHW DETERMINADOS NOS PROCESSOS À 121,0° C NAS DUAS SÉRIES EXPERIMENTAIS

SÉRIE/ REPLICATA	Fo-FÍS (MIN)	% C.V.	Fo-BIOPF (MIN)	% C.V.	Fo-BIOHW (MIN)	% C.V.
I/R1	15,7	4,5	14,4	3,9	14,0	4,2
I/R2	15,8	6,2	14,5	4,3	13,8	4,7
II/R1	10,7	8,5	10,2	1,9	9,1	2,3
II/R2	10,6	6,1	10,1	5,6	9,1	5,6

TABELA 26. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE COMPARAÇÃO ENTRE Fo-FÍS E Fo-BIOPF e Fo-BIOHW DETERMINADOS NOS PROCESSOS À 115,0 ° C NAS DUAS SÉRIES EXPERIMENTAIS

SERIE/ REPLICATA	Fo-FÍS (MIN)	% C.V.	Fo-BIOPF (MIN)	% C.V.	Fo-BIOHW (MIN)	% C.V.
I/R1	14,6	4,6	18,4	2,6	14,3	2,7
I/R2	14,7	4,0	18,2	2,4	14,2	2,4
II/R1	10,4	5,2	13,2	4,6	9,2	4,8
II/R2	10,1	3,1	13,4	1,7	9,2	1,7

Os resultados médios em termos de diferença entre os valores de esterilização biológicos (Fo-BIOPF e Fo-BIOHW) e físicos Fo-FIS obtidos nas duas séries de estudos à 121,0 e 115,0 ° C estão indicados na Tab. 27.

TABELA 27. PORCENTAGEM DE DIFERENÇA ENTRE Fo-BIOPF E/OU Fo-BIOHW E Fo-FIS DETERMINADOS NOS PROCESSOS APLICADOS À 121,0 E 115,0 °C NAS DUAS SÉRIES DE TEMPOS. RESULTADOS MÉDIOS DE DUAS REPLICATAS/ENSAIO.

X PROCESSO/ SERIE	% DIFPF	% DIFHW
121,5/I	8,0	11,7
121,5/II	5,1	14,3
115,5/I	-25,0	2,7
115,5/II	-29,8	10,2

% DIFPF = $Fo-FIS-Fo-BIOPF/FoFIS$

% DIFHW = $Fo-FIS-Fo-BIOHW/FoFIS$

Na comparação entre Fo-BIO e Fo-FIS, observou-se que para os ensaios à 115,0 e 121,0 ° C, os valores Fo-BIO se mostram sempre ligeiramente menores que Fo-FIS. Para os ensaios a 121,0 °C, os valores Fo-BIOPF obtidos ficaram de 4,7 a 8,3 % abaixo de Fo-FIS, e os valores Fo-BIOHW foram 10,8 a 15,0 % menores que Fo-FIS. Para os ensaios à 115,0 °C, os valores Fo-BIOPF determinados apresentaram tendência diferente, ficando de 23,8 a 32,6 % acima dos valores Fo-FIS, enquanto que os valores Fo-BIOHW apresentaram a mesma tendência que à 121,0, ficando entre 2,0 a 11,6 % abaixo de Fo-FIS. Uma vez que os valores Fo-BIOHW foram originados da mesma contagem de sobreviventes que Fo-BIOPF, (consequentemente mesmo F-BIO, ou $F(T_c, z_1)$), e nas duas temperaturas de estudo indicaram Fo-BIO menores que Fo-FIS, pode-se concluir que esta margem de diferença na avaliação da letalidade do processo possa advir da correção de valores-z da metodologia de PFLUG e CHRISTENSEN, (1980), que considera as assunções de Ball $f_h = f_c$ e $j_h = 1,41$.

Variação na tendência dos resultados também foi encontrada por outros autores. PFLUG et alii. (1980b) utilizando o mesmo modelo de dispositivo para fazer comparações entre Fo-BIO e Fo-FIS aplicado a milho em salmoura processado em retorta agitada, obtiveram valores de Fo-BIO até 29,0% maiores que Fo-FIS, porém, os autores observaram em alguns resultados, que a situação se invertia onde Fo-FIS se apresentou até 4,6 % maior que Fo-BIO.

ZECHMAN,(1989), comparando também valores de esterilização Fo-BIO com valores Fo-FIS, utilizando o mesmo dispositivo plástico projetado e utilizado por PFLUG (1976, 1980a,b) obteve valores de Fo-BIO de 9,0 a 24,0 % maiores que Fo-FIS.

PFLUG et alii, (1980a) , em estudo com ervilhas em salmoura processadas em retorta agitada, obtiveram situações inversas onde em três séries de experimentos, os valores Fo - FIS se mostraram de 4,0 até 22,0% maiores que Fo-BIO.

Em todos os estudos acima mencionados, que podem ser diretamente comparados com os realizados neste trabalho, os autores sugerem que baixas taxas de diferenças, semelhantes às observadas são aceitáveis, e que existindo concordância entre 7 a 10% dos resultados, pode-se considerar o modelo de indicador biológico adequado para validação biológica de processos térmicos. Os mesmos autores (acima mencionados) sugerem ainda que diferenças desta ordem podem ser devido à falhas provenientes tanto da determinação biológica do valor de esterilização, quanto de erros inerentes ao sistema físico de medição.

Para as duas temperaturas estudadas, os valores Fo-FIS apresentaram coeficiente de variação maiores que os de Fo-BIO, porém, os resultados obtidos (C.V. % médio = 5,0) são maiores que os relatados por PFLUG (1980a)(C.V. % médio = 3,0). Isto seria previsto e explicável por erros de leitura de temperatura ou de calibração de termopares, uma vez que o equipamento utilizado nestes estudos é uma retorta de imersão total em água, onde os termopares e conectores ficam submersos. À este respeito, BERRY et alii, (1986), citam que erros da ordem de $\pm 0,5$ ° C na leitura de termopares causariam erros de 12% no valor-Fo calculado, e, PFLUG (1975) relata que variações desta natureza podem ser esperadas, já que as leituras fornecidas pelos termopares podem ser prejudicadas pela entrada da água por entre a capa de isolamento de Teflon dos fios de extensão dos termopares.

Comparando-se a variabilidade média da determinação física (C.V.% médio = 5,0) com a biológica (C.V. % médio = 3,4), em todo o estudo, fica evidente a reproducibilidade do método, indicando que foi obtido maior controle nas determinações biológicas. A partir destes resultados pode-se concluir que com o modelo de IB utilizado neste trabalho, é bastante viável a validação de processos de esterilização em autoclaves rotativas por imersão total em água aplicado a alimento enlatado é possível.

4.6.3. Ensaio de esterilidade comercial

Os resultados obtidos nos estudos de esterilidade comercial apresentados na Tab. 28 comprovam que os processos térmicos para purê de cenoura diluído foram devidamente desenhados, uma vez que não foram observadas alterações físicas ou microbiológicas nas embalagens após término do período pré-determinado de incubação.

TABELA 28. RESULTADO DOS ENSAIOS DE ESTERILIDADE COMERCIAL

TEMPERATUR A-SERIE- REPLICATA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
	37° C	55° C
121C-I-R1	S.A.	S.A.
121C-I-R2	S.A.	S.A.
121C-II-R1	S.A.	-
121C-II-R2	S.A.	-
115C-I-R1	S.A.	S.A.
115C-I-R2	S.A.	S.A.
115C-II-R1	S.A.	-
115C-II-R2	S.A.	-

LEGENDA:

S.A. = SEM ALTERAÇÕES FÍSICAS OU MICROBIOLÓGICAS

5. CONCLUSÕES

- A suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* preparada com meio de esporulação ágar nutriente Difco, (suplementado com 5 ppm de $MnSO_4$) e incubada à 57,0 °C apresentou a mais alta resistência térmica, podendo ser utilizada no preparo dos IBs.
- Os resultados obtidos nos estudos de distribuição de calor da mini-retorta (MR) demonstraram que o equipamento construído atende às especificações necessárias para ser utilizado em ensaios de calibração de IBs. A adaptação da autoclave Dixie como pulmão de alimentação de vapor, se mostrou apropriada, uma vez que foi conseguido controle adequado de temperatura no interior da MR (com diferença máxima entre posições na câmara para 115,0, 121,0 e 123,0 ° C de 0,4 a 0,6 ° C). A atuação do pulmão de vapor juntamente com o método de fechamento da válvula de desaeração contribuíram para a obtenção de um tempo de subida máximo de 10 segundos (para as 3 temperaturas estudadas).
- O padrão de distribuição de temperatura na retorta Rotopax no plano central da cesta se mostrou satisfatório, não apresentando diferenças superiores à 0,5 ° C entre a posição mais fria e a mais quente durante fase de esterilização III. O ponto frio se localizou na região frontal perto da porta.
- O aquecimento de purê de cenoura diluído processado em latas 73,0 mm D.I. x 91,0 mm h, com 10 % de espaço livre, segue curva quebrada com duas taxas de aquecimento (**fh1** médio de 9,0 min, **fh2** médio de 5,0 min) e esfriamento lento (**fc** médio de 30,0 min). O padrão de esfriamento lento pode ser devido às limitações do sistema de resfriamento do equipamento. Os valores **jh** altos indicam uma fase de atraso térmico grande do produto, sendo que a convecção induzida ocorreu somente depois de 8,0 a 10,0 minutos de processamento para as duas temperaturas estudadas.

- Os processos de preservação desenhados (valor F requerido de 15,0 e 10,0 minutos) se mostraram adequados, já que não foram observadas alterações nos recipientes incubados para o estudo da esterilidade comercial.
- De um modo geral, os valores de esterilização biológicos ficaram abaixo dos valores de esterilização físicos, sendo que os valores de esterilização Fo-BIOPF ficaram 5,0 a 8,0 % mais baixos que os Fo-FIS para ensaios realizados à 121,0 °C, e 24 a 32,0 % mais altos que Fo-FIS nos ensaios à 115,0 °C. Esta diferença se deve provavelmente à erro nas suposições do método de PFLUG e CHRISTENSEN, (1980), para cálculo do fator de correção de F-BIO para Fo-BIO, na determinação de Fo-BIOPF. Os valores de esterilização Fo-BIOHW ficaram 2,0 a 11,0 % mais baixos que Fo-FIS nos ensaios à 115,0 °C, e 11,0 a 15,0% abaixo dos valores Fo-FIS nos ensaios à 121,0 °C.
- A variabilidade entre as medidas biológicas foi menor que a das medidas físicas, o que indica a reprodutibilidade do método. A partir destes resultados, pode-se concluir que para retortas do tipo de imersão total em água, o uso do método biológico de validação de processos de esterilização é plenamente justificável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAMI - **Biological Indicator Evaluator Resistometer BIER/Vessel Steam.** - Arlington,VA. Ed. Association for the Advancements of Medical Instrumentation, 1982
2. ANDREOLLI, A.A - Relatório de estágio supervisionado. no Laboratório de Termobacteriologia. DCA/FEA-UNICAMP. 1994
3. BERRY R. Jr. & BRADSHAW, J.G. - Heating characteristics of condensed cream of celery soup in a Steritort: Heat penetration and spore count reduction. **J. Food Sci.** 45(4): 869-879, 1980
4. BERRY M. R. Jr. & BRADSHAW, J.G. - Heat penetration for sliced mushrooms in brine processed in still and agitating retorts with comparisons to spore count reduction. **J. Food Sci.** 47 (5): 1698-1704, 1982
5. BERRY M. R. Jr.; BRADSHAW, J.G.; KOHNHORST, A.L. - Heating characteristics of ravioli in brine and in tomato sauce processed in agitating retorts. **J. Food Sci.** 50(3): 815-822, 1985
6. BERRY, M. R. Jr.; BRADSHAW, J. G. - Comparison of sterilization values from heat penetration and spore count reduction in agitating retort. **J. Food Sci.** 51 (2): 477-479, 1986
7. BERRY, M. Jr. & DICKERSON, R. W. Jr. - Heating characteristics of whole kernel corn processed in a Steritort. **J. Food Sci.** 46 (4): 889-895, 1981
8. BROWN, K. L.; AYREST, C. C.; GAZE, J. E.; NEWMAN, M. E. - Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particles. **Food Microbiology** 1: 187-198, 1984
9. CAPUTO, R. A., RHON. K. J., MASCOLI, C.C., - Biological Validation of an Ethylene Oxide Sterilization Process. **Dev. Ind. Microbiol.** 22: 357-62, 1981

10. COOPER, M.S. - The USP Monographs on biological indicators. **J. of Parenteral Sci. and Tech.** **39** (2): 80-5, 1985
11. COSTIN, I.D., & GRIGO, J. - Bioindicadores para control de esterilizacion. Control de esterilizacion en autoclave con el Bioindicador STERIKON. **Kontakte** **24**(74): 33-9, 1974.
12. CAMPBELL S. & RAMASWAMY, H. - Distribution of heat transfer rate and lethality in a single basket water cascade retort. **J. Food Proc. Eng.** **15** (2): 31-47, 1992
13. CERNY, G.; FINK, A.; PECHER, A. - Studies on thermal inactivation of bacterial spores in particulate foods: VTT (TECH. RES. CENTER OF FINLAND) SYMPOSIUM, Espoo, Finland, 30-31 jan., 1991
14. DADD, A.H.; STEWART, C.M.; TOWN, M.M. - A Standardized monitor for the Control of Ethylene Oxide Sterilization Cycles. **J. Hyg.** **91**:93-100, 1983.
15. DENISTON M.; KIMBALL, R.; STOFOROS, N.; PARKINSON, S. - Effect of steam/air mixtures on thermal processing of an induced convection-heating product (tomato concentrate) in a Steritort. **J. Food. Proc. Eng.**, **15** (2): 49-64, 1992
16. DIGNAN, D.M.; BERRY Jr., M.R.; PFLUG, I.J.; GARDINE, T.D. - Safety considerations in establishing aseptic processes for low-acid foods containing particulates. **Food Tech.** **43**(3): 118-123, 1989.
17. EISNER, M. - **Introduction into the technique and technology rotary sterilization.** 2.ed, Milwaukee, private author's edition; rev. & enlarg. 1988
18. FEEHERY, F.; MUNSEY, D.T.; ROWLEY, D.R. - Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Appl. Environ. Microbiol.** **53** (2): 365-370, 1987.

19. FELLOWS,P. - **Food Processing Technology: Principles and practice.**
Chichester, Ed. Ellis Horwood, 505p, 1988
20. F.D.A - **Bacteriological analitical manual** .6th ed. A.O.A.C. eds. Virginia,
USA, 1984
21. FIELDS,M. - The flat sour bacteria. - **Adv. Food. Research** 18, 173-217, 1970
22. GALO, C. - Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na
fermentação alcoólica. Tese de doutoramento. Faculdade de Engenharia
de Alimentos, Universidade de Campinas,SP, 1990
23. GAZE, J.E.& BROWN,G.D. - Application of alginate particle technique to the
study of particle sterilization under dinamic flow. **Campden Food &
Drink research Association.** Technical Memorandum No 547, 23-47,
1989
24. GAZE, J.E.; SPENCER, L.E.; BROWN, G.F.;HOLDSWORTH, S.D. -
Microbiological assesment of process lethality using food/alginate particles.
Campden Food & Drink research Association. Technical Memorandum
No 580, 30-65, 1990
25. GILLIS, J.R., WOODDROW, J.R., POWELL, K.A., HALLECK, H.E. -
Evaluation and standards of Biological Indicatoros for Steam and
Ethylene Oxide sterilization. **Dev. Ind. Microbiol.** 17 : 415-30, 1976.
26. GOLDONI, S.; KOJIMA, S.; LEONARD,S.; HEIL, J.R. - Growing spores of
P.A. 3679 in formulations of beef heart infusion broth. **J. Food Sci.** 45
(3): 467-470, 1980
27. GORMAN,S.P.; SCOTT,E. M.;HUTCHINSON, E.P. - Thermal resistance
variations due to post-harvest treatments in *Bacillus subtilis* spores. **J.
Appl. Bacteriol.**59, 555-560, 1985.

28. GRAHAM,G. - Production of spores and preparation of spores suspension and monitors - in: EUCOMED Ed. PROCEEDINGS OF THE 1ST WORKSHOP IN BIOLOGICAL MONITORING OF STERILIZATION. Kekerade, The Netherlands, 21-23 Apr,140-177,1986

29. HAYAKAWA,K.I. - Experimental Formulas for Accurate Estimation of Transient Temperature of Food and Their Application to Thermal Process Evaluation. **Food Tech.** 24(12): 89-99, 1970.

30. HAYAKAWA,K.I., - Modernos Conceitos e técnicas na avaliação da esterilização de alimentos. In: apostila do curso mesmo título. Campinas, Ed. Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, 1971.

31. HAYAKAWA,K.I., - Mathematical methods for estimating proper thermal processes and their computer implementation. **Adv. Food. Res.** 23: 75, 1977

32. HERSON, A.C., HULLAND,E.D. - **Conservas Alimenticias.** Zaragoza, Ed. Editorial Acribia, 316 p.,1984

33. HERSON,A.C., SHORE,D.T. - Aseptic Processing of Foods Comprising Sauce and Solids. **Food Technology.** 35 (5): 53-8,1981.

34. HODGES,N.A. - A comparison of the heat resistance in commercially available *Bacillus stearothermophilus* spore preparations used for monitoring steam sterilization. **J. of Pharm. and Pharmac.** 34: 259-60 ,1982

35. HOUTZER, R.L.& HILL,R.C. - Effect of temperature deviations on process sterilization value with continuous agitating retort. **J. Food Sci.** 42(3): 775-777 , 1977

36. JONES, A.T.; PFLUG, I.J.; BLANCHET, R. Effect of fill weight on the F-value delivered to two styles of green beans processed in a Sterilmatic retort. **J. Food Sci.** 45(2): 217-270, 1980

37. KALPALATHIKA M.P.V.; NANJUNDASWAMY, A.; PATWARDHAN, M. - Studies on canned strained foods based on vegetables. Part I: Carrots. **J. Food Sci Technol.** 25 (3):137-141, 1988
38. KOTILAINEN, H.R., GANTZ, N.M. - An evaluation of three biological indicators systems in flash sterilization. **Infection Control** 8 (8): 311-16, 1987.
39. LEE, C.; MONTVILLE, T.J.; SINSKEY, A.J. - Comparison of efficacy of steam sterilization indicators. **Appl. Env. Microbiol.** 37(3): 113-117, 1979
40. LEITÃO, M.F.E.; UBOLDI-EIROA, M.; DELAZZARI, I. - Contaminação de matérias-primas e alimentos semi-processados de origem vegetal por esporos de bactérias. I. *Bacillus* sp. mesófilos, *B. coagulans* e *B. stearothermophilus*. **Boletim do ITAL.** 20 (1): 1-77, 1983.
41. LOPEZ, A. - **A Complete course in Canning.** - 13rd. ed. Baltimore, Ed. The Canning Trade Inc. v.1, 2, 3., 1987
42. LOPEZ, A. - Comunicação pessoal. jun, 1991
43. MASSAGUER, P.R. - Influence of Randon Variation of Process Parameters on the Variation of Thermal Process Lethality for Conduction Heating Food. Tese de Doutorado. Universidade de Rutgers. New Jersey. nov. 1983.
44. MASSAGUER, P.R.; CAMARGO, L.M.Q.; ANDREOLLI, A.V.; BARONI, A.F. - Estudo da distribuição de temperatura e penetração de calor em purê de cenoura processado em retorta agitada - Anais do 5o CONGRESSO LATINOAMERICANO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR E MASSA, Caracas, 23-27 out. , 1994a/ (II-B 2.1-2.12)

45. MAKI,D.G., HASSENER,C.A. - Flash sterilization: carefully measured haste. **Infection Control**. **8**. (8): 307-10, 1987.
46. McCORMICK,L. - Brief Report: Biological Indicators. **Infection Control** **9**. (11): 504-7, 1988.
47. MILLER,W.S. - Types of biological indicators used in monitoring sterilization processes. **Bulletin of The Parenteral Drug Association** . **25**(2): 80-84, 1971.
48. MYERS,T. & CHRAI, S. - Basic principles and applications of bioindicators. **J Parent. Drug Ass.** **34** (3); 235-243, 1980
49. NAVEH,D.; KOPELMAN,J. - Effect of some processing parameters on the heat transfer coefficients in a rotating autoclave. **J. Food Proc. Preserv.**, **4**, 67-77, 1980
50. NCA - NATIONAL CANNERS ASSOCIATION. **Laboratory Manual for Food Canners and Processors**. 3- ed. Van Nostrand Reinhold/AVI, New York.1968.
51. ORLSON,R. & SORRELS,R.S. - Termophilic flat sour sporeformers. In: M.L. Vanderzant Ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3rd ed. American Public Health Association, Washington, DC., Ch. 21, 1992
52. ODLAUG,T. E.; CAPUTO,R .A.; MASCOLI, C. - Determination of sterilization (F)-Values by microbiological methods. **Developments in Industrial Microbiology** **22**: 349-55, 1981.
53. PARK D. J.; CABES JR.L,J.; COLLINS, M.K.; - Determining temperature distribution in rotary full-immersion, hot water sterilizers - **Food Technology**, **12**, 113-117, 1990
54. PERKINS,J. J. - **Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences** 2nd. ed., Springfield, Eds.C, Thomas . 540p., 1969

55. PERKINS,R.E.; BODMAN,H.A.; WALTER,C.W. - Monitoring steam sterilization of surgical Instruments: A Dilemma. **App. and Env. Microb.** **42** (2):383, 1983

56. PFLUG I. J., - **Procedures for carrying out a heat penetration tests and analysis of the resulting data** - Minneapolis, Ed. University of Minnesota, 1975.

57. PFLUG,I.J. U.S.Patent 3,960,670. **Method and Apparatus for Sterility Monitoring.** Jun. 1, 1976.

58. PFLUG, I.J. - Measuring the integrated time-temperature effect of a heat sterilization process using bacterial spores. - **Food. Process Engineering**, 218,(78): 68-75, 1982

59. PFLUG, I.J. - Endpoint of a preservation Process. **J. Food Protec.** **50** (4): 1987

60. PFLUG,I.J. - **Text Book for an Introductory Course in the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes.** 6th . ed. Environmental Sterilization Laboratory, Minneapolis. 1990

61. PFLUG,I.J. - Comunicação pessoal, jul, 1992.

62. PFLUG,I.J. & CHRISTENSEN R. - Converting and F-value determined on the basis of one z-value to an F-value determined on basis of a second z-value. **J. Food Sci.** **45**(1): 1980

63. PFLUG,I.J., & HOLCOMB.- Principles of termal destruction of microorganisms. In: S.S. Block (ed.), **Disinfection, Sterilization and Preservation.**Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA., 751-810, 1983

64. PFLUG,I.J.; JONES,A.T.;BLANCHET,R. - Performance of bacterial spores in measuring the Fo-value delivered to cans of Food heated in a Steritort **J. Food Sci**, **45**(4): 940-945.1980b
65. PFLUG,I.J.; ODLAUG,T.E. - Biological indicators in the pharmaceutical and the medical device industry. **J. Parenteral Sci. & Techn.** **40** (5): 242-8,1986.
66. PFLUG, I.J. & SMITH, G. - The use of biological indicators for monitorin wet heat sterilization processes. In: SCIENTIFIC JOURNAL SERIES Paper No 9602, Minnesota Agricultural Experimental Station, St Paul, MN. 187-199, 1977
67. PFLUG,I.J.; SMITH.G.; HOLCOMB.R.; BLANCHET,R. - Measuring sterilizing values in containers of food using thermocouples and biological indicator units. **J. Food Protec.** **43**(2): 119-123,1980a
68. RAMASWAMY,H.; CAMPBELL, S.; PASSEY, C. - Temperature distribution in a standard 1-basket water-cascade retort. -**Can. Inst. Sci. Technol. J.** **24** (1/2): 19-26,1991
69. RAMASWAMY H.; ABBATEMARCO,C.; SABLANI,S. - Heat transfer rates in a canned food model as influenced by processing in an end-over-end rotary steam/air retort. **J. Food Proc. Preserv.**, **17** ,269-286, 1993
70. RODRIGUEZ A. C. & TEIXEIRA, A.A. - Heat transfer in hollow cylindrical rods used as bioindicator units for thermal process validation **ASAE Transaction.** **31** (4): 1233-1236, 1988
71. SAS. Statistical Analysis System- User's guide. 1985, 1988
72. SCHMIDT,C.F.; BOCK,J.H.; MOBERG,J.A. Termal resistance determination in steam using thermal death retorts. **Food Research.** **20** (6):606-613, 1955
73. SEGNER, W. P.; RAGUSA,T .J.; MARCUS C. L., SOULTER ,E. A. - Biological evaluation of a heat transfer simulation for sterilizing low-acid

- large particulate foods for aseptic packaging. *J. of Food Proc. and Pres.* **13**: 257, 1989.
74. SELKON, J.B.; SESSON, R.P.; INGHAM, H.R. - The use of spore strips for monitoring the sterilization of bottled fluids. *J. of Hyg.* **83**:121-130, 1979
75. SKAUNG.; BERUBE, R. - Comparative thermoresistance of two Biological Indicators for monitoring steam autoclaves: Part 1. Comparison performed in a gravity BIER/vessel. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinava. Sec. B.* **91**:435, 1983
76. SKAUG, N., KALAGER, T. - Comparative thermoresistance of two biological indicators for monitoring steam autoclaves. Part.2. Comparison performed at 134 C in a hospital prevacuum steam sterilizer. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. sect. B.*, **93**:151, 1985.
77. SKAUNG., KALAGER, T. - Comparative thermoresistance of two biological indicators for monitoring steam autoclaves: Part 3. Comparison performed at 121° C in a hospital pre-vacuum steam sterilizer. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.* **94**:107-112, 1986.
78. SMITH, G.M., KOPELMAN, M., JONES, A., PFLUG, I.J., 1982. Effect of environmental conditions During Heating on commercial spore Strips Performance. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:12
79. SMITH, G.H.; PFLUG, I.J.; CHAPMAN, P.A. - Effect of storage time and temperature and the variation among replicate testes (on different days) on the performance of spore disks and strips. *Appl. and Environm. Microbiol.* **32**(2): 257-263, 1976.
80. SPICHER, G. - Biological indicators and monitoring systems for sterilization processes. *Zbt. Bakt. Hyg., A.* **267**:463, 1988
81. STUMBO, C.R. - *Thermobacteriology in food processing.* 2nd ed., New York, Ed. Academic Press, , 1973.

82. SWANSON, K.M.J.;BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G.
Colony count methods : In: M.L. Vanderzant Ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3rd ed. American Public Health Association, Washington, DC., 1992
83. TUNG M.A.& RAMASWAMY, H. - Steam/air media for retort pouch processing
In: **Food Engineering and Process Applications** - v. 12 , LeMaguer, M.e Jelen. P (Eds) Elsevier Applied Science Publishers,521 p, 1986
84. TORNELLO,J.D., 1986 Flash Sterilization. Evaluating Biological Indicators.
AORN Journal. 43(6):1289
85. VITALI, A.A. - Comunicação pessoal. 1991
86. YAWGER, E.S. - Bacteriological evaluation for thermal process design - **Food Technology**, 32 (6): 59-62, 1978
87. ZECHMAN, L.G. - Heat inactivation kinetics of *B. stearothermophilus* spores -
Dissertation Abstracts International, 50 (2): 392-B, 1989.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1- ÁGAR NUTRIENTE COM 5 PPM DE SULFATO DE MANGANÊS

1.1. Ágar Nutriente comercial Difco (Nutrient Agar)

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0g
Ágar	15,0g

pH final = 6,8

1.2. Solução de Sulfato de manganês 0,5%

Sulfato de Manganês	0,5g
Água destilada	100,0 ml

Preparo

1. Prepare a solução estoque 0,5% de $MnSO_4$
2. Prepare o ágar nutriente conforme instruções do fabricante
3. Quando o nutriente ágar estiver dissolvido adicione 1,0 ml da solução estoque de $MnSO_4$ 0,5% para cada litro de meio para obter a concentração de 5 mg de $MnSO_4$ por litro (5 ppm) e misture bem.
4. Autoclavar 15 min à 121,0 °C

2- TAMPÃO FOSFATO DE BUTTERFIELD

2.1. Preparo solução estoque

KH_2PO_4	34,0g
Água destilada	500,0 ml

Dissolver com agitação e ajustar o pH para 7,2 com 175,0 ml de NaOH 1N.
Diluir para 1 litro e esterilizar 121,0 °C por 15 minutos. Guardar em geladeira.

2.2. Preparo do Tampão de Butterfield 50X (0,0015M)

Diluir 31,25 ml da solução estoque para 500 ml de água destilada.
Esterilizar 121,0 °C por 15 minutos.

3- ÁGAR DEXTROSE TRIPTONA (DTA)

Dextrose Tryptone Agar comercial, Difco

Dextrose	5,0 g
Triptona	10,0 g
Bromocresol Purpura 2%	2,0ml
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

4-SOLUÇÃO SALINA PEPTONADA

Cloreto de sódio	8,5 g
Peptona	1,0g
Água destilada	1000,0 ml

5-ÁGAR DE SOJA TRÍPTICA (TSA)

Tryptic Soy Agar comercial, Difco

Bacto tryptone	15,0g
Bacto soytone	5,0g
Cloreto de Sódio	5,0g

Bacto agar	15,0g
Bacto soytone	5,0g
Água destilada	1000,0 ml

6-CALDO DE SOJA TRÍPTICA (TSB)

Tryptic Soy Broth comercial, Difco

Bacto tryptone	17,0g
Bacto soytone	3,0g
Bacto dextrose	2,5g
Cloreto de Sódio	5,0g
Água destilada	1000,0 ml

APÊNDICE 2 : DADOS DE PENETRAÇÃO DE CALOR

PROCESSOS COM TEMPERATURA DE AJUSTE 121C

PROCESSO SERIE I REPLICATA 1

LATA	FH1	JH	FH2	JH	FC	JC
3	10,6	1,8	5,2	1,4	31,2	1,4
6	8,5	2,2	4,9	1,2	28,6	1,4
7	8,6	2,1	4,8	1,1	28,3	1,3
11	9,0	2,0	5,6	1,1	28,3	1,4
12	9,7	2,0	5,3	1,1	28,9	1,4
13	9,3	2,3	5,2	1,2	28,4	1,4
14	7,2	2,9	5,0	1,1	30,1	1,3
16	8,3	2,7	5,4	1,2	29,8	1,4
MEDIA	8,9	2,3	5,2	1,2	29,2	1,4

PROCESSO SERIE I REPLICATA 2

LATA	FH1	JH1	FH2	JH2	FC	JC
1	10,0	2,3	4,9	1,5	31,3	1,3
14	9,5	2,4	5,2	1,0	31,4	1,3
3	9,5	2,3	5,3	1,0	33,0	1,3
10	6,9	4,3	5,5	1,1	33,6	1,3
9	7,2	3,9	4,9	1,2	30,2	1,4
11	10,6	1,9	3,9	1,7	30,7	1,3
12	10,9	2,0	5,8	1,1	32,8	1,3
13	10,1	2,3	7,0	1,0	31,5	1,3
15	8,0	3,3	5,2	1,1	32,8	1,3
MEDIA	9,2	2,7	5,3	1,2	31,9	1,3

: VALOR-F = 15 MIN

PROCESSO SERIE II REPLICATA 1

LATA	FH1	JH	FH2	JH	FC	JC
3	7,9	2,9	4,1	1,2	28,2	1,3
6	8,6	2,7	5,3	1,0	29,9	1,3
7	7,0	3,4	4,0	1,1	28,2	1,3
9	9,1	2,2	4,7	1,1	29,3	1,3
12	9,7	2,4	5,6	1,1	29,6	1,3
13	9,3	2,4	4,8	1,0	28,9	1,3
14	7,8	3,4	4,9	1,1	31,5	1,3
16	8,5	2,9	4,7	1,3	30,4	1,3
MEDIA	8,5	2,8	4,8	1,1	29,5	1,3

PROCESSO SERIE II REPLICATA 2

LATA	FH1	JH	FH2	JH	FC	JC
3	6,9	4,8	4,3	1,1	30,0	1,3
6	8,4	3,2	4,3	1,3	27,8	1,3
7	7,5	4,0	3,9	1,3	29,0	1,3
9	9,9	2,5	5,1	1,0	29,9	1,3
11	8,7	3,6	5,2	1,1	31,6	1,3
13	8,0	4,1	5,1	1,0	32,5	1,3
14	8,7	3,1	4,9	1,0	30,4	1,3
15	8,6	3,3	4,0	1,4	25,5	1,4
16	8,5	3,3	4,9	1,1	28,1	1,3
MEDIA	8,3	3,5	4,6	1,1	29,4	1,3

: VALOR-F = 10 MIN

PROCESSOS COM TEMPERATURA DE AJUSTE 115C

PROCESSO SERIE I REPLICATA 1

LATA	FH1	JH1	FH2	JH2	FC	JC
3	9,1	2,3	3,8	1	31,9	1,3
9	9,6	2,3	4	1,2	31	1,2
10	9,3	2,3	4	1,2	30,8	1,3
11	10	2,1	4,2	0,9	31	1,3
13	9,7	2,3	4,6	0,9	30,1	1,2
15	8,5	2,6	3,4	1,3	31,1	1,2
16	9	2,5	3,8	1,4	31,1	1,2
MEDIA	9,3	2,3	4,1	1,2	31	1,3

PROCESSO SERIE I REPLICATA 2

LATA	FH1	JH1	FH2	JH2	FC	JC
2	7,5	2,7	3,5	1,3	31,9	1,3
9	7,9	2,6	4,1	1,2	31	1,2
10	7,8	2,6	4,4	1	29,7	1,3
11	8,2	2,4	4	0,9	30,9	1,2
12	9,6	2,1	4,4	1	31,2	1,3
13	9,4	2,1	4,1	1,1	30,1	1,3
15	7,9	2,5	3,9	1	31,2	1,2
16	8,2	2,4	4,9	1	31	1,2
MEDIA	8,3	2,4	4,2	1,1	30,9	1,2

SERIE I = VALOR-F = 15 MIN

PROCESSO SERIE II REPLICATA 2

LATA	FH1	JH1	FH2	JH2	FC	JC
13	9,8	2,4	5,4	1,1	29,8	1,4
3	7,4	3,3	3,9	1,1	33,8	1,2
6	8,1	3,1	4,9	1	30,2	1,4
9	10,6	2,2	5,1	1	32,2	1,3
12	9,9	2,4	5,1	1,3	31,3	1,3
14	10,6	2,5	7,3	1,1	33,3	1,3
15	9,1	2,9	5,2	1,2	31,3	1,4
MEDIA	9,4	2,7	5,2	1,1	31,7	1,3

PROCESSO SERIE II REPLICATA 2

LATA	FH1	JH1	FH2	JH2	FC	JC
1	8,4	4	4,2	1,3	32,5	1,2
3	10,1	3,2	4,6	1,2	33,1	1,3
6	7,7	4,8	5,1	1	30,2	1,4
9	6,8	6,4	4,2	1,3	31,1	1,3
11	9	3,5	3,8	1,4	31,7	1,3
12	9,4	3	4,1	1	30,7	1,3
14	8,5	3,9	3,9	1,2	30,2	1,3
15	8,7	3,9	3,8	1,3	30,3	1,3
MEDIA	8,6	4,1	4,2	1,2	31,2	1,3

SERIE II: VALOR-F = 10 MIN

APÊNDICE 4: ESTUDO DE COMPARAÇÃO ENTRE Fo-BIO E Fo-FIS.
RESULTADOS INTEGRAIS

PROCESSOS COM TEMPERATURA DE AJUSTE 121C

PROCESSO SERIE I. REPLICATA 1.

IB No.	T1 = 121,5		Fp = 14,1		FOBIO		FOFIS
	F(Tc,z1)	F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)	Y3 = 1,09	Y3 = 1,09	
		Y1=0,86	Y2 = TAB	Y2 = 1,05	PF	HW	
			PF	HW	PF	HW	
18	14,0	12,0	13,0	12,6	14,2	13,8	15,9
2	14,9	12,8	13,8	13,4	15,0	14,6	16,4
3	15,2	13,0	14,0	13,7	15,3	14,9	16,7
17	14,9	12,8	13,8	13,4	15,0	14,6	15,8
30	13,8	11,9	12,9	12,5	14,0	13,6	15,1
33	13,6	11,7	12,7	12,2	13,8	13,3	15,1
28	14,0	12,0	13,0	12,6	14,2	13,8	16,2
19	13,8	11,9	12,9	12,5	14,0	13,6	14,8
MEDIA	14,3	12,3	13,3	12,9	14,4	14,0	15,7
DESVIO PADRAO					0,67	0,59	0,70
COEF. VARIAÇÃO					0,04	0,04	0,04
% DIF.					8,3%	10,8%	

PROCESSO SERIE I. REPLICATA 2.

IB No.	T1 = 121,5		Fp = 13,8		FOBIO		FOFIS
	F(Tc,z1)	F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)	Y3 = 1,09	Y3 = 1,09	
		Y1=0,86	Y2 = TAB	Y2 = 1,04	PF	HW	
			PF	HW	PF	HW	
49	13,8	11,9	12,9	12,2	14,0	13,3	15,3
46	15,1	13,0	14,0	13,4	15,3	14,6	16,0
43	13,3	11,4	12,4	11,8	13,6	12,8	16,2
37	15,1	13,0	14,0	13,4	15,3	14,6	16,9
35	14,0	12,0	13,0	12,4	14,2	13,5	16,9
34	15,1	13,0	14,0	13,4	15,3	14,6	14,8
32	14,0	12,0	13,0	12,4	14,2	13,5	14,1
29	14,0	12,0	13,0	12,4	14,2	13,5	16,1
1	14,0	12,0	13,0	12,4	14,2	13,5	
MEDIA	14,3	12,3	13,3	12,6	14,5	13,8	15,8
DESVIO PADRAO					0,63	0,65	0,99
COEF. VARIAÇÃO					0,04	0,05	0,06
% DIF					8,2%	12,6%	

PROCESSO SERIE I. REPLICATA 1.

IB No.	T1=121,6		Fp=9,1		FOBIO	FOBIO	FOFIS
	F(Tc,z1)	F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)			
	Tc=121,0	Y1=0,83	Y2=TAB	Y2=1,01	Y3=1,12		
			PF	HW	PF	HW	
29	9,5	7,9	8,9	7,9	9,9	8,9	11,7
26	10,1	8,3	9,3	8,4	10,5	9,4	10,6
38	9,7	8,1	9,1	8,1	10,1	9,1	11,8
31	9,6	8,0	9,0	8,0	10,0	9,0	11,0
10	9,9	8,2	9,2	8,3	10,3	9,3	8,9
43	9,6	8,0	9,0	8,0	10,0	9,0	10,3
27	10,0	8,3	9,3	8,3	10,4	9,3	10,5
20	9,5	7,9	8,9	8,0	10,0	8,9	11,6
							10,2
MEDIA	9,7	8,1	9,1	8,1	10,2	9,1	10,7
DESVIO PADRAO					0,20	0,21	0,91
COEF. VARIAÇÃO					0,02	0,02	0,08
% DIF.					5,4%	15,0%	

PROCESSO SERIE II. REPLICATA 2.

IB No.	T1 = 121,6		Fp=9,1		FOBIO	FOBIO	FOFIS
	F(Tc,z1)	F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)			
		Y1=0,83	Y2=TAB	y2=1,00	y3=1,119	y3=1,119	
			PF	HW	PF	HW	
51	10,1	8,3	9,3	8,3	10,4	9,3	11,6
53	10,2	8,4	9,4	8,4	10,5	9,4	11,6
24	9,6	8,0	8,8	8,0	9,9	8,9	11,0
34	10,3	8,5	9,5	8,5	10,6	9,6	10,6
37	10,4	8,6	9,6	8,6	10,7	9,7	9,5
42	8,7	7,2	8,0	7,2	9,0	8,1	10,4
43	10,1	8,4	9,3	8,4	10,4	9,4	11,1
21	9,9	8,2	9,1	8,2	10,2	9,2	11,1
22	9,2	7,6	8,5	7,6	9,5	8,6	10,8
MEDIA	9,8	8,2	9,0	8,2	10,1	9,1	10,6
DESVIO PADRAO					0,57	0,51	0,65
COEF. VARIAÇÃO					0,06	0,06	0,06
% DIF					4,7%	14,1%	

PROCESSOS COM TEMPERATURA DE AJUSTE 115C

PROCESSO SERIE I. REPLICATA 1.

IB No	T1= 115,5		Fp=14,1		FOBIO	FOBIO	FOFIS
	F(Tc,z1)	F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)			
	Y1=5,81		Y2= TAB	Y2=0,79			
		PF	HW	PF	HW		
39	11,0	63,6	64,6	50,3	18,1	14,1	14,4
30	11,2	65,1	66,1	51,4	18,5	14,4	15,6
50	11,4	66,2	67,2	52,3	18,8	14,7	15,1
17	11,5	66,8	67,8	52,8	19,0	14,8	14,5
3	11,5	66,8	67,8	52,8	19,0	14,8	14,4
45	10,8	62,5	63,5	49,3	17,8	13,8	13,7
14	11,0	63,6	64,6	50,3	18,1	14,1	13,5
7	10,9	63,3	64,3	50,0	18,0	14,0	15,4
54	10,9	63,0	64,0	49,8	17,9	13,9	14,7
2	11,5	66,8	67,8	52,8	19,0	14,8	14,7
MEDIA		64,8	65,8		18,4	14,3	14,6
DESVIO PADRAO					0,49	0,39	0,68
COEF. VAR.					0,03	0,03	0,05
% DIF.					-26,2%	2,0%	

PROCESSO SERIE I. REPLICATA 2.

IB No	T1=115,4		Fp=14,0		FOBIO	FOBIO	FOFIS
	F(Tc,z1)	F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)			
	Y1=5,99		Y2= TAB	Y2=0,79			
		PF	HW	PF	HW		
2	10,5	62,9	63,9	49,7	17,3	13,4	14,3
17	11,2	67,1	68,1	53,0	18,4	14,3	15,6
40	11,4	68,3	69,3	53,9	18,7	14,6	15,0
16	11,2	66,8	67,8	52,8	18,3	14,2	14,8
50	11,0	65,6	66,6	51,8	18,0	14,0	15,0
45	10,9	65,0	66,0	51,3	17,8	13,9	14,3
5	11,2	67,1	68,1	53,0	18,4	14,3	13,5
11	11,3	67,7	68,7	53,5	18,5	14,4	14,7
38	11,2	66,8	67,8	52,8	18,3	14,2	14,7
MEDIA		66,4	67,4	52,4	18,2	14,2	14,7
DESVIO PADRAO					0,44	0,35	0,59
COEF. VAR.					0,02	0,02	0,04
% DIF.					-23,8%	3,4%	

PROCESSO SERIE II REPLICATA 1.

IB No	F(T _{0,z1})	T1=115,4		Fp = 9,2		FOBIO	FOBIO	FOFIS
		F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)	F(T1,z2)			
		Y1=5,99	Y2=TAB	y2=0,71	Y3=0,27			
		PF	HW	PF	HW			
17	7,9	47,0	48,0	33,4	13,0	9,0	10,2	
30	7,6	45,5	46,5	32,3	12,6	8,7	10,3	
33	8,4	50,0	51,0	35,5	13,8	9,6	11,5	
39	7,2	43,1	44,1	30,6	11,9	8,9	10,6	
8	8,2	49,2	50,2	35,0	13,6	9,4	10,7	
36	8,4	50,0	51,0	35,5	13,8	9,6	9,8	
3	8,2	49,1	50,1	34,9	13,5	9,4	10,0	
7	8,1	48,5	49,5	34,4	13,4	9,3	10,2	
14	8,0	48,0	49,0	34,1	13,2	9,2		
MEDIA		47,8	48,8	34,0	13,2	9,2	10,4	
DESVIO PADRAO					0,62	0,44	0,54	
COEF. VAR.					0,05	0,05	0,05	
% DIF.					-26,9%	11,5%		

PROCESSO SERIE II REPLICATA 2

IB No	F(T _{0,z1})	T1=115,5		Fp=9,1		FOBIO	FOBIO	FOFIS
		F(T1,z1)	F(T1,z2)	F(T1,z2)	F(T1,z2)			
		Y1=5,81	Y2=TAB	Y2=0,70	Y3=0,28			
		PF	HW	PF	HW			
12	7,9	45,9	46,9	32,1	13,1	9,0	10,0	
52	8,1	47,1	48,1	32,9	13,5	9,2	9,6	
27	7,9	46,0	47,0	32,2	13,2	9,0	10,7	
22	8,1	47,1	48,1	32,9	13,5	9,2	10,1	
55	8,0	46,5	47,5	32,5	13,3	9,1	10,4	
18	8,2	47,6	48,6	33,3	13,6	9,3	10,0	
34	7,9	45,9	46,9	32,1	13,1	9,0	9,9	
32	8,3	48,1	49,1	33,7	13,7	9,4	10,3	
23	8,2	47,4	48,4	33,1	13,5	9,3	10,1	
MEDIA		46,8	47,8	32,8	13,4	9,2	10,1	
DESVIO PADRAO					0,23	0,16	0,32	
COEF. VAR.					0,02	0,02	0,03	
% DIF.					-32,6%	8,9%		