

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS
CÉLULAS BACTERIANAS PELO MÉTODO DE
AQUECIMENTO PROGRAMADO

José de Jesús Ibarra León
Engº Bioquímico

Orientador:

Dr. Fumio Yokoya

Professor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

Aos meus pais, Rosalva e Francisco

À minha esposa, Rosalva

e à minha filha brasileira,

Xochitl Patricia,

com muito carinho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

	página
I - INTRODUÇÃO.	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
III - MATERIAIS E MÉTODOS	11
IV - RESULTADOS.	15
V - DISCUSSÃO	30
VI - CONCLUSÕES.	32
VII - BIBLIOGRAFIA.	33
VIII - APÊNDICE.	35

RESUMO

O método de temperatura programada para avaliar a resistência de fatores termicamente vulneráveis, desenvolvido por Hayakawa et al. (1969), foi testado para verificar a possibilidade do seu uso na medição da resistência ao calor das células de Staphylococcus aureus.

Os resultados indicam que o método é aplicável para a determinação da resistência de células microbianas ao calor, com a vantagem de se necessitar menos equipamento e ser mais rápido que qualquer dos métodos descritos anteriormente.

SUMMARY

The method of programmed heating to evaluate the resistance of thermally vulnerable factors, developed by Hayakawa et al. (1969), was tested to verify the possibility of its use in the measurement of the resistance to heat of cells of Staphylococcus aureus.

The results indicate that the method is applicable to the determination of the resistance of microbial cells to heat, with the advantage that it requires less equipment and is quicker than any of the methods described previously.

I- INTRODUÇÃO

No cálculo de letalidade da pasteurização e esterilização de alimentos por calor, dois aspectos são de fundamental importância:

(1) Penetração de calor, que trata da distribuição de calor durante o período de tratamento térmico; e,

(2) Resistência microbiana, que cuida do aspecto de destruição por calor das diferentes espécies e formas de microrganismos, responsáveis pela deterioração de alimentos ou causadores de perigo à saúde pública.

No tocante à resistência dos microrganismos ao calor, é importante lembrar que além das diferenças hereditárias ditadas pelas características das diferentes espécies ou linhagens, os fatores extrínsecos como meio de cultivo, meio de suspensão, idade das células e meio de sub-cultura influenciam na resistência aparente ao calor. Assim sendo, para que se tenha certeza da condição de pasteurização ou esterilização adequados, é necessário analisar o comportamento dos microrganismos no alimento em questão e nas condições específicas de processamento.

Desde que Bigelow e Esty (1920) descreveram o primeiro método para medir a resistência térmica das esporas bacterianas, muitas outras técnicas foram desenvolvidas por diversos autores, para medir a resistência dos microrganismos a diferentes temperaturas e condições de tratamento térmico. Esses métodos são descritos na revisão bibliográfica do presente trabalho.

Um método recente, desenvolvido por Hayakawa et al (1969) rece atenção especial. O método foi desenvolvido para determinar a destruição das enzimas e propriedades químicas do alimento durante a pasteurização ou esterilização. Seria de grande interesse verificar a possibilidade de usar esse método para determinar também os parâmetros de resistência térmica dos microrganismos pois o me

todo é rápido, simples e requer pouco aparelhagem de laboratório. O presente trabalho visa a verificar a possibilidade de aplicar o método para avaliar a resistência ao calor das células de Staphylococcus aureus.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A- Parâmetros de Resistência térmica

As características de resistência de fatores termicamente vulneráveis representam-se geralmente pelas chamadas curva de sobrevivência e curva de destruição térmica (Ball e Olson, 1957; Stumbo, 1965), as quais são representadas nas figuras 1 e 2.

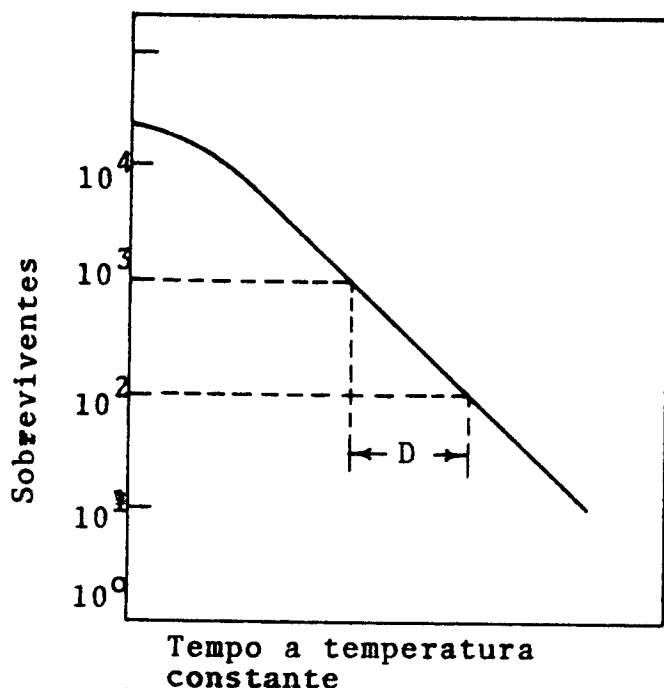


Figura 1 - Curva de sobrevivência

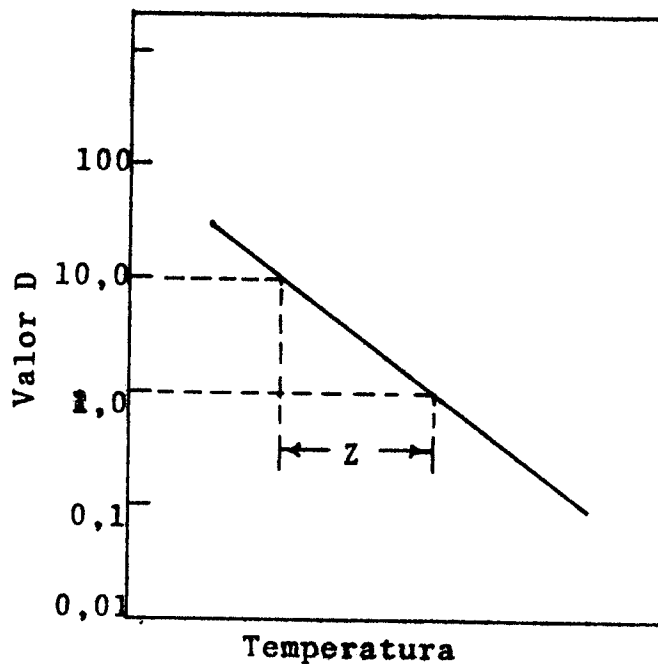


Figura 2 - Curva de destruição térmica

A curva de sobrevivência representa o número de sobreviventes quando as amostras são tratadas a temperatura letal e constante. Dessa curva obtem-se o valor, D, chamado também tempo de redução decimal e que representa o tempo em minutos necessários para destruir 90% de uma população microbiana.

A curva de destruição térmica, construída com valores D e suas temperaturas correspondentes, é definida por um índice de declive ou valor Z e um valor D de referência; sendo Z o número de graus (Centígrados ou Fahrenheit), necessários para diminuir 90% no valor D.

B- Métodos Tradicionais na Avaliação da Resistência Térmica de Microrganismos

Stumbo (1965) fez uma descrição detalhada das técnicas de laboratório usadas na avaliação da resistência térmica de microrganismos, classificando-as da seguinte maneira:

1 - Método do tubo TDT: Bigelow e Esty (1920) propuseram este método, que foi utilizado nos primeiros estudos sistemáticos de resistência térmica com temperaturas acima de 100°C. O material usado consistia de um banho provido de resistências elétricas, regulador de temperatura, agitador mecânico e como meio de aquecimento um líquido de ponto de ebulição elevado. A suspensão microbiana era colocada em pequenos tubos de ensaio cujo diâmetro variava entre 7 e 10 mm. Os tubos eram selados com chama de maçarico. Depois do tratamento térmico, prepararam-se as diluições e contaram os sobreviventes semeando-se em placas de Petri com um meio apropriado.

2 - Método da lata TDT: Procedimento desenvolvido pela American Can Company (1943) para estudos de resistência térmica de bactérias e esporos bacterianos, cujos valores obtidos foram utilizados no cálculo de processamento térmico desenvolvido também por esta companhia. O equipamento utilizado, denominado Unidade TDT, consistiu de uma pequena autoclave (15 cm de diâmetro e 30 cm de altura) com entradas de vapor, água fria, termômetro e manômetro, e com controle de vapor bastante preciso. A suspensão microbiana ou um alimento sólido inoculado era posto em pequenas latas (208 x 006). Após a recravação, as latas eram colocadas na autoclave. Depois do tratamento térmico, as latas eram incubadas diretamente ou feitas as diluições do conteúdo para contagem de sobreviventes.

3 - Método do Tanque: Proposto por Williams et al. (1937) para estudo de resistência térmica com amostragem intermediária e obtenção de dados de sobreviventes antes da destruição total da população microbiana. Consistiu de uma câmara cilíndrica de aço inoxidável.

dável, circundada por uma camisa de vapor. As dimensões eram aproximadamente 10 cm de diâmetro por 12 cm de altura, com uma capacidade máxima de 900 ml. Da parte inferior da câmara saíam 4 tubos com suas respectivas válvulas para amostragem. Também, possuía um mecanismo de agitação e uma entrada para termômetro. A câmara e seus dispositivos eram esterilizados com o próprio vapor da camisa por meio de válvulas que comunicavam todas as partes em contato com o produto.

Para ensaios, a suspensão microbiana era colocada e aquecida até a temperatura desejada. As amostras eram tiradas a intervalos de tempo previamente estabelecidos, resfriadas rapidamente em água gelada e inoculada diretamente em placas ou tubos, ou depois de preparar diluições para contagem de sobreviventes. A temperatura do tratamento era controlada pela pressão de vapor na camisa.

4 - Método do Frasco: Este método, descrito por Levine, et al., (1927) consistia de um frasco de destilação de 3 bocas. Na primeira boca era colocado um termômetro, na boca do meio um agitador, e a terceira utilizada para inoculação é retirada das amostras. O frasco era submerso em um banho de temperatura termostaticamente controlada para ensaios de resistência térmica de microrganismos. Townsend et al. (1956) descreveram um procedimento semelhante utilizando o mesmo tipo de frasco.

5 - Método do Tubo Capilar; Stern e Proctor (1954), construíram um aparelho que consistia de duas painéis de aço inoxidável e cuja função era a de conter os meios de aquecimento e resfriamento. A panela para aquecimento estava provida com um agitador mecânico, um termostato, um termômetro e um elemento aquecedor. As duas painéis estavam montadas sobre uma armação de latão. Uma placa de alumínio, perfurada para a colocação dos capilares, era acoplada a panela para aquecimento, que ligava automaticamente um sistema de cronometragem, quando submersa no banho, e desligava, quando a placa era retirada para por na panela de resfriamento. Depois do tratamento térmico, os tubos eram quebrados para subcul

tivo incubados num meio apropriado. Resende (1969), introduziu algumas modificações neste método para obter a transferência mais rápida dos tubos capilares do meio de aquecimento para o de resfriamento.

6 - Método do Termorresistômetro: O aparelho foi desenhado por Stumbo (1948), consistindo de um corpo metálico com 3 câmaras de vapor que podiam ser operadas independentemente. Uma placa de aço inoxidável com 6 furos para acomodar as amostras, contidos em pequenos copos, funcionava como transportador. A câmara do meio funcionava como meio de aquecimento com vapor controlado, uma das câmaras laterais estava provida de tubos contendo o meio de cultura para receber o produto termicamente tratado. Possuía um sistema automático para medição do tempo de tratamento, controlado por dois micro-interruptores, que eram ligados quando as amostras entravam na câmara central e desligados quando a válvula de vapor era fechada.

7 - Método do tubo TDT não selado: Schmidt (1950) desenhou este método, que evitava a necessidade de selar tubos, fechando-os somente com tampões de algodão. O tratamento térmico era feito numa autoclave em miniatura, cujas dimensões eram de aproximadamente 15 cm de diâmetro por 30 cm de altura. Esse aparelho possuía tubulações e válvulas para introduzir vapor, ar comprimido e água indispensáveis nos ensaios. A temperatura das amostras era medida com termelétricos. Depois do tratamento térmico, introduzia-se o ar comprimido na autoclave, seguido de água fria para o resfriamento da suspensão tratada. Para o cultivo de sobreviventes, adicionava-se diretamente meio de cultura apropriado na suspensão contida nos tubos. O método era usado principalmente para estudo de resistência térmica a temperaturas de 115° a 126°C.

C- Análise dos Dados de Resistência Térmica.

Segundo Stumbo (1965), são dois os procedimentos comumente empregados na análise dos dados de sobreviventes, para avaliar os parâmetros de resistência térmica, a saber:

1 - Construção de curvas de sobrevivência a temperatura constante, colocando o logarítmo do número de sobreviventes nas ordenadas e o tempo nas abscissas. Da curva obtida, pode-se calcular o valor D para essa temperatura de tratamento. Na figura 3 está apresentado um exemplo obtidos em ensaios feitos com esporos de Bacillus coagulans 43P (Yokoya e York, 1965) a temperatura de 96°C.

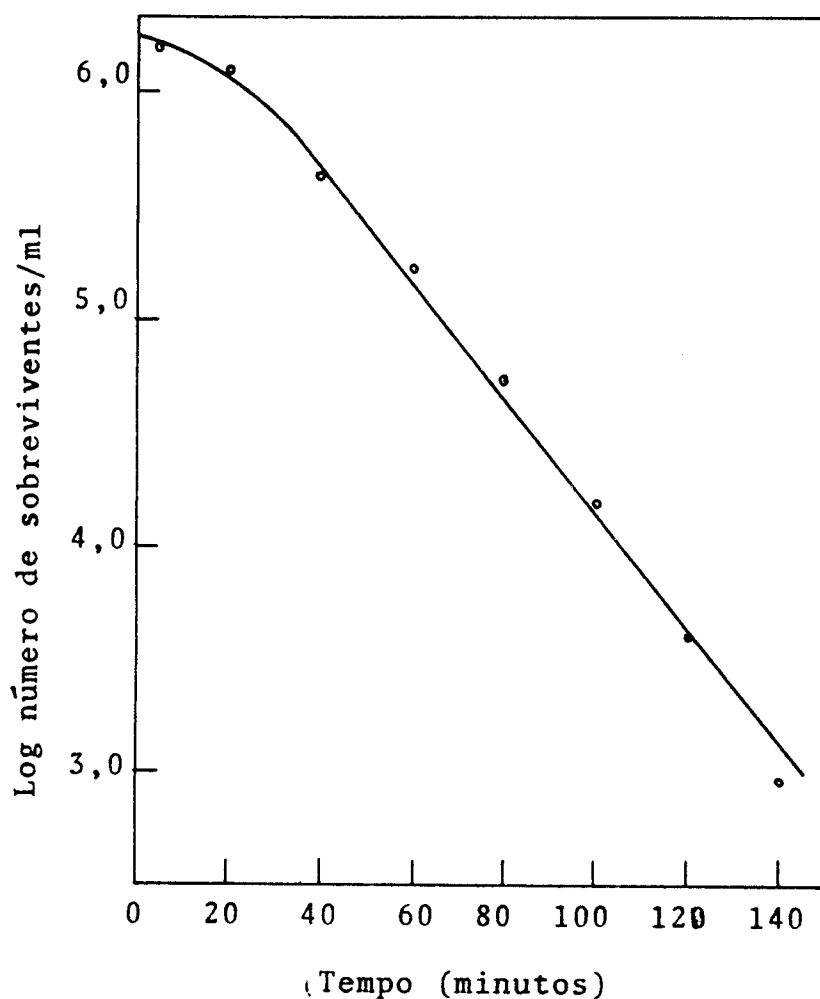


Figura 3: Curva de sobreviventes dos esporos de Bacillus coagulans 43P submetidos a tratamento térmico de 96°C (Dados de Yokoya e York, 1965).

2 - Supor uma ordem logarítmica de morte e calcular o valor D a partir da população inicial e do número de sobreviventes depois de um tempo determinado de tratamento, a temperatura constante. O número de sobreviventes pode ser obtido por contagem em pla

ou pelo método do número mais provável (NMP). Nesse último caso os sobreviventes são calculados segundo a equação de Halvorson and Zeigler (1932).

$$b = \frac{2,303}{a} \log \frac{n}{q}$$

onde:

b- NMP de sobreviventes por ml de suspensão tratada

a- Volume em ml de cada amostra tratada

n- Número total de amostras retiradas para cada tempo de tratamento a temperatura constante

q- Número de amostras de um mesmo tempo de tratamento, que não apresentaram crescimento

Conhecido b, calcula-se o valor D pela seguinte equação (Stumbo, 1965):

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

onde:

a- População microbiana inicial por volume unitário

b- Número de sobreviventes por volume unitário depois de um tempo t de tratamento.

t- Tempo de tratamento a temperatura constante

O seguinte exemplo de Stumbo (1965) para um ensaio no termoresistômetro, com uma suspensão de esporos (ativados a 100°C por 0.46 minutos) de P.A. 3679, cuja concentração inicial foi de 2.560.000 esporos/ml, ilustra o método. Quando o tratamento em amostras de 0,01 ml de suspensão acima foi de 115,5°C por 25 minutos

obteve-se crescimento em 2 dos 6 tubos tratados, pelo que o NMP foi calculado da seguinte maneira:

$$b = \frac{2,303}{0.01} \log \frac{6}{4}$$

$$b = 40,55 \text{ esporos/ml}$$

O valor D é obtido pela seguinte equação:

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

$$D = \frac{25}{\log 2.560.000 - \log 40,55}$$

$$D = 5,20 \text{ minutos}$$

D- Método de Temperatura Programada

Hayakawa et al (1969) desenvolveram um método para avaliar a resistência de fatores termicamente vulneráveis, que consiste no tratamento das amostras a temperaturas crescentes, obtendo-se da dos de sobreviventes a tempos e temperaturas variáveis. Com os da dos obtidos e utilizando fórmulas deduzidas da equação para o cal culo de letalidade de processamento térmico, calculam-se os valo res Z e D do fator considerado.

1 - Fundamento do Método:

Na avaliação do valor letal de um processamento térmico, é necessário conhecer o valor Z do fator termicamente vulnerável con siderado. São indispensáveis, também, os dados de penetração de ca lor no produto tratado. Com estes dois tipos de dados, calcula-se a letalidade do tratamento aplicado.

No método desenvolvido por Hayakawa et al (1969), calculam-se os valores Z e D a partir dos dados de penetração de calor e número

de sobreviventes, obtidos para 5 ou 6 amostras retiradas num mesmo experimento. O método é aplicável assumindo-se as seguintes condições:

- (a) A distribuição da temperatura na amostra deve ser uniforme
- (b) A curva de destruição térmica deve ser uma linha reta
- (c) As curvas de sobrevivencia devem ser lineares, exceto para a porção curvilínea inicial
- (d) Quando se introduz um termelétrico na amostra, este não deve influenciar na temperatura real da suspensão.

Destas, os postulados "b" e "c" têm sido comprovados experimentalmente (Ball e Olson, 1957; Stumbo, 1965).

A condição "a" é obtida quando as dimensões do recipiente que contem a amostra são relativamente pequenas, de tal forma que a temperatura seja praticamente igual em todos os pontos da suspensão. A condição "d" deve ser conseguida se o diâmetro do termelétrico for bastante pequeno em relação ao diâmetro do tubo que contém a amostra.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

A - Materiais

1- Microrganismos: Os testes foram conduzidos com Staphylococcus aureus, N° 50, da coleção de microrganismos da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

2- Meio de Cultivo: As células microbianas foram obtidas cultivando-se por 24 horas em meio BHI (Brain Heart Infusion) da DIFCO, catálogo n° 37.

3- Meio de Contagem; A contagem de sobreviventes foi feita em Agar Nutriente da DIFCO, catálogo n° 1.

4- Banho para tratamento com aquecimento programado: Foi usado um recipiente de parede dupla de aço inoxidável, contendo no espaço intermediário revestimento de amianto para reduzir a perda de calor pelas paredes. As dimensões externas eram: 33cm de diâmetro e 23 cm de altura. O aquecimento foi obtido usando-se uma ou duas resistências com revestimento de cobre, de 1000 Watts cada.

5- Banho para tratamento a temperatura constante: Usou-se um banho com controle automático de temperatura e agitação mecânica constante do líquido por palhetas. O aparelho é provido de relê e termostato de mercúrio com precisão de ± 0.1 C.

6- Monitor de temperatura: A temperatura dos diferentes pontos foi registrada por meio de termelétricos de Cobre-- Constantam revestidos com aço inoxidável, fabricados seguindo as especificações da Ecklund (1949). O terminal destes termelétricos era acoplado a um registrador eletrônico de temperatura de resposta rápida (leitura de 0,25 segundos) fabricado pela Doric Scientific, Inc.

7- Meio de suspensão: As células microbianas, após lavagem, foram suspensas em água salina 0,85% (Collins, 1969), para o seu tratamento térmico.

8- Tratamento de células: A suspensão microbiana foi aquecida em pequenos tubos de ensaio de 9,5 mm de diâmetro externo por 100 mm de comprimento e 1 mm de espessura, fechados com tampões de borracha; aproximando-se ao método do tubo TDT não selado.

9- Centrífuga: Foi usada uma centrífuga refrigerada de alta velocidade, modelo B20-A, da International Equipment Co.

10- Aparelho Ultrassom: Foi utilizado um vibrador ultrassom do tipo banho, da Heat Systems Ultrasonic.

11- Incubador-Agitador: Foi usado um incubador-agitador fechado G-25, da New Brunswick Scientific.

B- Métodos:

1- Preparo da suspensão microbiana: Num frasco Erlenmayer de 500 ml, contendo 100 ml de meio BHI esterilizado a 121° C por 15 minutos, inoculou-se com uma alçada da cultura e incubou-se a 37°C por 24 horas sob agitação a 250 rpm. Depois da incubação, tomaram-se 10 ml da suspensão microbiana, centrifugando-se a 3,300 g (5000 rpm) por 5 minutos, eliminando-se o sobrenadante e ressuspensando-se com 30 ml de solução salina 0,85% esterilizada. Em cada tubo foram colocados 2 ml desta suspensão para os ensaios de tratamento térmico.

2- Tratamento térmico: Para aquecimento programado foram utilizadas duas velocidades de incremento de temperatura: Uma rápida com incremento de 3°C por minutos e outra lenta de 1,4°C por minuto. Nos ensaios para tratamento a temperatura constante foram utilizadas 55° e 60°C.

3- Contagem de sobreviventes: As amostras tratadas termicamente foram resfriadas imediatamente em água fria; após as diluições adequadas com água salina 0,85%, semeou-se um ml de cada uma das três últimas diluições em placas de Petri com Agar Nutriente derretido e resfriado a 45°C (em triplicata). Após a solidificação, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e fez-se a contagem de número de sobreviventes.

4- Cálculo dos parâmetros de resistencia térmica: Para se aplicar o método de aquecimento programado, foi necessário fazer a distinção entre 2 configurações diferentes, obtidas quando se colocaram em gráficos os dados de incremento de temperatura da suspensão. Tais configurações eram as seguintes: (i) Uma linha reta

em coordenadas cartesianas; (ii) Uma combinação de segmentos de linhas retas em coordenadas cartesianas.

Quando a curva de incremento era uma linha reta em coordenadas cartesianas, utilizaram-se as seguintes equações (Hayakawa et al 1969) na avaliação dos parâmetros de resistência térmica:

$$\frac{\log(C_3/C_2)}{\log(C_2/C_1)} = \frac{10^{(T_3-T_2)/z} - 1}{1 - 10^{(T_1-T_2)/z}} \quad (1)$$

$$Dr = \frac{z}{\log(C_{t-1}/C_t) \ln 10} \cdot 10^{(T_{t-1}-T_r)/z} \cdot \frac{10^{(T_t-T_{t-1})/z} - 1}{a_t} \quad (2)$$

onde:

C1, C2, C3 - Sobreviventes nas amostras 1, 2 e 3.

T1, T2, T3 - Temperaturas atingidas nas amostras 1, 2 e 3

Tr - Temperatura de referência

1 - Amostra 2 ou 3

Al - Declive da curva de penetração de calor

Quando a curva de incremento de temperatura era uma combinação de segmentos de linhas retas, utilizaram-se as equações (Hayakawa et al 1969) seguintes na avaliação dos valores Z e D:

$$\frac{a_j \log(C_j/C_{j-1})}{a_{j-1} \log(C_{j-1}/C_{j-2})} = \frac{10^{(T_j-T_{j-1})/z} - 1}{1 - 10^{(T_{j-2}-T_{j-1})/z}} \quad (3)$$

$$Dr = \frac{z}{\log(C_{t-1}/C_t) \ln 10} \cdot 10^{(T_{t-1}-T_r)/z} \cdot \frac{10^{(T_t-T_{t-1})/z} - 1}{a_t} \quad (4)$$

onde:

$j, j-1, j-2, j-3, \dots, j-n$ - número da amostra corresponde ao
segmento $j, j-1, j-2, j-3, \dots, j-n$.

l- $j-1$ ou j

Tr- Temperatura de referencia

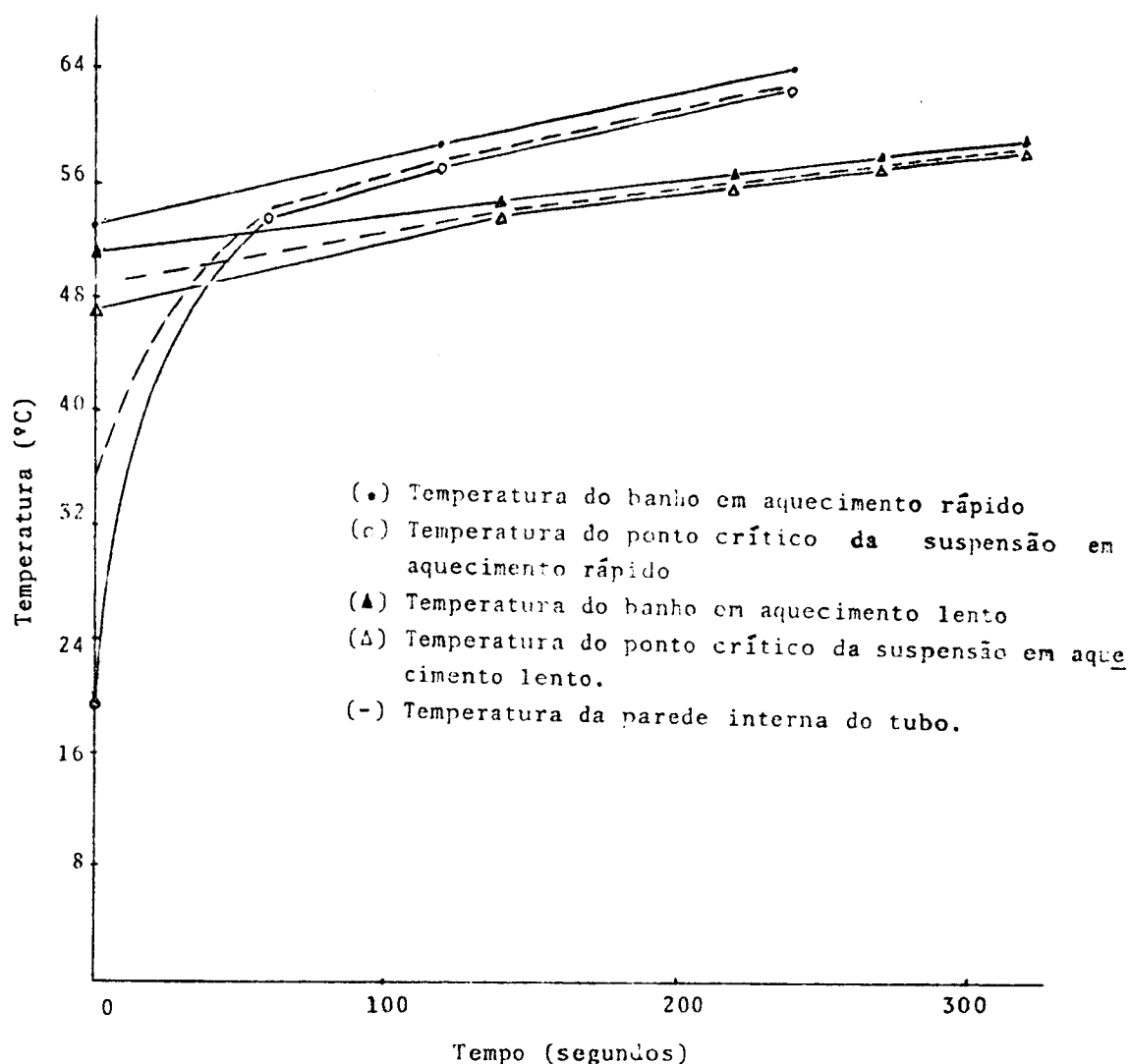
A1- Declive do segmento 1

IV RESULTADOS

A. Curva de Incremento de Temperatura no Aquecimento Programado.

A FIGURA 4 mostra o incremento de temperatura do banho, da parede interna do tubo e do ponto crítico da suspensão de células, respectivamente aos ensaios de aquecimento rápido e lento. A temperatura no ponto crítico foi aquela do eixo central e a 20 mm do fundo do tubo. A diferença de temperatura entre a do banho e do ponto crítico em um dado momento não foi superior a 1°C para o ensaio com aquecimento rápido e 0,6°C para o de aquecimento lento, exceto nos primeiros 2 minutos.

FIGURA 4 - Curvas de Incremento de Temperatura Para Aquecimento Programado.



B. Resistência Térmica Determinada pelo Método de Aquecimento Programado.

(1) Aquecimento rápido

Os resultados obtidos nos 3 experimentos feitos com incremento rápido de temperatura (3°C por minuto), são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 - Resultados de Sobreviventes Para o Experimento de Temperatura Programada (aquecimento rápido).

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Sobreviventes (Nº/ml)	Sobreviventes (%)	Declive (°C/min)
<u>Primeira Repetição</u>					
1	31,4	0	$3,2 \times 10^8$	100,00	- - -
2	53,7	1	$2,2 \times 10^8$	68,75	18,30
3	57,6	2	$6,7 \times 10^7$	20,93	3,90
4	60,6	3	$5,1 \times 10^5$	0,16	3,00
<u>Segunda Repetição</u>					
1	11,4	0	$4,3 \times 10^8$	100,00	- - -
2	52,4	1	$2,6 \times 10^8$	60,46	41,0
3	56,2	2	$9,0 \times 10^7$	20,93	3,8
4	59,2	3	$3,4 \times 10^6$	0,79	3,0
5	61,7	4	$8,8 \times 10^3$	0,002	2,5
<u>Terceira Repetição</u>					
1	9,5	0	$5,06 \times 10^8$	100,00	- - -
2	53,4	1	$3,13 \times 10^8$	61,85	43,90
3	57,1	2	$3,36 \times 10^7$	6,64	3,70
4	62,4	4	$4,0 \times 10^3$	0,0008	2,65

Os dados obtidos foram colocados num gráfico (FIGURA 5) locando-se o logarítmo da porcentagem de sobreviventes contra a temperatura e a curva mais apropriada foi obtida visualmente. Dessa curva foram tiradas as porcentagens de sobreviventes correspondentes a 6 temperaturas seleccionadas, mostradas na TABELA 2.

FIGURA 5 .- Curva de sobreviventes para aquecimento programado, incremento rápido.

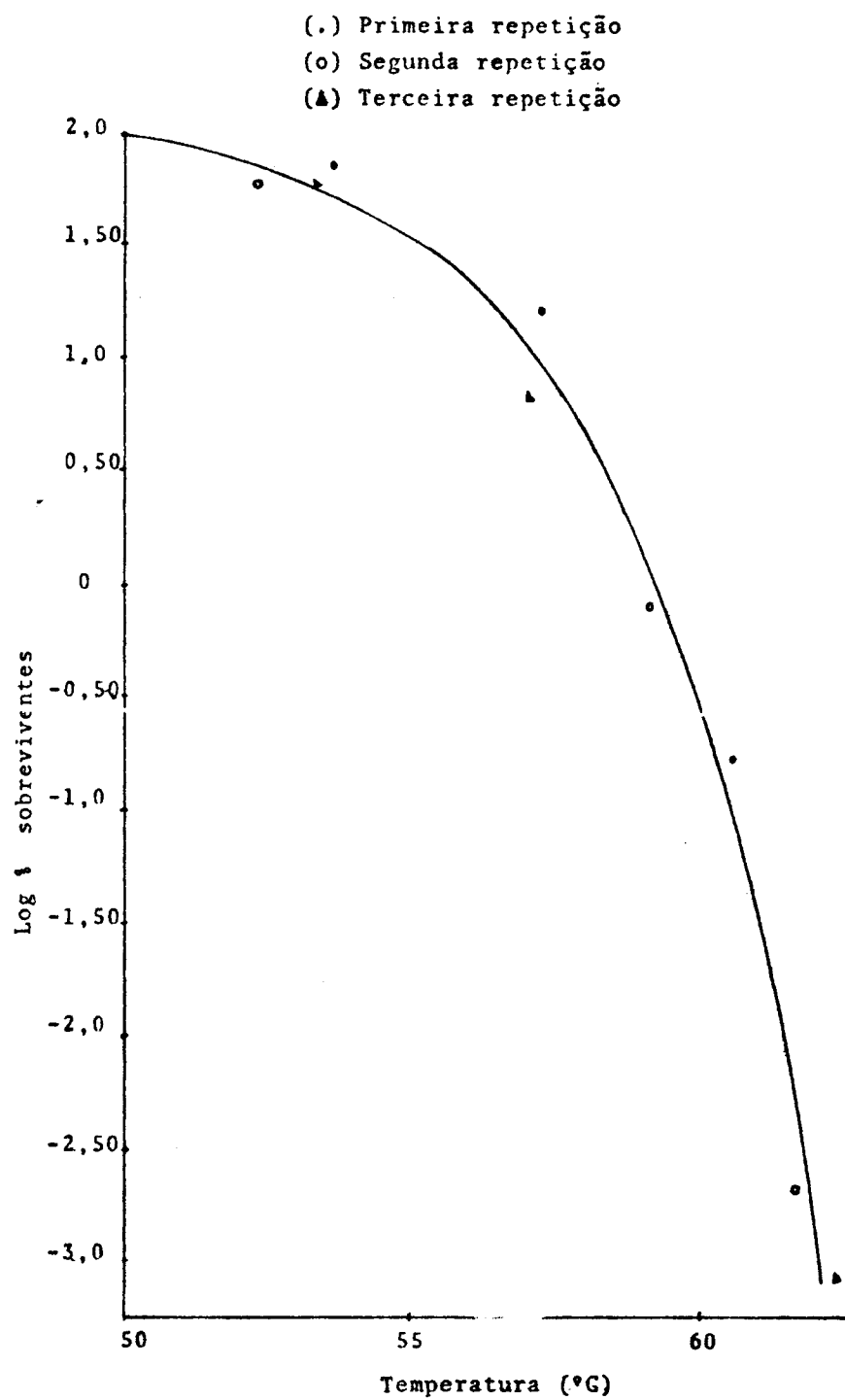


TABELA 2 - Resultados de Sobreviventes Obtidos Graficamente dos Experimentos Com Temperatura Programada (aquecimento rápido).

Amostra	Temperatura	Log % Sobreviventes
1	52,0	1,900
2	56,0	1,425
3	58,0	0,825
4	59,0	0,300
5	60,5	-0,850
6	61,5	-2,175

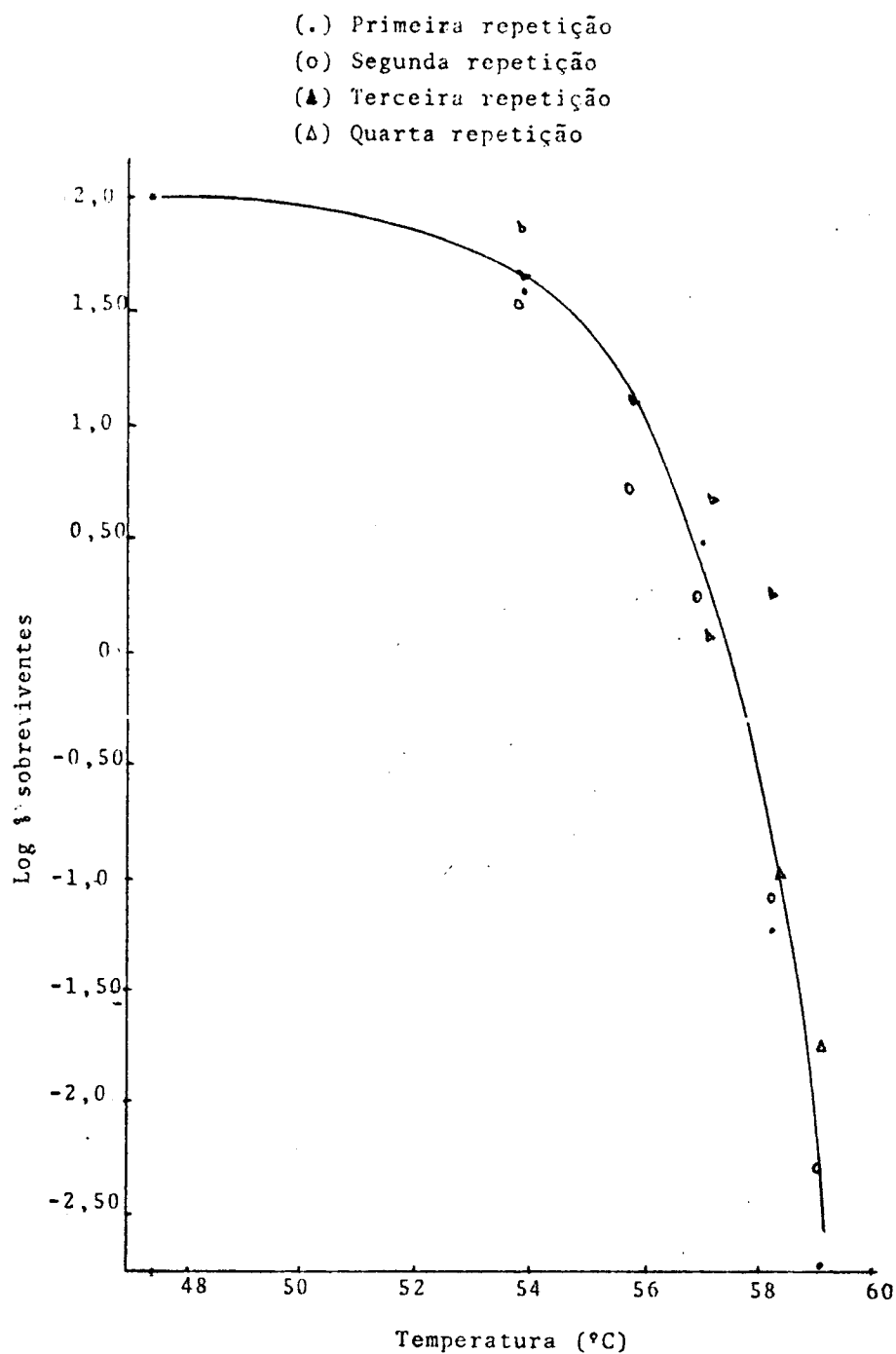
(2) Aquecimento Lento: Os resultados para a primeira série de 4 experimentos, estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - Dados de sobreviventes para o experimento com temperatura programada (aquecimento lento).

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (seg)	Sobreviventes (N°/ml)	Incremento Temperatura (°C/min)
<u>Primeira repetição</u>				
1	47,3	0	227 x x 10 ⁷	- -
2	53,8	140	207 x 10 ⁷	2,78
3	55,7	220	317,3 x 10 ⁶	1,42
4	57,0	270	72 x 10 ⁵	1,56
5	58,2	320	132 x 10 ⁴	1,44
6	59,0	355	30 x 10 ³	1,37
<u>Segunda Repetição</u>				
1	47,3	0	146 x 10 ⁶	- -
2	53,3	94	49 x 10 ⁶	4,14
3	55,7	196	82,3 x 10 ⁵	1,11
4	57,0	252	85,6 x 10 ⁴	1,39
5	58,2	298	111,3 x 10 ³	1,78
6	59,0	335	73,5 x 10 ²	1,29
<u>Terceira Repetição</u>				
1	47,3	0	149,6 x 10 ⁷	- -
2	53,8	136	67,6 x 10 ⁷	2,86
3	55,7	214	189,6 x 10 ⁶	1,46
4	57,0	265	67 x 10 ⁶	1,53
5	58,2	312	272,3 x 10 ⁵	1,53
6	59,0	351	-----	1,23
<u>Quarta Repetição</u>				
1	47,3	0	121,3 x 10 ⁷	- -
2	53,8	132	115,3 x 10 ⁷	2,95
3	55,7	207	-----	1,52
4	57,0	257	136 x 10 ⁵	1,56
5	58,2	302	111,3 x 10 ⁴	1,60
6	59,0	339	225 x 10 ³	1,29

A FIGURA 6 mostra a destruição dos microrganismos quando o incremento de temperatura foi de 1,4 °C/min. Essa figura foi obtida locando-se o logarítmo da porcentagem de sobreviventes contra a temperatura.

FIGURA 6 .- Curva de sobreviventes para aquecimento programado, incremento lento primeira série.



Dos dados da TABELA 3 foram calculados os valores médios do logarítmo da porcentagem de sobreviventes para cada temperatura de tratamento, assim como as médias dos declives , obtendo-se a TABELA 4.

TABELA 4 - Média do Logarítmo da Porcentagem de Sobreviventes e Incremento de Temperatura dos Experimentos de Aquecimento Lento.

Amostra	Temperatura (°C)	Log % Sobreviventes	Incremento temperatura (°C/min)
1	47,3	2,0000	- - - -
2	53,8	1,8212	3,182
3	55,7	0,6731	1,377
4	57,0	-0,2274	1,510
5	58,2	-1,1307	1,587
6	59,0	-2,3106	1,295

Os resultados para os 3 experimentos da segunda série com aquecimento lento estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 - Dados de Sobreviventes para o Experimento Com Temperatura Programada (aquecimento lento) - segunda série.

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (seg)	Sobreviventes (Nº/ml)	Incremento Temperatura (°C/min)
<u>Primeira Repetição</u>				
1	47,3	0	$164,6 \times 10^7$	- -
2	53,8	135	125×10^7	2,88
3	55,7	210	$40,5 \times 10^7$	1,52
4	57,0	263	41×10^6	1,47
5	58,2	306	$40,6 \times 10^5$	1,67
6	59,0	348	$38,6 \times 10^4$	1,14
<u>Segunda Repetição</u>				
1	47,3	0	142×10^7	- -
2	53,8	124	$111,3 \times 10^7$	3,14
3	55,7	197	53×10^7	1,56
4	57,0	248	46×10^6	1,53
5	58,2	291	$81,5 \times 10^5$	1,67
6	59,0	328	43×10^4	1,29
<u>Terceira Repetição</u>				
1	47,3	0	$230,6 \times 10^7$	- -
2	53,8	136	$122,3 \times 10^7$	2,86
3	55,7	214	$35,6 \times 10^7$	1,46
4	57,0	268	$90,3 \times 10^6$	1,44
5	58,2	314	202×10^5	1,56
6	59,0	351	$151,6 \times 10^4$	1,29

A FIGURA 7, mostra o logarítmo da porcentagem de sobreviventes em função da temperatura, da segunda série de ensaios com aquecimento lento. Com dos dados da TABELA 5 calcularam-se os valores médios do logarítmo da porcentagem de sobreviventes para cada temperatura de tratamento, assim como as médias dos declíves que são apresentados na TABELA 6.

FIGURA 7 .- Curva de sobreviventes para aquecimento programado, incremento lento segunda série

- (.) Primeira repetição
- (o) Segunda repetição
- (▲) Terceira repetição

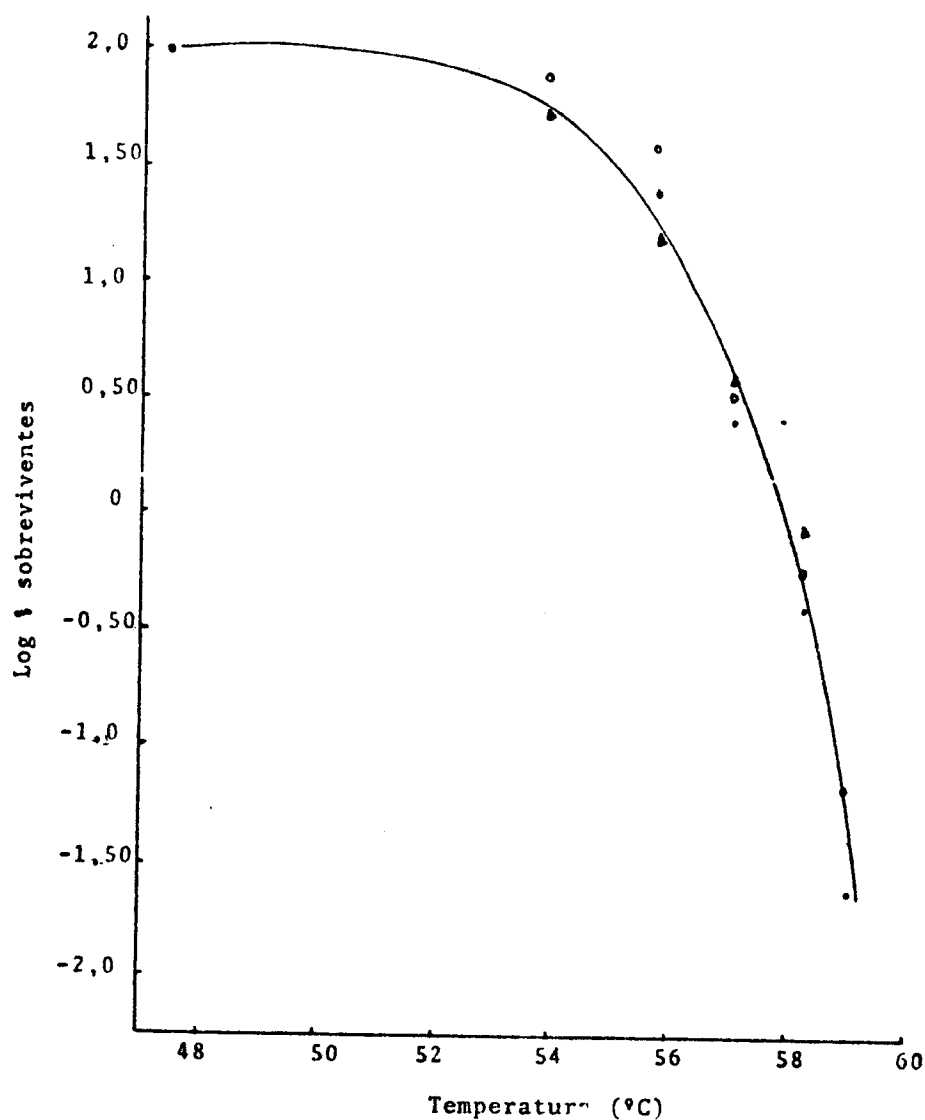


TABELA 6 - Médias do Logarítmo da Porcentagem de Sobreviventes e Incrementos de Temperatura da Segunda Série de Ensaio com Aquecimento Programado Lento.

Amostra	Temperatura (°C)	Lo % Sobreviventes	Incremento Temperatura (°C/min)
1	47,3	2,0000	- -
2	53,8	1,8330	2,960
3	55,7	1,3837	1,513
4	57,0	0,4991	1,480
5	58,2	-0,3081	1,633
6	59,0	-1,4494	1,240

C. Resistência Térmica Avaliada pelo Método do Aquecimento a Temperatura Constante.

(1) Tratamento a 55°C.

Os resultados obtidos nos 3 experimentos feitos a 55°C estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 - Dados de Sobreviventes no Tratamento a Temperatura Constante Conduzida a 55°C.

Amostra	Tempo (seg)	Repetição I	Repetição II	Repetição III
1	0	132 x 10 ⁷	277,6 x 10 ⁷	108 x 10 ⁷
2	240	169 x 10 ⁶	148,3 x 10 ⁶	119 x 10 ⁶
3	480	62,6 x 10 ⁵	74 x 10 ⁵	37,6 x 10 ⁵
4	720	129,3 x 10 ⁴	-----	171 x 10 ³
5	960	-----	170,3 x 10 ²	-----

Os resultados obtidos nos 3 experimentos feitos a 60°C estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 - Dados de Sobreviventes no Tratamento a Temperatura Constante Conduzida a 60°C.

Amostra	Tempo (seg)	Repetição I	Repetição II	Repetição III
1	0	275×10^7	$30,8 \times 10^8$	$38,3 \times 10^8$
2	40	-----	266×10^7	264×10^7
3	80	143×10^5	$68,3 \times 10^6$	34×10^6
4	110	$231,3 \times 10^3$	179×10^4	$59,3 \times 10^4$
5	140	$120,6 \times 10^2$	$118,6 \times 10^3$	106×10^2

As FIGURAS 8 e 9 mostram os gráficos de sobreviventes obtidos quando os resultados dos ensaios com aquecimento a temperatura constante foram colocados em papel semi-logarítmico. Nestes gráficos, o logarítmo do número de sobreviventes foi locado em função do tempo.

FIGURA 8 .- Curvas de sobreviventes para aquecimento a temperatura constante, 55°C.

- (.) Primeira repetição
- (o) Segunda repetição
- (▲) Terceira repetição

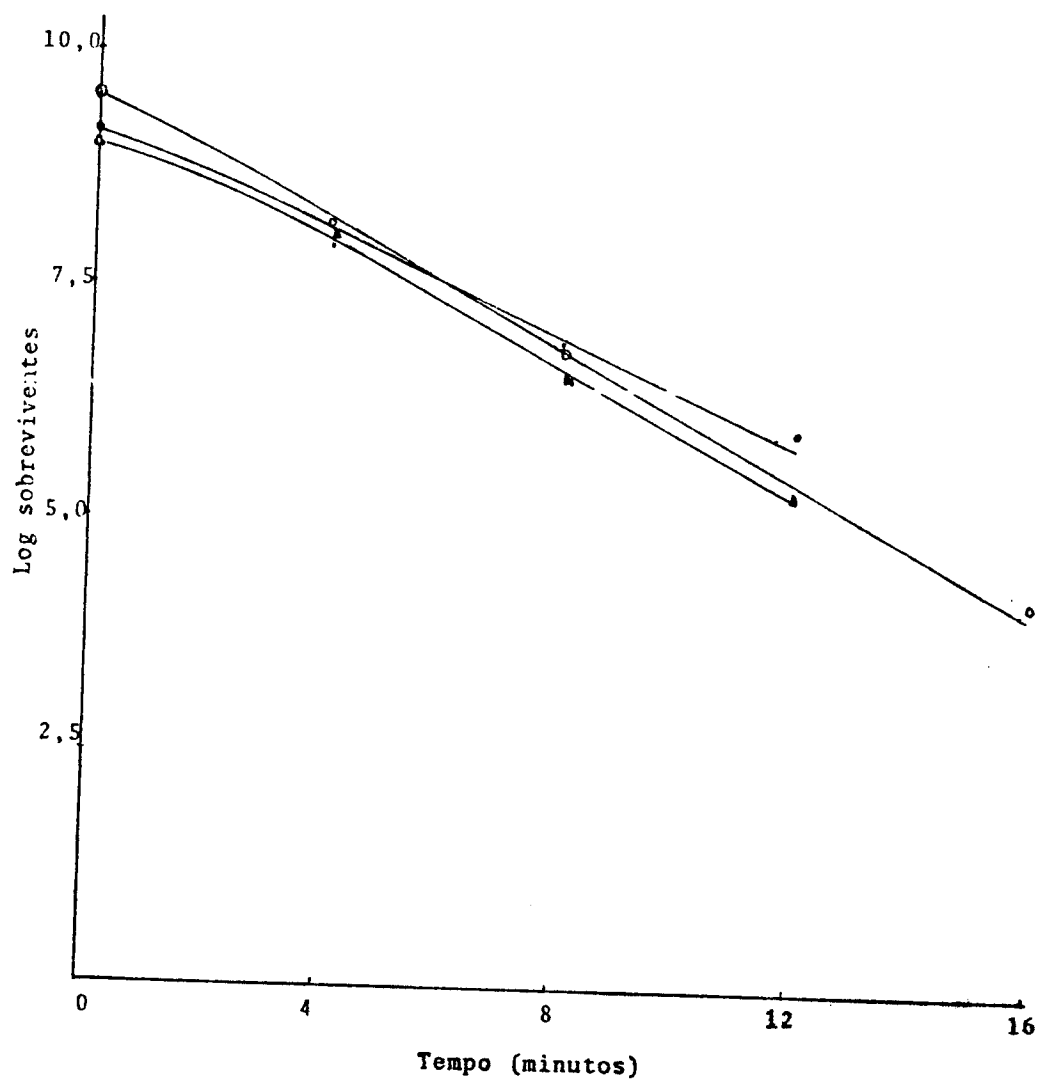
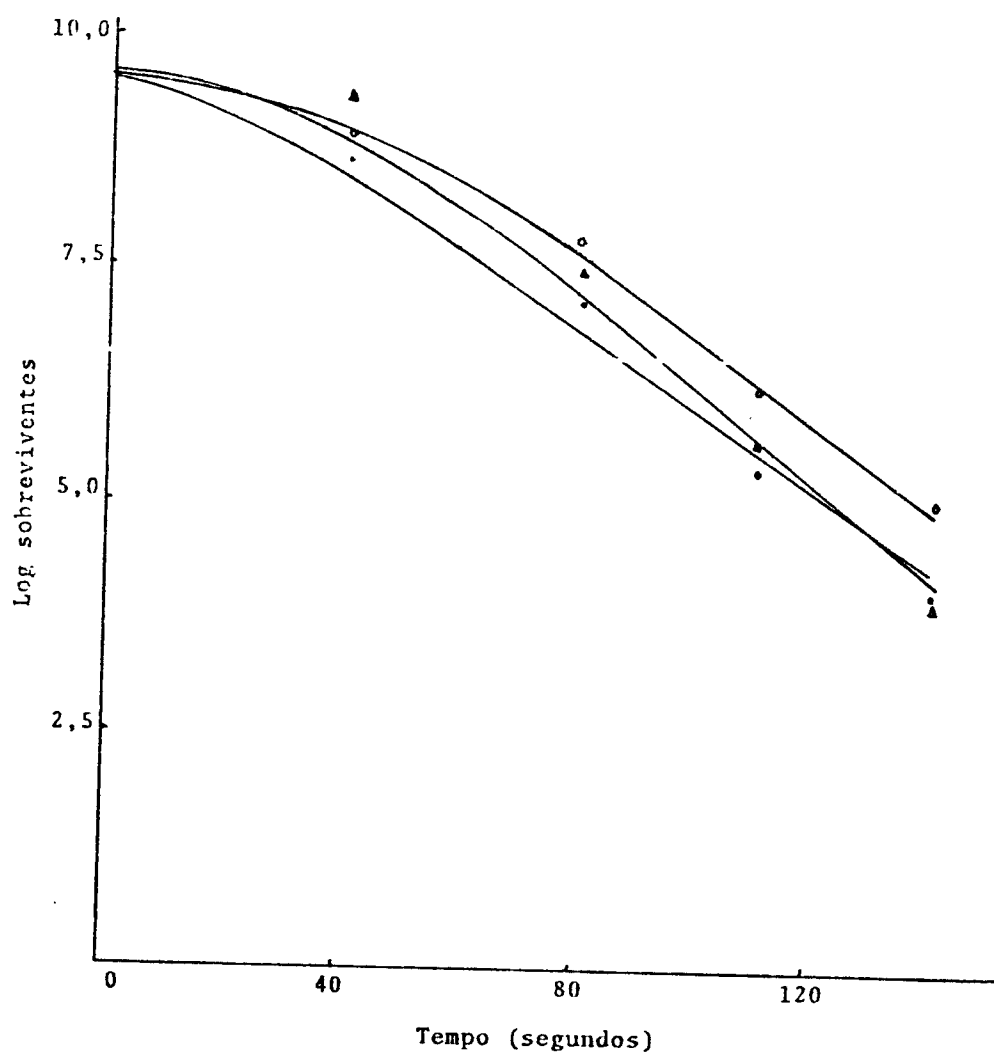


FIGURA 9 .- Curvas de sobreviventes para aquecimento a temperatura constante, 60°C.

- (.) Primeira repetição
- (o) Segunda repetição
- (▲) Terceira repetição



Os valores Z e D calculados com os dados das tabelas 2,4, e 6 usando-se as equações de Hayakawa et. al (1969), mostram-se na TABELA 9.

Para o cálculo dos parâmetros nos ensaios de aquecimento rápido foi considerado o incremento de temperatura obedecendo a progressão retílinea e portanto usando as equações 1 e 2. Para o caso de ensaios de aquecimento lento o incremento de temperatura foi considerado como sendo em segmentos de reta e foram usadas as equações 3 e 4.

TABELA 9 - Valores dos Parâmetros de Resistência Térmica Determinados Para os Ensaio de Aquecimento Programado.

Temperatura Programada	Z (°C)	D ₅₅ (min)	D ₆₀ (min)	Observações
Aquecimento rápido	5,20	3,57	0,39	Amostras 6,5,4, tabela 2
	>10*	----	----	Amostras 5,4,3, tabela 2
	6,00	2,45	0,36	Amostras 4,3,2, tabela 2
Aquecimento lento	4,80	3,19	0,28	Amostras 6,5,4, tabela 4
	16,00*	----	----	Amostras 5,4,3, tabela 4
	4,75	3,01	0,29	Amostras 6,5,4, tabela 6
	16,00*	----	----	Amostras 5,4,3, tabela 6

(*) Dados não recomendados para serem considerados nos cálculos dos parâmetros Z e D, segundo Hayakawa et al (1969).

Os valores D obtidos nos ensaios a temperatura constante (55° e 60°C), assim como as médias para ambos os casos, mostram-se na TABELA 10.

TABELA 10 - Valores dos Parâmetros de Resistência Térmica Determinados Para os Ensaaios a Temperatura Constante.

Repetição	D ₅₅ (min)	D ₆₀ (min)	Z (°C)
1	3,2	0,35	- -
2	3,1	0,34	- -
3	3,0	0,30	- -
Média:	3,1	0,33	5,1

V- DISCUSSÃO

Os resultados de incremento de temperatura do banho, da pare de interna do tubo e do ponto crítico da suspensão, mostraram que a diferença de temperatura entre a do ponto crítico e da pare de interna do tubo é inferior a $0,3^{\circ}\text{C}$, tanto para ensaios com aquecimento rápido como para com aquecimento lento, exceto nos primeiros 2 minutos de aquecimento. Isso evidencia que a distribuição uniforme de temperatura no tubo (condição a de Hayakawa et al. 1969) foi virtualmente conseguida nos ensaios. Também o incremento de tempe ratura foi praticamente linear em função do tempo.

O efeito da colocação de termelétricos no tubo sobre a forma de curva de aquecimento da suspensão foi reduzido ao mínimo, usan do-se um termelétrico fino (2 mm de diâmetro) e longo, deixando-se um espaço de mais de 50 mm entre a superfície livre do líquido e o ponto de inserção do mesmo. Com isso reduziu-se ao mínimo a condu ção de calor através do termelétrico.

Os valores de D e Z, obtidos pelo método de temperatura pro gramada (tabela 9), foram praticamente iguais àqueles obtidos pelo método de temperatura constante (tabela 10). As diferenças dos va lores de D e Z para esses dois métodos não foram superiores a 10%. Isso mostra que o método de temperatura programada, proposto por Hayakawa et al. (1969), pode ser usado, também, para avaliação dos parâmetros de resistência térmica das células bacterianas.

As vantagens desse método sobre os "clássicos" consistem na simplicidade da aparelhagem de aquecimento, na rapidez e na menor quantidade de material e trabalho necessários para realizar os en saios.

Os resultados obtidos com ensaios de aquecimento rápido e lento (tabela 9) mostraram que o incremento de $1,4^{\circ}\text{C}$ por minuto era mais adequado que aquele de $3,0^{\circ}\text{C}$ por minuto. Além disso, as operações de amostragem, resfriamento e cronometragem eram mais fáci eis quando se usava o aquecimento lento.

Desta forma, as condições limites de incremento de temperatu ra sugeridas por Hayakawa et al. (1969), de $4-5^{\circ}\text{F}$ ($2,2-2,7^{\circ}\text{C}$) por

minuto ou menos, são aplicáveis também para o caso de microrganismos.

Por outro lado, os valores obtidos no presente trabalho para os parâmetros de resistência térmica, concordam com aqueles reportados na literatura. Thomas et al. (1966), por exemplo, encontraram valores D_{60} entre 2,01 - 3,28 minutos e valores Z entre 5,0 - 5,7°C para Staphylococcus aureus 196 E. Walker et al. (1966) obtiveram valores D_{60} entre 0,43 - 1,33 minutos.

VI- CONCLUSÕES

1. O método de aquecimento programado pode, também, ser usado para avaliar os parâmetros de resistência térmica de células vegetativas. Os valores obtidos para os parâmetros D e Z pelo método de aquecimento programado concordaram com aqueles do aquecimento a temperatura constante.

2. O método é mais convenientemente aplicável quando o incremento de temperatura é de aproximadamente 2°C por minuto.

VII- BIBLIOGRAFIA

- American Can Company. 1943. The Canned Food Reference Manual.
American Can Co. New York.
- Ball, C.O. e Olson, F.C. 1957. Sterilization in Food Technology.
McGraw-Hill Book. New York.
- Bigelow, W.D. e Esty, J.R. 1920. Thermal Death Point in Relation
to Time of Typical Thermophilic Organisms. J. Infect.Diseases.
27,602.
- Collins, C.H. 1969. Métodos Microbiológicos. Editorial Acribia
Espanña
- Ecklund, O.F. 1949. Apparatus for the Measurement of the Rate of
Heat Penetration in Canned Foods. Food Tech. 3,231.
- Halvorson, H.O. e Zeigler, N.R. 1932. Application of Statistics in
Bacteriology. J. Bacteriol. 25,101.
- Hayakawa, K.I.; Schnell, P.G. e Kleyn, D.H. 1969. Estimating Thermal
Death Time Characteristics of Thermally Vulnerable Factors by
Programmed Heating of Sample Solution or Suspension. Food Tech
23,104.
- Hayakawa, K.I. 1971. Modernos Conceitos e Técnicas na Avaliação da
Esterilização de Alimentos.
Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos.
Campinas.
- Levine, M.; Buchanan, J.H. e Lease, G. 1927. Effect of Concentration
and Temperature on Germicidal Efficiency of Sodium Hydroxide.
Iowa State Coll. J. Sci. 1,379.
- Resende, R.; Francis, F.J. e Stumbo, C.R. 1969. Thermal Destruction
and Regeneration of Enzymes in Green Bean and Spinach puree. Food
Tech. 23,63.

- Schmidt, C.F. 1950. A Method for Determination of the Thermal Resistance of Bacterial Spores. J. Bacteriol. 59,433.
- Stern, J.A. e Proctor, B.E. 1954. A micro-Method and Apparatus for the Multiple Determination of Rates of Destruction of Bacteria and Bacterial Spores Subjected to Heat. Food Tech.8,139.
- Stumbo, C.R. 1948. A Technique for Studying Resistance of Bacterial Spores to Temperatures in the Higher Range. Food Tech 2,228.
- Stumbo, C.R. 1965. Thermobacteriology in Food Processing. Academic press. New York.
- Thomas, C.T.; White, J.C. e Longrée, K. 1966. Thermal Resistance of Salmonellae and Staphylococci in Foods. Appl. Microbiol. 14,815.
- Townsend, C.T. Somers, I.I., Lamb, F.C. e Olson, N.A. 1956. A Laboratory Manual for the Canning Industry. National Canners Association Research Laboratories. Washington, D.C.
- Walker, G.C.; e Harmon, L.G. 1966. Thermal Resistance of Staphylococcus aureus in milk, Whey and phosphate Buffer, Appl. Microbiol.14,584.
- Williams, C.C.; Merrill, C.M. e Cameron, E.J. 1937. Apparatus for Determination of Spore-Destruction Rates. Food Res. 2,369.
- Yokoya, F e York, G.K. 1965. Effect of Several Enviroment on the Thermal Death Rate of Aerobic Thermophilic Bacteria. Appl. Microbiol 13,993.

VIII- APÊNDICE

a

Volume em ml da amostra tratada, no cálculo de sobreviventes pelo método do NMP.

a

População microbiana inicial por volume unitário, para o cálculo matemático do valor D.

a_1, a_2, a_3, a_j, a_l

Declives para o primeiro, segundo, terceiro, j e l segmentos da curva de incremento de temperatura com aquecimento programado.

b

NMP de sobreviventes por ml de suspensão tratada.

$C_1, C_2, C_3, C_{j-2}, C_{j-1}, C_j, C_{l-1}, C_l$

Concentração de sobreviventes para as amostras tiradas às respectivas combinações de tempo-temperatura $(t_1, T_1), \dots, (t_l, T_l)$.

Dr

Tempo de redução decimal do fator termicamente vulnerável, à temperatura de referência.

n

Número total de amostras retiradas para cada tempo de tratamento a temperatura constante, no cálculo do número de sobreviventes pelo método do NMP.

q

Número de amostras de um mesmo tempo de tratamento a temperatura constante, que não apresentaram crescimento e que se usa para o cálculo do número de sobreviventes pelo método do NMP.

t

Tempo de tratamento a temperatura constante, para o cálculo matemático de valor D.

T_r

Temperatura de referência.

$T_1, T_2, T_3, T_{j-2}, T_{j-1}, T_j, T_{\ell-1}, T_\ell$

Temperaturas das amostras quando retiradas a $t_1, t_2, t_3, t_{j-2}, t_j, t_{\ell-1}, t_\ell$.

Z

Índice de declive para a curva de destruição térmica.

AGRADECIMENTOS

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

À Direção da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Univer_sidade Estadual de Campinas, pelas possibilidades oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

À Organização dos Estados Americanos, pela concessão de bol_sa de estudo, através do Programa Multinacional de Tecnologia de Alimentos.

Aos amigos Humberto e Lucia Helena Pitoli, pelo trabalho de tradução do texto.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, pela sua colaboração nas experiências realizadas.