

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

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO E AVALIAÇÃO DE
ESTABILIDADE DE BEBIDA ISOTÔNICA ACONDICIONADA EM
GARRAFA PLÁSTICA ASSÉPTICA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Rodrigo Rodrigues Petrus aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de setembro de 2000.

**Rodrigo Rodrigues Petrus
Engenheiro de Alimentos**

Campinas, 06 de setembro de 2000.


Prof. Dr. José de Assis F. Faria
Presidente da Banca

Orientador: Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

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

Campinas – SP
2000



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	UNICAMP		
	P449d		
V.	Ex.		
TOMBO BC	42851		
PROC.	16-278100		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00		
DATA	21/10/00		
N.º CPD			

CM-00147019-T

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

P449d Petrus, Rodrigo Rodrigues
Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de
bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica /
Rodrigo Rodrigues Petrus.—Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1.Bebidas. 2.Garrafas plásticas. 3.Estabilidade. I.Faria, José
de Assis Fonseca. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

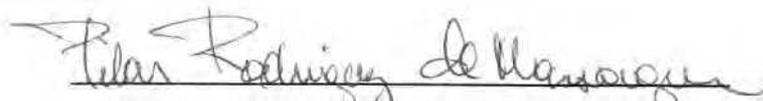
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
Orientador



Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Membro



Prof. Dra. Pilar Rodríguez de Massaguer
Membro

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos
Membro

*" Não basta saber, é preciso também aplicar;
não basta querer, é preciso também agir."*

Goethe

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais e irmãos,
Hélio, Zélia, Ricardo e Frederico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar o meu caminho;

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar o curso;

Ao Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria pela amizade, orientação dedicada e segura;

Ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão pela atenção, sugestões e dúvidas prontamente esclarecidas;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos pelo incentivo e discussões técnicas;

À Prof. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pelos esclarecimentos e observações oportunas;

Aos Colegas Randolpho, Pedro, Gabriela, Maria Raquel, Laura, Gisele e Jorge pela colaboração durante a realização deste trabalho;

A todos os colegas que participaram das análises sensoriais;

À equipe de funcionários e estagiários do DTA

Ana Lourdes, Bernadete, Alaíde, Margarita, Alice, Bete, Nelson, Marlene, Jaime, Ana Maria, Aduino e Julianna;

Aos professores e colegas do Instituto de Química

Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi, Edénir, Prof. Dr. Watson Loh, Antônio Carlos, Priscilla de Freitas;

À Neusely Silva do Instituto de Tecnologia de Alimentos pela metodologia, utilizada nos testes microbiológicos, disponibilizada;

Às empresas Peróxidos do Brasil, Rhodia, Ecolab e ACNielsen pelo fornecimento de materiais e informações técnicas;

Ao apoio da CAPES, pela bolsa de estudo concedida;

À FAPESP, pela liberação de recursos que permitiu a compra de materiais e equipamentos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IX
RESUMO	X
SUMMARY	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. BEBIDAS ISOTÔNICAS.....	3
2.1.1. Definição e características.....	3
2.1.2. Marcas disponíveis no mercado nacional.....	5
2.1.3. Desenvolvimento de microrganismos	6
2.1.4. Conservadores químicos	7
2.1.4.1. Benzoatos	8
2.1.4.2. Sorbatos.....	8
2.2. TECNOLOGIA DOS OBSTÁCULOS.....	9
2.3. PROCESSAMENTO TÉRMICO.....	10
2.3.1. Resistência térmica de microrganismos	11
2.3.2. Padrão e taxa de morte microbiana.....	12
2.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS SEM EMPREGO DO CALOR.....	13
2.5. SISTEMAS DE EMBALAGENS PARA ISOTÔNICOS.....	13
2.5.1. Garrafas plásticas.....	14
2.5.2. Processos de envase	16
2.5.2.1. Asséptico x enchimento à quente	19
2.6. CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	20
2.6.1. Microrganismos no ar	22

2.7. ESTERILIZAÇÃO DE EMBALAGENS.....	23
2.7.1. Métodos físicos.....	26
2.7.1.1. Processos mecânicos.....	26
2.7.1.2. Processos térmicos.....	26
2.7.1.3. Processos por Irradiação.....	27
2.7.2. Métodos químicos.....	28
2.7.2.1. Ácido peracético.....	29
2.7.2.2. Peróxido de hidrogênio.....	30
2.7.2.3. Álcoois.....	31
2.7.2.4. Óxido de etileno.....	32
2.7.3. Taxa de não-esterilidade e taxa de contaminação.....	33
2.7.4. Sistemas comerciais de esterilização.....	34
2.8. FATORES QUE AFETAM A VIDA-DE-PRATELEIRA.....	36
2.8.1. Desenvolvimento microbiano.....	36
2.8.2. Temperatura.....	37
2.8.3. Concentração de oxigênio.....	37
2.8.4. Barreira e formato da embalagem.....	38
2.8.5. Alterações sensoriais.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. MATERIAIS.....	40
3.1.1. Bebida isotônica.....	40
3.1.2. Embalagem.....	41
3.1.3. Sanificantes químicos.....	42
3.1.4. Reagentes.....	42
3.1.5. Microrganismo teste utilizado na avaliação da eficiência dos sanificantes.....	43
3.1.6. Meios de cultivo para microrganismos.....	43
3.1.7. Equipamentos.....	44
3.1.7.1. Equipamentos de laboratório.....	44
3.1.7.2. Equipamentos em escala piloto.....	45
3.2. MÉTODOS.....	51

3.2.1. Formulação isotônica.....	51
3.2.1.1. Medida do valor osmótico da bebida isotônica.....	51
3.2.2. Medida da espessura e peso das embalagens.....	53
3.2.3. Critérios adotados na seleção do sanificante e assepsia das embalagens	53
3.2.3.1. Testes microbiológicos de assepsia.....	53
3.2.3.2. Teste sensorial de residual químico.....	58
3.2.3.3. Análise de residual de H ₂ O ₂ nas embalagens	58
3.2.3.4. Considerações sobre a estabilidade e segurança no manuseio dos sanificantes	59
3.2.4. Delineamento do tratamento térmico da bebida isotônica	60
3.2.5. Elaboração e processamento em escala piloto	60
3.2.5.1. Preparação da bebida.....	61
3.2.5.2. Pasteurização	62
3.2.6. Assepsia das embalagens em escala piloto	62
3.2.6.1. Validação do sistema de assepsia	63
3.2.6.2. Monitoramento das concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio na solução sanificante	63
3.2.7. Monitoramento do ar na planta piloto	64
3.2.8. Limpeza e sanificação dos equipamentos	64
3.2.9. Caracterização físico-química da bebida isotônica.....	65
3.2.10. Avaliação da estabilidade microbiológica	65
3.2.10.1. Plano de amostragem para análise microbiológica.....	66
3.2.11. Teste de aceitação sensorial	66
3.2.12. Análise estatística dos resultados.....	67
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	68
4.1. SELEÇÃO DO AGENTE QUÍMICO USADO NA ASSEPSIA DAS EMBALAGENS	68
4.1.1. Avaliação do desempenho dos sanificantes químicos.....	68
4.1.1.1. Testes desafio.....	69
4.1.2. Determinação de H ₂ O ₂ residual nas embalagens.....	80
4.1.3. Análise sensorial.....	82

4.2. DETERMINAÇÃO DO VALOR OSMÓTICO DA MISTURA ISOTÔNICA.....	83
4.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA E ESPESSURA DAS GARRAFAS.....	85
4.4. PROCESSAMENTO EM ESCALA PILOTO.....	85
4.4.1. Contagem de microrganismos no ar na planta piloto.....	85
4.4.2. Determinação da concentração dos ingredientes ativos na solução sanificante utilizada na assepsia das embalagens em escala piloto ..	86
4.4.3. Validação do sistema de assepsia.....	87
4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA BEBIDA ISOTÔNICA PASTEURIZADA	88
4.5.1. Análises físico-químicas	88
4.5.2. Avaliação da estabilidade microbiológica	93
4.5.2.1. Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais	93
4.5.2.2. Contagem de bolores e leveduras	95
4.5.2.3. Pesquisa de bactérias patogênicas.....	96
4.6. TESTE DE ACEITAÇÃO SENSORIAL DA BEBIDA ISOTÔNICA	97
5. CONCLUSÕES	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Tipo de embalagem, sistema de envase e prazo de validade de bebidas isotônicas disponíveis no mercado nacional.....	6
TABELA 2 - Valores D e z de bolores e leveduras.....	12
TABELA 3 - Padrões NASA para salas limpas e postos de trabalho com ambientes microbiologicamente controlados.....	21
TABELA 4 - Processos aplicados na assepsia de materiais de embalagem.....	25
TABELA 5 - Exemplos de métodos de esterilização adequados aos diferentes tipos de embalagens.....	33
TABELA 6 - Formulação isotônica (pH=3,4).....	40
TABELA 7 - Avaliação do desempenho do Asepticper [®] na sanificação de garrafas plásticas contaminadas com células de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 a 24°C.....	70
TABELA 8 - Avaliação do desempenho do Proxitane 1512 [®] na sanificação de garrafas contaminadas com células de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 a 23°C.....	71
TABELA 9 - Avaliação do desempenho do Vortexx [®] na sanificação de garrafas contaminadas com células de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 a 25°C.....	72
TABELA 10 - Avaliação do desempenho do etanol 70%(v/v) na sanificação de garrafas plásticas contaminadas com células de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 a 24°C.....	75
TABELA 11 - Desempenho de agentes químicos na sanificação de garrafas plásticas a 24°C / 5 segundos de exposição.....	76
TABELA 12 - Desempenho de agentes químicos na sanificação de garrafas plásticas a 24°C / 10 segundos de exposição.....	77
TABELA 13 - Concentrações dos ingredientes ativos no Vortexx [®]	79
TABELA 14 - Concentração de peróxido de hidrogênio no Asepticper [®]	79
TABELA 15 - Concentração de peróxido de hidrogênio e ácido peracético no Proxitane 1512 [®]	80

TABELA 16 - Níveis médios de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) nas garrafas sanificadas com e sem enxágüe final, obtidos pelo sistema espectrofotométrico monossegmentado.....	81
TABELA 17 - Número de seleções corretas das amostras de bebida isotônica acondicionadas em garrafas sanificadas com e sem enxágüe final obtidas no teste triangular.....	82
TABELA 18 - Determinação da massa e espessura das garrafas utilizadas.....	85
TABELA 19 - Contagens de microrganismos no ar da planta de processamento em escala piloto.....	86
TABELA 20 - Concentração dos princípios ativos na solução de uso no início e término do processo de assepsia das embalagens.....	87
TABELA 21 - Quantificação da contaminação microbiológica nas garrafas antes e após o processo de assepsia.	88
TABELA 22 - Resultados das determinações de pH para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada.....	89
TABELA 23 - Resultados das determinações de sólidos solúveis (°Brix) para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada.....	90
TABELA 24 - Resultados das determinações de acidez total titulável (ATT) para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada.....	91
TABELA 25 - Resultados das determinações de ácido ascórbico para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada.	92
TABELA 26 - Médias das contagens de bolores e leveduras (UFC/ml) para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada em função do tempo de estocagem a 25°C.	95
TABELA 27 - Pesquisa de bactérias patogênicas na bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico.....	96
TABELA 28 - Médias das notas dos testes de aceitação para o lote 3 (sem conservador) estocado a 25°C.	101

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Consumo de bebidas isotônicas no mercado nacional.....	1
FIGURA 2 - Participação dos principais tipos de embalagem para isotônicos no mercado nacional registrada no ano de 1998.....	14
FIGURA 3 - Alternativas de processos e sistemas de envase para bebidas isotônicas.....	17
FIGURA 4 - Diagrama simplificado do sistema asséptico.....	18
FIGURA 5 - Mistura estabilizada de ácido acético, peracético e peróxido de hidrogênio.....	29
FIGURA 6 - Garrafa plástica utilizada no experimento.....	41
FIGURA 7 - Vista da planta piloto utilizada no processamento da bebida isotônica, composta por trocador de calor a placas (ao centro) e tanques para elaboração do produto (à esquerda) e envase (à direita).....	46
FIGURA 8 - Sistema desenvolvido para assepsia das garrafas (Faria, 1999).....	47
FIGURA 9 - Operação de assepsia das embalagens.....	48
FIGURA 10 - Detalhe da assepsia e enxágüe das garrafas por <i>spray</i>	49
FIGURA 11 - Envase da bebida em garrafas de PET assépticas.....	50
FIGURA 12 - Teste desafio para avaliação do desempenho de agentes químicos na sanificação das garrafas.....	54
FIGURA 13 - Avaliação do desempenho dos agentes químicos na sanificação de garrafas com contaminação natural do ambiente de estocagem.....	57
FIGURA 14 - Diagrama de fluxo de processamento e envase da bebida isotônica.....	61
FIGURA 15 - Curva padrão para determinação do valor osmótico da bebida isotônica.....	84
FIGURA 16 - Evolução das contagens de mesófilos aeróbios totais para os três lotes de bebida isotônica em função do tempo de estocagem a 25°C.....	94

FIGURA 17 - Histograma do teste de aceitação para aparência e sabor do lote da bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico com 2 semanas de estocagem a 25°C.....	98
FIGURA 18 - Histograma do teste de aceitação para aparência e sabor do lote da bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico com 16 semanas de estocagem a 25°C.....	99
FIGURA 19 - Histograma do teste de aceitação para aparência e sabor do lote da bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico com 26 semanas de estocagem a 25°C.....	100

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I - Nomograma específico para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio em solução.....	116
ANEXO II - Ficha para avaliação sensorial de bebida isotônica (teste triangular).	117
ANEXO III - Tabela para conversão de número de unidades formadoras de colônia (UFC)/placa em UFC/m ³ de ar.....	118
ANEXO IV - Ficha para avaliação sensorial de bebida isotônica (teste de aceitação/escala hedônica).....	119
ANEXO V - Tabela de número mínimo de seleções corretas da amostra diferente, necessário para estabelecer diferença significativa a vários níveis de probabilidade, pelo método triangular.....	121

RESUMO

Processou-se uma mistura isotônica, com pH próximo a 3,4; enfatizando o desenvolvimento de um sistema de assepsia para garrafas plásticas e produção de uma bebida estável, prescindindo da adição de conservadores químicos e refrigeração. O desenvolvimento do sistema foi fundamentado em testes microbiológicos para seleção de sanificantes químicos, na determinação de traços de peróxido de hidrogênio nas embalagens e avaliação do efeito residual dos agentes químicos na qualidade sensorial da bebida.

O isotônico foi pasteurizado a 85°C/5s em trocador de calor a placas e acondicionado em garrafas de polietileno tereftalato (PET) sanificadas com *spray* de solução a base de ácido peracético 0,3% durante 5s, a 30°C. Foram processados três lotes com níveis de sorbato de potássio adicionados de 0, 50 e 100mg/l. Ao final do processamento, os lotes foram estocados a 25°C durante 26 semanas, sendo realizadas determinações de pH, sólidos solúveis, acidez total titulável, ácido ascórbico e testes de aceitação sensorial, com 2, 16 e 26 semanas de armazenagem. Foram feitas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios totais, bolores e leveduras no dia seguinte ao processamento, com 2, 4, 8, 16 e 26 semanas de estocagem.

Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias das determinações de ácido ascórbico, no início e fim do período de estocagem, para os três lotes processados. Para pH, acidez total titulável e sólidos solúveis, praticamente, não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre as amostras. As contagens de bolores e leveduras e mesófilos aeróbios totais foram $< 10\text{UFC/ml}$ e $\leq 5,7\text{UFC/ml}$, respectivamente, para os três lotes analisados durante 26 semanas. As médias das notas atribuídas nos testes de aceitação sensorial não diferiram entre si ($p < 0,05$) ao longo da armazenagem.

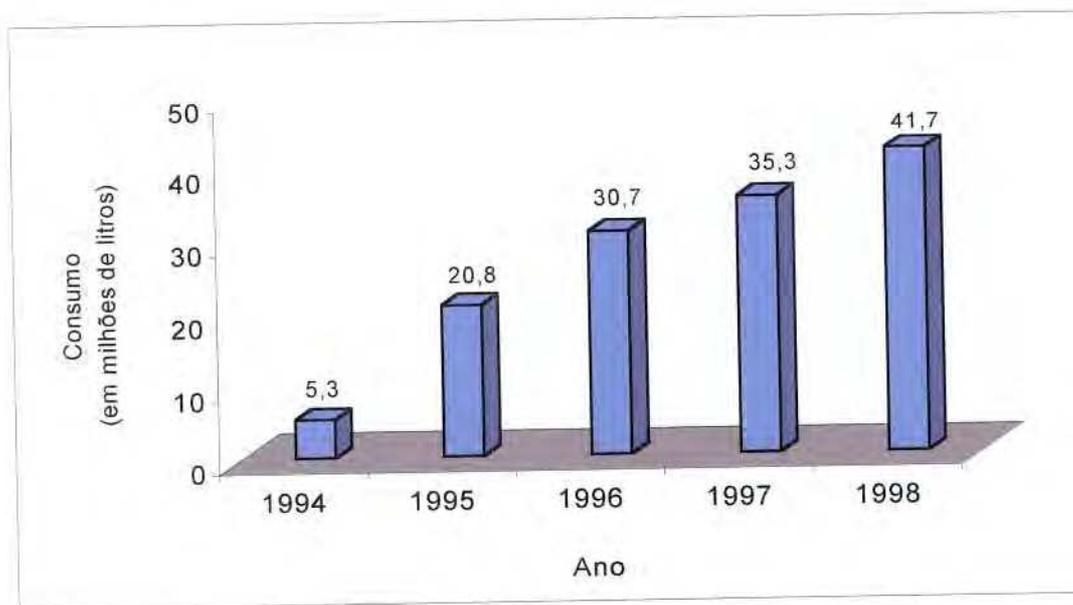
Os resultados obtidos evidenciaram a possibilidade de produção e acondicionamento não asséptico, à temperatura ambiente, de bebidas isotônicas em garrafas de PET sem adição de conservadores químicos; visto que, o lote processado sem sorbato apresentou resultados microbiológicos confiáveis, aliados à sua satisfatória aceitação sensorial e relativa estabilidade físico-química. O estudo realizado, portanto, disponibiliza alternativas tecnológicas de processo, especialmente às indústrias de pequeno porte.

SUMMARY

The objective of this work was to obtain an isotonic drink by using pasteurization and packing into aseptic bottles, stable at room temperature, without the addition of chemical preservatives. For the sanitation of the plastic bottles some sanitizers were tested, based on their efficiency to destroy microorganism, maintaining minimum residual hydrogen peroxide, and keeping the drink sensory quality. The isotonic drink (pH 3,40) was thermal processed in a plate pasteurizer at 85C°/5s and packed into PET bottles sanitized by spraying peracetic acid at 0.3%/5s at 30C°. The processed drink contained three different concentrations of potassium sorbate (control, 50 and 100mg/l). The stability of the products were evaluated by keeping them at 25C° for 26 weeks and measuring the pH, soluble solids, titrable acidity, ascorbic acid, microbial count, and sensory tests. The sensory evaluation was at 2, 16 and 26 weeks of storage and the count of the total mesophilic aerobic bacteria, moulds and yeast at 2, 4, 8, 16 and 26 weeks. There was no difference ($p < 0,05$) for the pH, soluble solids and acidity of the processed drinks during the storage period excepted for the ascorbic acid which reduced to about 30% of the initial value. At 26 weeks the total bacteria and mould and yeast count were ≤ 5.7 CFU/ml and < 10 CFU/ml, respectively. There was no sensory evaluation difference ($p < 0,05$) during the storage test. Such results indicated that the formulated isotonic drink can be processed at the above conditions, without the addition of chemical preservatives, and stored at room temperature for at least 6 months in good commercial quality.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo de bebidas esportivas, denominadas repositores hidroeletrólitos ou isotônicos, tem experimentado um crescimento bastante expressivo. Segundo dados do instituto de pesquisa ACNielsen, a partir de 1993 houve um aumento no consumo de isotônicos próximo a 1000%. Entre os anos de 1994 e 1995 as vendas projetaram de 5,3 para 20,8 milhões de litros, com crescimento de 290%. Em 1996, foram consumidos 30,7 milhões de litros, 48% a mais que no ano anterior (Bebidas..., 1998). Em 1997 e 1998, o crescimento no consumo de isotônicos foi de 15 e 18%, respectivamente, não sendo tão acentuado como nos anos anteriores (ACNielsen, 2000). A *Figura 1* representa o crescimento no consumo de bebidas isotônicas no Brasil, nos últimos anos.



Fonte: ACNielsen

FIGURA 1 - Consumo de bebidas isotônicas no mercado nacional.

As bebidas isotônicas são uma nova tendência de consumo, e para atender ao público jovem ou àqueles que se mantêm em ampla atividade, valores nutricionais são agregados a estas bebidas. Classificados como alimentos para praticantes de atividades físicas, segundo a Portaria 222 do Ministério da Saúde, esta categoria de bebidas é especialmente formulada para suprir as necessidades relacionadas a exercícios físicos; ou seja, para facilitar a reidratação após ou durante a prática de exercícios intensos (Varnam & Sutherland, 1994).

Os isotônicos são comercializados em embalagens cartonadas, flexíveis, latas e mais comumente no Brasil, em garrafas de vidro e polietileno tereftalato (PET); podendo ser acondicionados a quente, à temperatura ambiente com adição de conservadores químicos ou pelo processo asséptico. No atual estágio em que se encontram os processos de acondicionamento, que visam o aumento da estabilidade do produto nas prateleiras, redução do uso de conservadores e da necessidade de refrigeração, a assepsia, que é obrigatória na indústria farmacêutica, vem sendo cada vez mais empregada no setor alimentício (A assepsia..., 1997).

A seleção do material de embalagem para bebidas, associada aos processos de acondicionamento, tem sido alvo de pesquisas que visam contornar algumas limitações dos sistemas atualmente disponíveis. O enchimento `a quente causa alterações sensoriais no produto, promove interações entre o material de embalagem e o alimento (Von Bockelmann, 1988) e ainda depende da escolha de uma embalagem resistente a temperaturas mais elevadas, o que resulta em maior custo de material. No processo de enchimento `a temperatura ambiente, não asséptico, os conservadores adicionados ao produto, mesmo sendo reconhecidos como aditivos seguros, sob o aspecto de saúde, causam um impacto mercadológico negativo e por vezes, alterações sensoriais indesejáveis na bebida. Finalmente, o acondicionamento asséptico, com todas as vantagens que reúne, é um processo que aplica uma tecnologia complexa, exigindo altos investimentos em equipamentos, instalações e metodologias de controle.

Isto posto, torna-se evidente a necessidade de adaptação de um sistema de envase para bebidas isotônicas em garrafas plásticas convencionais, visando a eliminação ou redução do uso de conservadores através da elaboração de um produto com baixa carga microbiana inicial e assepsia das embalagens, utilizando-se agentes químicos de sanificação industrial. Tendo em vista o amplo potencial de crescimento das embalagens plásticas, especialmente as de PET, é justificável a busca por alternativas tecnológicas de acondicionamento de alimentos que diversifique ainda mais o seu uso. Este trabalho teve como objetivo a elaboração e pasteurização de uma mistura isotônica em escala piloto, com ênfase no desenvolvimento de um sistema de assepsia adequado para garrafas plásticas e produção de uma bebida estável em condições de ambiente e distribuição, prescindindo da adição de conservadores químicos. Oferecendo, portanto, uma alternativa de processamento com qualidade técnica e economicamente viável às indústrias do setor, visando atender a atual demanda deste segmento de mercado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BEBIDAS ISOTÔNICAS

2.1.1. Definição e características

Uma bebida isotônica é aquela que apresenta concentração de substâncias ou minerais semelhantes às encontradas nos fluidos orgânicos. O balanço entre os eletrólitos (minerais) evita a desidratação durante a prática esportiva. Woodruff & Phillips definem uma bebida isotônica como tendo a mesma pressão osmótica que o sangue humano. Essa característica permite que a bebida seja rapidamente absorvida após o consumo (Varnam & Sutherland, 1994). Os eletrólitos estão envolvidos na maioria dos processos biológicos e os mais importantes são: sódio, cloreto, potássio, cálcio, magnésio e fósforo (Voirol, s.d.).

As bebidas ainda podem ser classificadas como hipertônicas ou hipotônicas. Hipertônicas são aquelas com maior concentração de sais do que os

fluidos celulares resultando na desidratação do corpo. As bebidas hipotônicas apresentam menor concentração de sais do que os fluidos orgânicos levando à sua diluição. A isotonicidade ou osmolalidade da bebida, expressa em Osm/l, depende de sua pressão osmótica e é calculada a partir da concentração molal de cada eletrólito (Voirol, sd). Conforme descrito por (Quest..., 1996), diferentes valores de osmolalidade classificam as bebidas como:

- Hipotônicas: < 290 mOsm/l
- Isotônicas: 290 - 330 mOsm/l
- Hipertônicas: > 330 mOsm/l

Segundo Srebernich (1998), o valor osmótico do plasma sanguíneo humano varia de 285 a 295 Osmolal.

A fabricação de bebidas repositoras de fluidos é, primariamente, uma questão de mistura de ingredientes, estando disponíveis na forma de pós, concentrados ou prontas para beber. O sabor básico dos eletrólitos presentes na bebida é pouco agradável e a adição de flavorizantes à base de frutas é uma prática usual. Tipicamente, isotônicos são bebidas não carbonatadas, de elevada acidez, com baixo conteúdo de carboidratos, variando de 6 a 8% (Varnam & Sutherland, 1994). As fontes de carboidratos usadas nas bebidas esportivas são sacarose, glicose e frutose. A frutose, além de atuar como fonte energética, mascara ou inibe o sabor indesejável conferido pelos eletrólitos (Voirol, sd). A composição de bebidas isotônicas expressa nos rótulos das embalagens incluem: água desmineralizada, sacarose, glicose, vitaminas, sais minerais, edulcorante, aromatizante, antioxidante, corante e, em algumas marcas, conservadores químicos.

De acordo com a Portaria 222 do Ministério da Saúde, de 24/03/98, os repositores hidroeletrólíticos são classificados como alimentos para praticantes de atividades físicas e definidos como produtos formulados a partir de concentrações variadas de sódio, cloreto e carboidratos, com o objetivo de reposição hídrica e eletrolítica decorrente da prática de atividade física. Opcionalmente, podem conter

potássio, vitaminas e outros minerais. As normas de rotulagem para tais produtos prescrevem os seguintes dizeres, em destaque e negrito, no rótulo da embalagem: “Recomenda-se que os portadores de enfermidades consultem um médico e/ou um nutricionista antes de consumir este produto” (Rodrigues, 1999).

As bebidas não carbonatadas requerem cuidados especiais durante o enchimento a fim de garantir sua estabilidade, pois são microbiologicamente sensíveis. O surgimento das garrafas de PET, no mercado de bebidas resultou em uma gradual substituição do vidro e outros tipos de embalagens. Iniciou-se, assim, o desenvolvimento de métodos para enchimento asséptico de bebidas não carbonatadas de alta acidez em garrafas plásticas (Grimm, 1998).

2.1.2. Marcas disponíveis no mercado nacional

Uma grande diversidade de marcas de bebidas isotônicas pode ser encontrada no mercado, acondicionadas em diferentes tipos de embalagens; sendo algumas delas relacionadas na *Tabela 1*. Seu prazo de validade varia de 6 meses a 2 anos, empregando diferentes tecnologias de envase. Algumas marcas utilizam o envase à temperatura ambiente, com adição de conservadores químicos como sorbatos e benzoatos de sódio ou potássio. A participação das três primeiras marcas, não mencionadas, representou 87,3% em 1998 e o consumo per capita, no mesmo ano, em todo o país, foi de 295ml (ACNielsen, 2000).

TABELA 1 - Tipo de embalagem, sistema de envase e prazo de validade de bebidas isotônicas disponíveis no mercado nacional.

	<i>ENERGIL C SPORT</i>	<i>GATORADE</i>	<i>SPORTADE</i>	<i>SANTAL ACTIVE</i>	<i>MARATHON</i>
EMBALAGEM	Garrafas de PET	PET, vidro, laminado (pó)	<i>cheer pack</i>	vidro	PET
SISTEMA DE ENVASE	enchimento à quente	enchimento à quente	enchimento à quente	enchimento à quente	asséptico
ESTABILIDADE	12 meses	12 meses 2 anos (pó)	9 meses	6 meses	6 meses

2.1.3. Desenvolvimento de microrganismos

A elevada acidez das bebidas isotônicas, com pH próximo a 3,5, favorece, principalmente, o desenvolvimento de bolores e leveduras; normalmente não oferecendo risco à saúde humana. Alterações sensoriais são detectadas, normalmente, quando contagens microbianas são superiores a 10^7 UFC/g ou ml, atingindo o máximo em valores na faixa de 10^8 - 10^9 UFC/g ou ml (Leitão, 1998). Entretanto, a Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária/MS 451, de 19/09/97, não estabelece padrões microbiológicos específicos para esta classe de bebidas.

As leveduras crescem numa ampla faixa de temperaturas, 0 a 47°C; algumas espécies não se desenvolvem acima de 15°C, enquanto outras não se reproduzem abaixo dessa temperatura. A faixa de temperatura ótima para a maior parte das leveduras é de 20 a 30°C, embora as espécies patogênicas ao homem, normalmente não constatadas em alimentos, cresçam entre 30 e 37°C. Aceita-se, em geral, que as leveduras multiplicam-se melhor em meios com reação ácida. Esses microrganismos se desenvolvem em meios com pH ajustados entre 3,5 e 3,8, que inibem a maioria das bactérias. Os limites de tolerância situam-se entre pH 2,2 e 8,0, de acordo com as diferentes espécies (Pelczar, 1980).

Segundo o mesmo autor, os bolores podem tolerar e multiplicar-se em altas concentrações de ácidos, suportando variações de pH entre 2 e 9, embora o ótimo, para a maioria das espécies, esteja situado em torno de 5,6. A maioria dos bolores é estritamente aeróbia e seu desenvolvimento é estimulado pela disponibilidade abundante de oxigênio. Desenvolvem-se numa ampla faixa de temperatura, com um ótimo de 22 a 30°C para a maioria das espécies.

2.1.4. Conservadores químicos

As propriedades físicas e químicas de um conservador e sua relação com o alimento constituem o principal fator na sua eficiência. Propriedades como solubilidade, pKa, níveis tóxicos e reatividade química devem ser consideradas na sua escolha. Diferentes compostos de uma mesma classe podem diferir na atividade antimicrobiana, bem como nas suas propriedades físicas e químicas. Frequentemente, a forma salina dos ácidos orgânicos é mais solúvel em água, sendo a preferida para situações em que a solubilidade em água é importante (Araújo, 1995). Para isotônicos, bebidas de alta acidez, os sais de ácido sórbico e benzóico apresentam-se como agentes de conservação mais efetivos.

Os limites máximos permitidos para adição de conservadores dependem do tipo de alimento em questão. De acordo com a Portaria 222 do Ministério da Saúde, é permitida a utilização de aditivos em alimentos para praticantes de atividades físicas nos mesmos limites previstos para os alimentos convencionais similares, desde que não venham alterar a finalidade a que o alimento se propõe. O limite máximo permitido para adição de ácido benzóico e seus sais de sódio, potássio e cálcio em refrescos e refrigerantes é 500mg/l. Para adição de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio o limite permitido, também para refrescos e refrigerantes é 100mg/l (ABIA, 1999). Não foram encontrados limites para adição de conservadores químicos específicos para repositores hidroeletrólíticos.

2.1.4.1. Benzoatos

Os sais de ácido benzóico possuem atividade ótima situada na faixa de pH entre 2,5 e 4,0. Por isso, tem sido usado no controle de bolores e leveduras. Devido a sua baixa atividade em pH igual ou superior a 4,5, não é recomendado no controle de bactérias (Araújo, 1995). Suas principais vantagens incluem o baixo custo, facilidade de incorporação e não interferência na coloração dos produtos. No entanto, pode conferir sabor estranho aos alimentos, se usados em concentrações elevadas. O nível de uso sugerido para bebidas não carbonatadas é de 0,1% (Chipley, 1993).

2.1.4.2. Sorbatos

Estudos realizados têm constatado a efetividade de sorbatos contra bolores, cujas concentrações no produto podem atingir até 0,1% (Sofos, 1989). No entanto, é importante considerar que algumas cepas da levedura *Zygosaccharomyces bailii* são capazes de desenvolver em concentrações de até 250 mg/l de ácido sórbico e benzóico em meios com pH 3 (Praphailong & Fleet, 1997). Especialmente para bebidas, os níveis comuns de uso estão entre 0,02 e 0,1%. Sucos de frutas são melhor conservados com 0,025 a 0,1% de sorbato, que é preferido ao benzoato, podendo uma mistura de ambos ser usada. Em geral, sorbato é tão efetivo quanto benzoato na conservação de bebidas, mas menos provável de alterar o sabor nos níveis necessários à conservação; no entanto, em certos casos, podem provocar defeitos na bebida, como turbidez, por exemplo. A concentração de sorbato usada em alimentos deve ser limitada à uma quantidade que não tenha efeitos adversos na qualidade sensorial do produto. Em geral, níveis acima de 0,3% podem causar alterações indesejáveis no sabor. Diversos estudos demonstraram que o efeito do sorbato no sabor varia com o tipo de alimento (Sofos, 1989).

2.2. TECNOLOGIA DOS OBSTÁCULOS

A estabilidade e a segurança da maioria dos alimentos são baseadas em muitos fatores, os quais visam evitar a multiplicação dos microrganismos contaminantes, impedindo a deterioração e a veiculação de doenças pelos alimentos. Das interações entre os fatores extrínsecos e intrínsecos originou o conceito dos obstáculos de Leistner. Os obstáculos normalmente considerados na conservação dos alimentos são: temperatura (alta ou baixa), atividade de água (a_w), pH (acidificação), potencial de oxi-redução, conservadores, atmosfera modificada e microrganismos competitivos (bactérias lácticas e produtos do seu metabolismo), podendo também ser incluído a adequação da embalagem. Dentre eles, o pH figura como obstáculo de grande relevância estabelecendo limites de segurança para os alimentos. A atuação sinérgica desses fatores melhora a estabilidade e, conseqüentemente, a qualidade do alimento, tornando-o inócuo à saúde do consumidor (SENAI/SEBRAE, 1999).

Os processos de conservação dos alimentos baseiam-se na destruição total ou parcial dos microrganismos capazes de alterar o alimento, ou na modificação ou eliminação de um ou mais fatores (intrínsecos ou extrínsecos) que são essenciais para a sua multiplicação, de modo que o alimento não se torne propício ao desenvolvimento microbiano. Também podem ser incorporadas aos alimentos substâncias inibidoras de microrganismos. Em muitos casos, o uso de mais de um tipo de tratamento é empregado (SENAI/SEBRAE, 1999).

Isto posto, podem ser reconhecidos quatro obstáculos atuantes, isolada ou conjuntamente, na conservação das bebidas isotônicas, e que garantem a estabilidade e segurança microbiológica do produto:

- pH ácido (< 4,6);
- Tratamento térmico (pasteurização);
- Adição de conservadores químicos;
- Assepsia e adequação da embalagem.

2.3. PROCESSAMENTO TÉRMICO

Quando se utiliza calor na conservação e preparo dos alimentos é imperativo o conhecimento da resistência térmica dos microrganismos, que pode ser determinada com precisão através dos valores D e z. O valor D é o tempo (em minutos), a uma dada temperatura, necessário para reduzir 90% da população; correspondendo, graficamente, a um ciclo logarítmico de redução na curva de sobrevivência térmica de um determinado microrganismo (Jay, 1992). O valor z do microrganismo corresponde ao aumento necessário na temperatura para reduzir à décima parte o valor D (Baruffaldi, 1998). A curva de sobrevivência térmica demonstra que o tempo é fundamental para a destruição, a uma dada temperatura, de uma população de microrganismos. Assim, o calor é utilizado em vários métodos de conservação e preparo dos alimentos, tais como: pasteurização, esterilização, secagem e concentração. Nesses métodos ocorre a eliminação total ou parcial dos microrganismos, de acordo com o grau de aquecimento dado ao alimento (SENAI/SEBRAE, 1999).

A pasteurização é um tratamento térmico que elimina grande parte dos microrganismos presentes no alimento e emprega temperaturas inferiores a 100°C. Dentre outras aplicações, a pasteurização visa eliminar deteriorantes e patogênicos capazes de se desenvolver no produto. No caso de alimentos de alta acidez, os microrganismos patogênicos não sobrevivem ou não se desenvolvem e os deteriorantes do produto são as leveduras, os bolores, bactérias lácticas e acéticas, facilmente eliminadas por temperaturas na faixa de 60 a 90°C. Assim, com esse tratamento, o produto pode ser mantido em temperatura ambiente (caso de sucos de fruta, bebidas isotônicas, etc), por apresentarem esterilidade comercial (SENAI/SEBRAE, 1999).

A determinação da temperatura apropriada e da extensão do tempo necessário para tratar termicamente um alimento tem sido objeto de estudos cuidadosos. O procedimento para cálculo do processo depende de fatores que incluem a natureza do produto, características de desenvolvimento, sobrevivência e resistência térmica dos microrganismos contaminantes. Obtidas estas

informações, o processo deve ser baseado na resposta à seguinte questão: por quanto tempo e a que temperatura deverá ser processado um produto em particular, com o propósito de destruir os organismos patogênicos e deterioradores? (Food Processors Institute, 1989).

A severidade do tratamento térmico e a vida útil do produto são determinadas, principalmente, pelo pH do alimento. Na pasteurização de bebidas, em pequena escala, tanques encamisados podem ser utilizados para um processo em batelada. A pasteurização em larga escala, no entanto, emprega equipamentos contínuos, como os trocadores de calor a placas (Fellows, 1988).

2.3.1. Resistência térmica de microrganismos

A resistência térmica dos microrganismos depende de vários fatores. Há variações entre diferentes espécies e até mesmo entre cepas de uma mesma espécie. Esporos são mais resistentes do que células vegetativas, podendo sobreviver por várias horas a 100°C. A maioria das células vegetativas é destruída a temperaturas próximas a 75°C em poucos minutos. O efeito do calor ainda é influenciado pelo pH, atividade de água do meio (a_w), tipo de alimento, presença de sais dentre outros fatores (Joyce, 1993).

A temperatura é o agente físico mais eficaz e mais freqüentemente empregado na destruição de microrganismos, sendo o valor D um dos parâmetros mais importantes na caracterização de sua resistência térmica. Conhecendo-se o valor D a uma temperatura T, pode-se definir o tempo necessário a esta temperatura para se obter um nível de esterilização desejado. Quase todas as leveduras, bolores e bactérias não esporuladas têm um valor D correspondente a alguns segundos a 70°C. Alguns esporos de bactérias têm um valor D similar, mas entre 130 e 140°C. Um outro parâmetro importante que define a resistência térmica dos microrganismos é o valor z. Leveduras e células vegetativas têm valores z entre 5 e 8°C ao passo que muitos esporos têm valores z entre 8 e 11°C, medido em meio com pH próximo ao neutro. Portanto, os valores D e z permitem

estabelecer o efeito letal de um processo de esterilização (Shapton & Shapton, 1991). A *Tabela 2* apresenta a resistência térmica de algumas espécies de bolores e leveduras.

TABELA 2 - Valores D e z de bolores e leveduras.

Bolores e leveduras	Temperatura de teste (°C)	Valor D (min)	Valor z (°C)
células vegetativas e micélios	65,5	0,5 – 3,0	4,4 – 6,6
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	60,0	7,0 – 14,2	4,0 – 5,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60,0	8,2 – 22,2	4,5 – 5,5
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	60,0	20 – 40	–

Fonte: Stumbo (1973), Russel (1982), Putt & Jong (1982)
Baruffaldi & Oliveira (1998)

Como regra geral, a resistência dos microrganismos ao calor aumenta com o decréscimo da a_a , mas a composição do meio é muito importante. O efeito letal do calor pode ser acentuado pela presença de ácidos e retardado por açúcares que reduzem a a_a . Em relação ao pH, normalmente, a resistência dos microrganismos é superior em meios com valores próximos a 6,8. Leveduras e bolores têm sua resistência ao calor mais alta em valores de pH em torno de 5,0. Constatou-se que o tempo de redução decimal de muitos microrganismos é reduzido à décima parte com o decréscimo de duas unidades de pH. Em meio alcalino a resistência também é reduzida (Shapton & Shapton, 1991).

2.3.2. Padrão e taxa de morte microbiana

A prática de esterilização visa assegurar que todos os microrganismos presentes num dado material sejam tornados incapazes de reprodução. Três fatores precisam ser considerados na aplicação de qualquer agente esterilizante, a saber (Stanier *et al*, 1969):

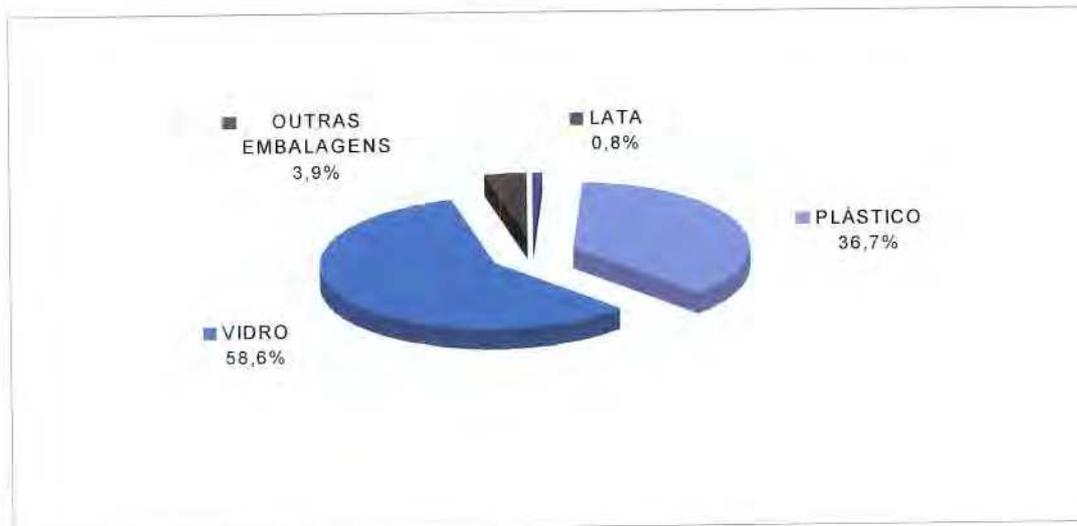
- A taxa de mortalidade dos organismos a serem destruídos, dependendo da sua natureza e da intensidade do agente letal;
- O tempo de exposição ao agente letal;
- Tamanho da população inicial de organismos.

2.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS SEM EMPREGO DO CALOR

O desenvolvimento de novas tecnologias para processamento de alimentos surgiu em resposta à demanda do consumidor por produtos com características semelhantes a alimentos frescos e com vida útil comparável àqueles processados pelos métodos térmicos tradicionais. Alguns desses processos não térmicos empregados envolvem o uso de alta pressão hidrostática, pulsos de alta intensidade de campo elétrico e magnético, pulsos de luz, irradiação ionizante, sendo descritos por Calderón-Miranda (1998). A aplicação de pulsos de campo elétrico no processamento de alimentos é comentada por Mermelstein (1998).

2.5. SISTEMAS DE EMBALAGENS PARA ISOTÔNICOS

As bebidas isotônicas podem ser acondicionadas em embalagens flexíveis auto sustentáveis do tipo *cheer pack*, formadas a partir de filmes laminados compostos de 4 materiais diferentes: poliéster na parte externa, alumínio (barreira ao oxigênio), náilon (resistência) e polietileno no interior, no canudo e na tampa (Embalagem...,1998), em latas de alumínio, copos de polipropileno, laminados cartonados e polietileno tereftalato (PET). Entretanto, até o ano de 1998, a maioria dessas bebidas ainda era comercializada em garrafas de vidro. Todavia, tem ocorrido uma tendência de mercado para garrafas plásticas, especialmente o PET, devido às vantagens que apresenta em relação aos outros materiais. A *Figura 2* ilustra a participação dos diferentes tipos de embalagem no mercado de isotônicos, no ano de 1998.



Fonte: ACNielsen, 2000

FIGURA 2 - Participação dos principais tipos de embalagem para isotônicos no mercado nacional registrada no ano de 1998.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

2.5.1. Garrafas plásticas

A expansão do consumo de bebidas fez elevar as pesquisas de desenvolvimento na busca de opções para embalagens. Um dos resultados foi o desenvolvimento do PET. Segundo o diretor da Associação Brasileira dos Fabricantes de PET (Abepet), a alta resistência mecânica (impacto) e a boa barreira à absorção de odores, retenção de CO₂, aliadas à leveza, transparência e brilho que lhe são característicos, permitem ao PET envasar praticamente qualquer tipo de bebida. Há restrições técnicas apenas aos produtos envasados a quente no PET comum. Mas, essa dificuldade já está sendo superada com a tecnologia de "heat set" (Descartáveis..., 1998).

Os plásticos têm assumido importante função na contenção e proteção de alimentos e bebidas e são amplamente utilizados pelas vantagens que apresentam em relação a outros materiais. Essas vantagens são devidas às suas propriedades físicas, mecânicas e químicas. As garrafas de plástico se

apresentam em diversas formas e, muitas vezes, são fabricadas a partir de resinas únicas ou monocamadas, mas um número crescente de composições multicamadas tem sido aplicado em garrafas de alta barreira para prolongar a vida-de-prateleira do produto (Brown, 1992). Teoricamente, qualquer polímero termoplástico pode ser transformado em frasco ou em garrafa, fabricados pelas técnicas de extrusão e sopro, injeção e sopro ou estiramento e sopro (Piergiovanni, 1998). Alguns tipos de garrafas que poderiam ser citadas são (Colóquio...,1998):

‣ Garrafa de PET monocamada (convencional)

Transparente, leve, resistente aos choques e à pressão interna, 100% reciclável, vem acondicionando um número cada vez maior de produtos líquidos alimentícios e não alimentícios. O PET convencional, entretanto, resiste até temperaturas próximas a 70°C, dependendo do formato, peso da embalagem e grau da resina utilizada, o que inviabiliza o seu uso em sistemas de enchimento a quente;

‣ Garrafa de PET termofixada

Os processos de termofixação permitem que as garrafas resistam a temperaturas de até 95°C, devido ao aumento da cristalinidade do polímero sem perder, no entanto, sua transparência;

‣ Garrafa de polietileno de alta densidade monocamada (PEAD)

Resistente, leve, suporta temperaturas elevadas (121°C) permitindo a esterilização do recipiente e do líquido;

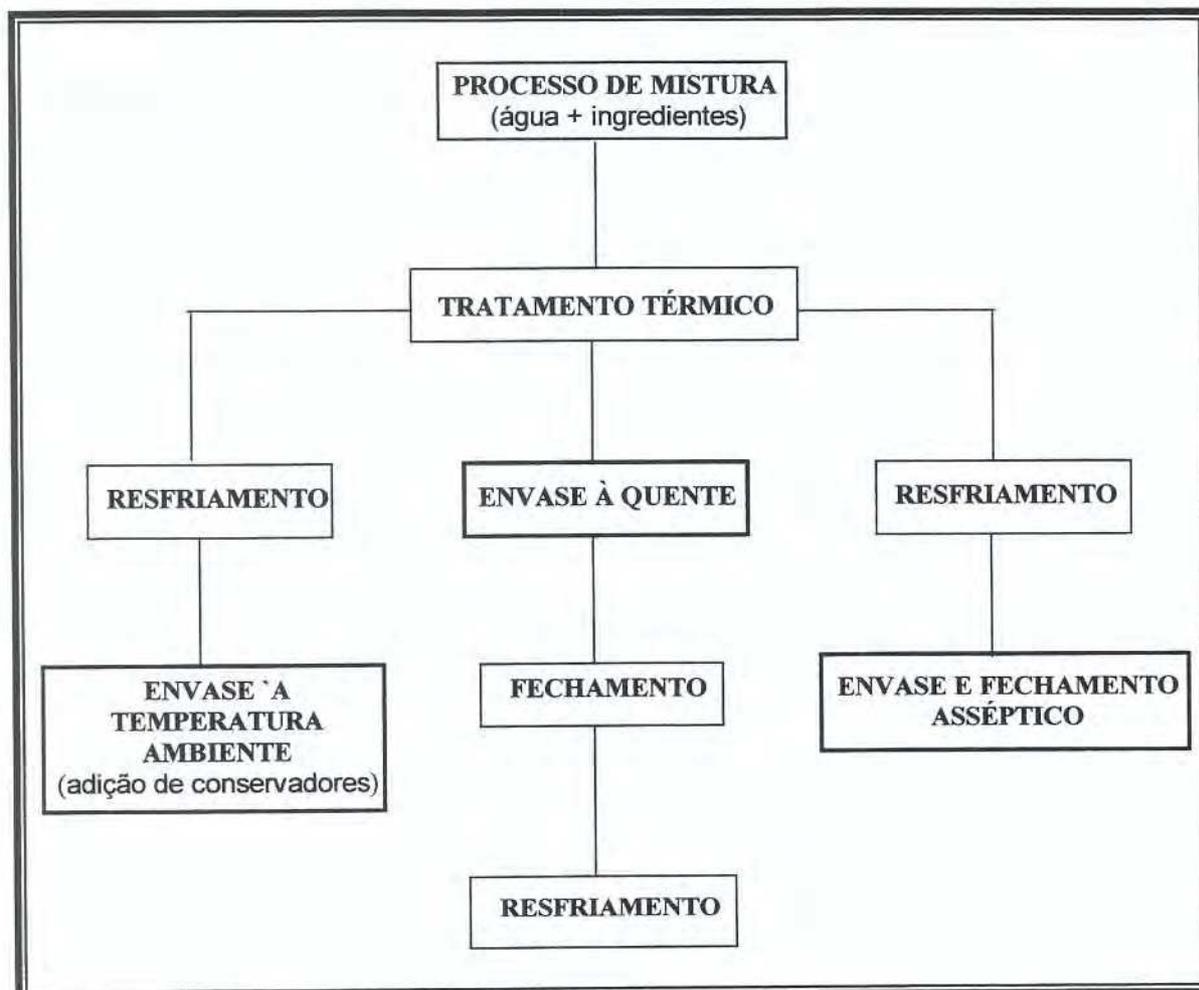
‣ Garrafa de PEAD multicamada

A inserção de uma camada do mesmo polímero pigmentada de preto bloqueia os raios ultravioleta nocivos à conservação do produto. A adição de materiais como poliacrilonitrilo (PAN) ou etileno vinil álcool (EVOH) na camada intermediária reforça a barreira da garrafa de PEAD em relação ao oxigênio.

2.5.2. Processos de envase

As bebidas isotônicas estão disponíveis na forma de pós, concentrados, e prontas para beber. Nesse último caso, o produto pode ser termicamente tratado e envasado à temperatura ambiente em condições assépticas ou um agente conservador é adicionado. Ainda existe a opção do enchimento `a quente que utiliza garrafas de vidro ou PET termofixado, também conhecido como garrafas *heat set* (Petrus & Faria, 1999). A *Figura 3* ilustra as alternativas tecnológicas dos processos de acondicionamento de bebidas isotônicas.

Conforme o artigo “Assepsia na Embalagem”, publicado pela Revista *Embanews* (1997), os processos de acondicionamento visam o aumento do tempo de vida útil do produto nas prateleiras, a redução do uso de conservadores químicos e da necessidade de refrigeração. As técnicas de assepsia, que são básicas para a indústria farmacêutica, vêm sendo cada vez mais empregadas no setor alimentício.



Fonte: Petrus & Faria (1999)

FIGURA 3 - Alternativas de processos e sistemas de envase para bebidas isotônicas.

O acondicionamento asséptico de alimentos e bebidas pré-esterilizadas tem alcançado um elevado nível de tecnologia na Europa e está ganhando cada vez mais importância. Durante as últimas décadas, um amplo desenvolvimento tem ocorrido nesta área (Reuter, 1993), tornando-se tema de grande interesse entre os distribuidores e fabricantes de alimentos e bebidas, incluindo-se aqui, os isotônicos. Tal fato é consequência do aumento da vida útil sem a necessidade do uso de refrigeração ou adição de conservadores ao produto, da redução de perdas

e custos de distribuição e estocagem, além de uma maior conveniência no uso final.

O envase asséptico exige medidas de higiene muito mais abrangentes do que em outros processos de envase. Isto se deve principalmente aos esporos de bolores, que são microrganismos presentes em grande quantidade no ar do ambiente, podendo contaminar o produto. Maior controle dos processos de tratamento térmico do produto e de assepsia da embalagem tornam-se imperativos para se obter a devida eficiência industrial. A *Figura 4* ilustra um esquema geral do sistema asséptico.

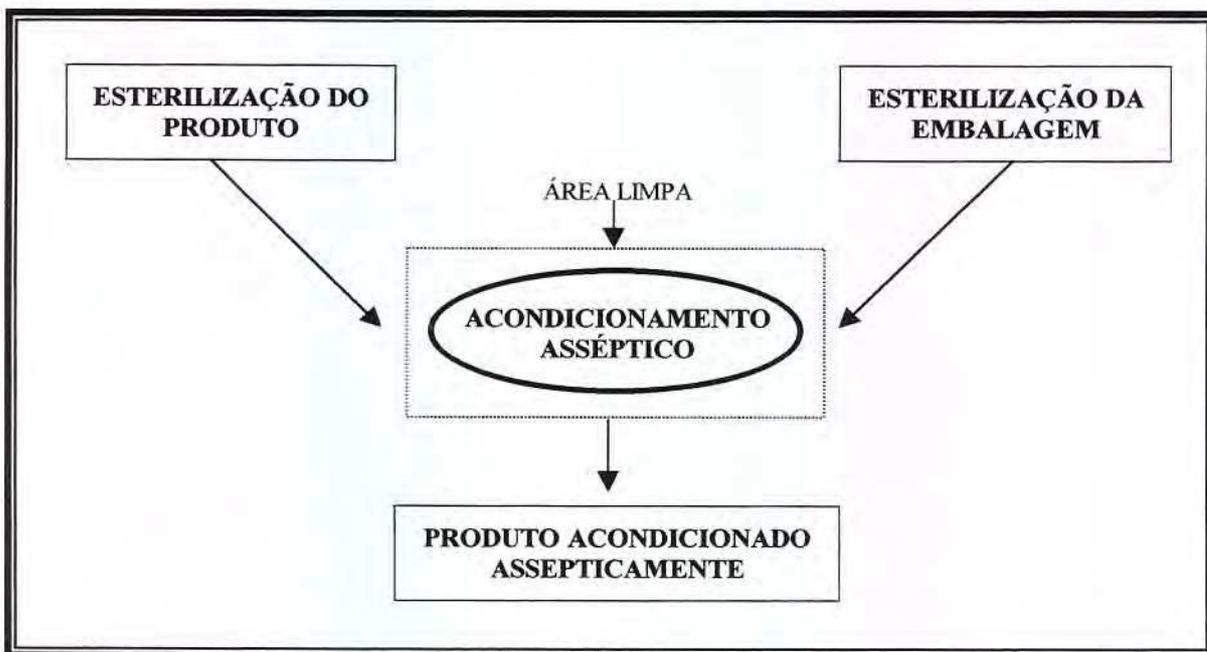


FIGURA 4 - Diagrama simplificado do sistema asséptico.

2.5.2.1. Asséptico x enchimento à quente

O acondicionamento asséptico pressupõe um produto livre de contaminantes, uma embalagem estéril e um processo sem qualquer risco de contaminação. O envase asséptico em garrafas de PET pode ser considerado uma inovação e oferece as seguintes vantagens (Roland, 1996):

- Redução no custo do material de embalagem, já que o PET convencional é mais barato que o PET termofixado e vidro;
- Melhor retenção das características sensoriais e nutricionais, resultante de um tratamento térmico menos drástico ao produto;
- Extensa vida-de-prateleira prescindindo de uma cadeia de frio para distribuição.

Em contrapartida, o sistema de enchimento à quente apresenta as seguintes inconveniências (Roland, 1996):

- A maioria dos materiais plásticos não pode ser usada, já que eles não são resistentes ao calor;
- A qualidade sensorial do produto é prejudicada devido ao alto tempo de exposição à temperatura elevada.

A alternativa para se explorar as vantagens do mercado de garrafas de PET termorresistentes, sem a adição de agentes químicos de conservação, requer o envase a quente ou a pasteurização em túnel com temperaturas entre 75 e 90°C. No entanto, como mencionado, o custo de garrafas PET resistentes ao calor é superior ao custo de garrafas de PET convencional ou de garrafas de vidro (Grimm, 1998).

Um problema comum em embalagens para bebidas é a baixa resistência ao empilhamento da embalagem, particularmente das garrafas plásticas. No caso de bebidas gaseificadas, parte das forças de compressão é absorvida pela pressão interna, o que aumenta a resistência não só ao empilhamento mas também à

compressão radial por manuseio. A situação se agrava com garrafas plásticas sem pressão interna; especialmente, quando forma-se vácuo na embalagem devido ao envase a quente e ao consumo de oxigênio pela oxidação da bebida (IPT, 1998; Romano & Faria, 1996). Entretanto, essa colapsagem poderá ser compensada com um desenho apropriado da embalagem.

Geralmente, o que determina o tipo de processo a ser utilizado, além das exigências peculiares de mercado, é o tempo mínimo de prateleira necessário para comercialização. Por exemplo, no caso de uma estabilidade de algumas semanas, o produto poderia ser envasado a frio sem medidas rígidas de controle e comercializado sob refrigeração. Entretanto, também seleciona-se o processo de envase do ponto de vista econômico, sendo que o envase a quente, em garrafas de vidro, ainda é o processo mais difundido (Grimm, 1998).

2.6. CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

A climatização e o tratamento do ar em indústrias alimentícias vêm se tornando cada vez mais relevantes quando se pensa na qualidade do produto e na saúde do consumidor. Microrganismos ou partículas em suspensão no ar, em contato com os alimentos, podem acarretar problemas de saúde pública. Portanto, investimentos em climatização e controle de contaminação nas indústrias alimentícias têm sido crescentes (Climatização..., 2000).

Os germes presentes no ambiente impõem um obstáculo aos processos de acondicionamento porque o ar, normalmente, contém um grande número de bolores. Conseqüentemente, há um potencial de recontaminação do produto após o processamento, resultando na sua deterioração (Grimm, 1998). Associado a esse fator, a contaminação não pode ser visualmente detectada por causa do tamanho das partículas suspensas no ar (Roland, 1996). A *Tabela 3* mostra os padrões estabelecidos pela Agência Espacial Americana (NASA) para classificação de salas limpas ou ambientes microbiologicamente controlados.

TABELA 3 - Padrões NASA para salas limpas e postos de trabalho com ambientes microbiologicamente controlados.

PARTÍCULAS	CLASSE DE AR		
	100 (3,5)	10.000 (350)	100.000 (3500)
número máximo de partículas \geq 0,5 μ m/ft ³ (/l)	100 (3,5)	10.000 (350)	100.000 (3500)
número máximo de partículas viáveis/ft ³ (/l)	0,1 (0,0035)	0,5 (0,0176)	2,5 (0,0884)

Os valores entre parênteses indicam o número máximo de partículas por litro de ar. ft=pés.

Fonte: Sveum, *et al* (1992)

Faria (1993) cita que o grau de limpeza do ar em fluxo laminar depende da eficiência dos filtros utilizados. O padrão federal americano classifica o ar, com base no número de partículas por pé cúbico (ft³), como:

- Classe 1.000.000 (ar industrial);
- Classe 100.000 (geralmente obtido por fluxo não laminar);
- Classe 10.000 (fluxo não laminar com filtro de alta eficiência);
- Classe 1.000 e 100 (fluxo laminar com filtro especial).

Para se obter a Classe 100 ou inferior, filtros de alta eficiência e com alta pressão, para direcionamento de ar, são necessários. A maioria dos sistemas assépticos operam em ambientes com Classe 10.000 (Faria, 1993).

A exigência pela qualidade e segurança na produção e processamento de alimentos é crescente e a importância do ar como vetor de contaminantes microbianos no processamento de alimentos depende do microrganismo que é veiculado e em que intensidade este ar entra em contato com o produto. Portanto, no acondicionamento asséptico de um alimento processado, o potencial do ar

como causador de recontaminação merece especial atenção (Martins & Luchese, 1999).

Devido à crescente preocupação com a contaminação na indústria alimentícia, processos e manipulação de ingredientes e alimentos estão cada vez mais sendo realizados em salas limpas ou ambientes controlados. Uma sala limpa consiste em um ambiente cujo ar, umidade e pressão são rigorosamente avaliados, de acordo com normas e padrões internacionais. Evita-se, neste caso, que materiais particulados ou microrganismos entrem em contato com o alimento, podendo interferir na qualidade do produto e até mesmo acarretar problemas de saúde para o consumidor final. A tecnologia de sala limpa permite atender padrões rigorosamente definidos de pureza e esterilidade do ar, sendo possível diminuir custos e melhorar a qualidade do alimento (Salas limpas..., 1999)

2.6.1. Microrganismos no ar

Os microrganismos no ar de uma planta de processamento são originários de seres humanos, matérias-primas usadas no processamento, pó, sujidades e outros elementos que, eventualmente, tenham acesso às instalações (Al-Dagal & Fung, 1990). Torna-se necessário, portanto, manter pressão positiva no interior de equipamentos e ambientes de envase para manter a contaminação de origem aérea fora do sistema. Todo ar que entra na área estéril de um equipamento asséptico deve ser tratado para remoção de suas partículas, especialmente microrganismos (Chambers & Nelson, 1993).

O ar é, sem dúvida, um grande vetor de microrganismos, especialmente esporos de bolores. É sabido que a contagem total de partículas em suspensão no ar tem relação direta com a presença de esporos como os de *Bacillus*, *Clostridium* e bolores. Assim sendo, a redução do material particulado em suspensão no ar resulta em melhoria da condição microbiológica do alimento. É evidente que se o ar veicular um patógeno que possa se multiplicar no produto, o

seu tratamento poderá trazer benefícios do ponto de vista de controle de processo e de saúde pública (Salas limpas..., 1999).

Existem várias formas para remover os microrganismos do ar. Uma delas é utilizar sistemas de filtros com fluxo laminar (Al-Dagal & Fung, 1990). Filtros de ar particulado de alta eficiência (HEPA) são usados para remover partículas em suspensão, microrganismos e seus esporos.

O número de microrganismos no ar pode ser detectado por diferentes métodos. Usualmente, utilizam-se amostradores nos quais uma corrente de ar é forçada através de uma abertura de dimensão fixa por um período pré determinado de tempo; sendo o ar impactado em placas contendo meio de cultura. Esta técnica permite detectar o volume de ar que está sendo monitorado, sendo, portanto, de natureza quantitativa.

As contagens de microrganismos podem variar de 1 a 10^4 UFC/m³ de ar dependendo do grau de limpeza e controle do ar no ambiente (Troller, 1993). Heldman (1974) verificou uma média de $2,8 \cdot 10^2$ UFC/m³ em plantas de embalagem de leite. Geralmente, as contagens de microrganismos no ar atingem valores de 10^3 UFC/m³ durante um período normal de processamento. Entretanto, esforços tem sido feitos na tentativa de reduzir esses números.

2.7. ESTERILIZAÇÃO DE EMBALAGENS

Uma superfície que contacta um alimento deve ser tão limpa e sanitária quanto o equipamento utilizado no processamento. Em alguns casos, até mesmo mais limpa. Isso pode ser justificado pelo fato de que a contaminação da embalagem pode representar contaminação pós-processo; isto é, não há passo terminal para destruição ou remoção de micro ou macrorganismos que podem estar presente no alimento como resultado de uma esterilização inadequada da embalagem. No caso de alimentos que são processados na sua embalagem, como os enlatados, normalmente isso não é um problema. Os materiais de embalagem devem ter uma contagem de superfície baixa quando são fabricados

ou devem ser esterilizáveis, de modo que sua contribuição na carga microbiana global e instabilidade do produto seja mínima. Uma variedade de materiais de embalagem é utilizada em processamento asséptico, freqüentemente como laminados, produzindo embalagens para propósitos específicos e equipamentos especializados (Troller, 1993).

Em geral, a inadequação ou a ausência de um sistema de esterilização de embalagens poderá resultar no aumento da contaminação do produto e, conseqüentemente, redução de sua vida útil (Petrus & Faria, 1999). Pesquisas têm comprovado que o grau de esterilização obtido na embalagem depende do nível de contaminação inicial, da área da embalagem e da eficiência do processo de esterilização. Exemplos destes processos incluem os listados na *Tabela 4*, classificados em físicos e químicos. Por vezes, a combinação entre os diferentes métodos pode resultar em uma maior eficiência.

TABELA 4 - Processos aplicados na assepsia de materiais de embalagem.

MÉTODOS FÍSICOS	MÉTODOS QUÍMICOS
<i>Processos Mecânicos</i>	
‣ enxágüe em água	‣ tratamento com H ₂ O ₂ (solução a 15 - 35%)
‣ jato de ar	‣ H ₂ O ₂ + ultravioleta
‣ ultra som	‣ tratamento com ácido peracético (0,1 - 1%)
<i>Processos Térmicos</i>	
‣ vapor saturado	‣ ácido peracético + álcool
‣ vapor superaquecido	‣ ácido peracético + H ₂ O ₂
‣ ar quente	‣ álcoois
‣ misturas de ar quente e vapor	‣ óxido de etileno
‣ aquecimento por extrusão	‣ ozônio
‣ gases aquecidos (N ₂ , He, O ₂ , CO ₂)	‣ cloro
<i>Processos por Irradiação</i>	
▪ Irradiação ionizante	
‣ raios gama	
‣ raios X	
▪ Irradiação ultravioleta	
▪ Irradiação infravermelho	

Fonte: adaptado de Reuter, 1993; Chambers & Nelson, 1993; Piergiovanni, 1998.

2.7.1. Métodos físicos

2.7.1.1. Processos mecânicos

A aplicação de jato de ar e enxágüe em água resulta em uma considerável redução na população microbiana por simples remoção, mas não destrói os microrganismos remanescentes na superfície da embalagem. Os processos mecânicos devem ser praticados, quando possível, para reduzir a carga microbiana inicial e portanto, tornar a esterilização subsequente mais efetiva (Chambers & Nelson, 1993).

2.7.1.2. Processos térmicos

Vapor saturado ou superaquecido, ar quente seco, ou uma mistura de ar e vapor são utilizados com freqüência na esterilização de embalagens. Exemplos de materiais termicamente esterilizados incluem latas metálicas e garrafas de vidro. A maioria dos plásticos não resiste às elevadas temperaturas empregadas no processo à exceção do polipropileno, que pode ser esterilizado por vapor saturado a 140-145°C sem perder a estabilidade (Chambers & Nelson, 1993).

Dentre os processos térmicos, o calor seco possui um efeito esterilizante moderado, sendo mais eficiente quando aplicado a altas temperaturas durante longos períodos de tempo; portanto, é adequado apenas a materiais termorresistentes. O vapor saturado tem um excelente efeito esterilizante, mas requer condições de alta pressão (Reuter, 1993).

A esterilização por calor úmido é muito mais rápida comparada ao calor seco, devido à quantidade de calor transferida ao material. O vapor condensado fornece calor latente e sensível ao material, ao passo que ar quente fornece apenas calor sensível (Block, 1992).

Outra forma de esterilização térmica é através do calor produzido durante os processos de transformação do material de embalagem. Exemplificando,

durante a extrusão da resina plástica, atinge-se temperaturas entre 180 e 230°C, suficientes para destruir esporos de bactérias. Diversos sistemas assépticos utilizam este método de assepsia (Chambers & Nelson, 1993).

De acordo com Piergiovanni (1998), gases aquecidos como N₂, He, Ar e CO₂ também podem ser usados na esterilização de recipientes de vidro.

2.7.1.3. Processos por Irradiação

Ainda considerando os procedimentos físicos, a irradiação ultravioleta resulta em altos níveis de redução de microrganismos (Reuter, 1993) e é usualmente obtida a partir de lâmpadas de vapor de mercúrio (Shapton & Shapton, 1991). Encontra maior aplicação na área de embalagens, sendo comprimentos de onda variando de 240 a 280nm os mais efetivos (Leitão, 1975). Uma restrição prática, referente ao uso desse meio de destruição microbiana, é que a irradiação ultravioleta tem reduzida capacidade de penetração. Mesmo uma fina camada de vidro filtra grande parte da irradiação e, assim sendo, apenas os microrganismos existentes na superfície de um objeto diretamente exposto à irradiação ultravioleta são susceptíveis à destruição (Pelczar, 1980).

As fontes mais comuns de irradiação ionizante empregada na tecnologia de esterilização são raios X e raios gama, embora radiações beta, elementos radioativos e elétrons acelerados também possam ser utilizados (Piergiovanni, 1998). Os raios X são letais para os microrganismos e as formas superiores de vida, apresentando considerável energia e poder de penetração, ao contrário da irradiação ultravioleta (Pelczar, 1980). Classificada entre os processos de esterilização de última geração, a irradiação gama, fundamenta-se na emissão de raios eletromagnéticos emitidos a partir do Cobalto, elemento radioativo. Por esse processo é possível esterilizar materiais de uso hospitalar, produtos farmacêuticos e cosméticos, embalagens, fitoterápicos e alguns tipos de alimentos (Martin, 2000). Em virtude de seu grande poder de penetração e efeito microbicida, os

raios gama são atraentes para uso na esterilização de materiais consideravelmente espessos ou volumosos (Pelczar, 1980).

Todavia, podem afetar a estabilidade física de alguns materiais plásticos, mas podem ser usados em embalagens planas, onde a geometria não afeta a aplicação de uma dose uniforme de irradiação (Joyce, 1993). Dependendo do grau de irradiação podem ocorrer modificações químicas na estrutura dos polímeros, com mudanças nas propriedades físicas, bem como desprendimento de gases e substâncias de baixo peso molecular capazes de afetar as características dos alimentos acondicionados (Killoran, 1983). As doses empregadas, entretanto, não afetam significativamente a maioria dos materiais de embalagem com exceção dos vidros e materiais celulósicos. Maiores detalhes sobre o efeito da irradiação sobre materiais de embalagem são discutidos por Faria & Atencia (1992).

2.7.2. Métodos químicos

Dentre os métodos químicos, merecem destaque a utilização de peróxido de hidrogênio e ácido peracético. Suas propriedades bactericidas, esporicidas e fungicidas são conhecidas há muitos anos (Baldry citado por Joyce, 1993). A ação antimicrobiana do H_2O_2 é supostamente devida a sua redução a radical hidroxil altamente reativo e que pode interagir com os lipídios da membrana celular e ácidos nucléicos. A inativação de esporos de *Bacillus subtilis*, comumente encontrado na superfície de materiais de embalagem, é alcançada por concentrações de H_2O_2 próximas a 30% a 70°C, durante poucos segundos (Joyce, 1993). Além disso, sua eficiência pode ser aumentada através da energia de ultrassom ou na presença de íons cúpricos (Ahmed *et al*, citado por Joyce, 1993).

Compostos como óxido de etileno, óxido de propileno, betapropillactona, formaldeído e brometo de metila podem ser utilizados como gases esterilizantes. No entanto, em geral, os esterilizantes gasosos têm lenta atividade antimicrobiana e seu uso se torna relativamente limitado na esterilização de materiais de embalagem (Toledo, 1975).

2.7.2.1. Ácido peracético

O ácido peracético é o princípio ativo de diversos produtos comercialmente disponíveis para sanificação de equipamentos industriais. De acordo com Leitão (1998), é um produto constituído por uma mistura estabilizada dos ácidos peracético, acético e H_2O_2 , como mostra a *Figura 5*. Embora as recomendações dos fabricantes sejam baseadas na concentração do ácido peracético, não há dúvidas que sua ação sobre as células vegetativas, esporos bacterianos, bolores, leveduras e vírus é também proveniente da ação coadjuvante do H_2O_2 , normalmente existente nas formulações comerciais. As soluções diluídas deste sanificante, nas concentrações normalmente sugeridas (0,05 - 0,1%) para a indústria de alimentos, são aprovadas nos testes da diluição de uso e de suspensão. Estes testes são amplamente aceitos na avaliação da eficiência antimicrobiana de sanificantes (Andrade & Macêdo, 1994).

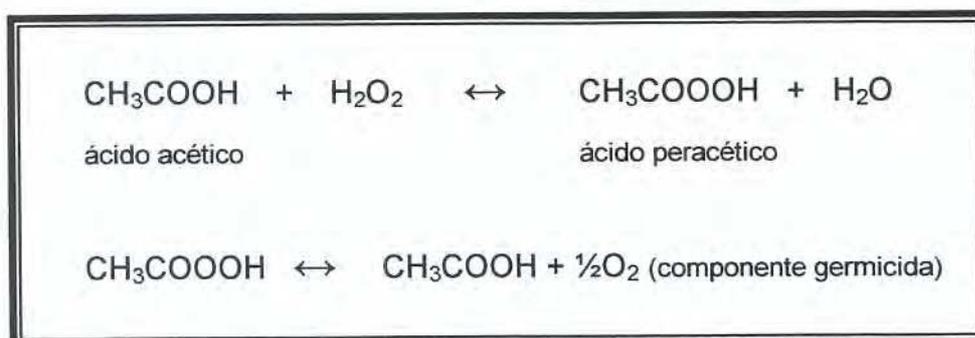


FIGURA 5 - Mistura estabilizada de ácido acético, peracético e peróxido de hidrogênio.

Segundo Leitão (1998), o ácido peracético é um agente oxidante muito potente que reúne vantagens como: amplo espectro de ação sobre microrganismos, tolerância à matéria orgânica, baixo efeito residual, eficiência a

baixas temperaturas, concentração facilmente determinada e facilidade de manuseio da solução de uso, já que esta não é irritante e pouco corrosiva. Uma limitação que apresenta é a baixa estabilidade da solução de uso à temperatura ambiente.

De acordo com Phillips (1977), o ácido peracético pode ser aplicado na forma líquida, em solução aquosa e como aerossol ou vapor, apresentando vantagens como ação rápida, mesmo contra esporos resistentes. Além disso, o ácido acético, produto de sua decomposição, não é tóxico.

O ácido peracético, em meio ácido, tem se mostrado bastante efetivo. Usado em soluções aquosas, como vapor ou aerossol, torna-se atraente para processos de esterilização de garrafas plásticas, em função de sua rápida ação mesmo em baixas concentrações. O uso de ácido peroxiacético (4,5% de ácido peracético e 28% de H_2O_2) na esterilização de garrafas plásticas termossensíveis foi publicado por Rammert (1996).

Outro agente químico disponível no mercado para desinfecção de garrafas plásticas resulta da combinação de dois agentes sinérgicos compostos: ácido peracético e ácido peroctanóico de duplo perácido.

2.7.2.2. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é o agente químico mais empregado na esterilização de embalagens em sistemas assépticos devido a sua ação rápida e efetiva. Concentrações entre 25 e 35% são usadas em processos de assepsia por imersão ou *spray*, em embalagens pré-formadas (Chambers & Nelson, 1993). A eficiência do H_2O_2 pode ser consideravelmente potencializada se combinado com calor, irradiação ultravioleta ou infravermelho (Shapton & Shapton, 1991). Para produtos cujo pH é inferior a 4,5, procedimentos menos agressivos podem ser empregados na esterilização do material (Reuter, 1993).

O H_2O_2 se decompõe prontamente em água e oxigênio altamente reativo, que elimina os microrganismos pelo seu forte potencial oxidativo (Chambers & Nelson, 1993), não sendo nocivo ao ambiente (Block, 1992).

O H_2O_2 somente foi regulamentado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1981, mas já era utilizado na Europa anteriormente. As normas da FDA especificam que a concentração máxima de 35% de H_2O_2 pode ser utilizada para as superfícies em contato com o alimento. As exigências da FDA para resíduos determinam que não mais do que 0,5mg/l de H_2O_2 pode estar presente nos testes feitos com água destilada acondicionada sob as condições de produção. Estas normas aplicam-se também aos produtos regulados pelo *U.S. Department of Agriculture* (USDA), segundo *Food Processors Institute* (1989). Na área de trabalho a concentração máxima de H_2O_2 , regulamentada também pela FDA, é de 1mg/l (Reuter, 1993).

Baseada no peróxido de hidrogênio, o plasma é uma tecnologia espacial que vem sendo utilizada no Brasil há cerca de cinco anos. O plasma gerado a partir de H_2O_2 é obtido pela ação de um campo magnético sobre o vapor de peróxido e o processo de esterilização é realizado em um equipamento de baixa temperatura conhecido por câmara de plasma. Como todo agente esterilizante, o plasma de H_2O_2 apresenta vantagens e desvantagens de aplicação. Dentre os aspectos positivos, podem ser citados a não geração de resíduo tóxico, sendo 100% inócuo, com poder de esterilização, penetrabilidade e redução do tempo do processo de esterilização. Entre as restrições de uso são apontados a sua incompatibilidade com alguns tipos de materiais (Martin, 2000).

2.7.2.3. Álcoois

Os álcoois são agentes desidratantes e desnaturantes de proteínas e esta propriedade pode ser responsável, em grande parte, por sua atividade antimicrobiana. Também são solventes de lipídios e podem lesar a membrana citoplasmática. Há um progressivo aumento do poder germicida dos álcoois à

medida que aumenta o peso molecular. Entretanto, uma vez que os álcoois de peso molecular mais alto do que o do álcool propílico não são miscíveis em todas as proporções em água, não têm maior utilidade prática como desinfetantes (Pelczar, 1980).

De acordo com o mesmo autor, o álcool etílico em concentrações de 50 a 70%, é eficaz contra formas vegetativas ou não esporuladas. Frequentemente se encontra a afirmação de que o etanol a 70% é mais efetivo, quanto ao efeito bactericida. Deve-se considerar, no entanto, que as concentrações atuantes sobre as células vegetativas são praticamente inertes contra os esporos bacterianos.

Leaper (1984) estudou a ação do ácido peracético e álcoois primários, observando efeitos esporocidas sinérgicos quando esporos de *Bacillus subtilis* foram expostos a 0,08% (v/v) de ácido peracético adicionado de 9,9% (v/v) de diferentes álcoois primários, evidenciando a possibilidade da utilização simultânea de ácido peracético e baixas concentrações de etanol na esterilização de materiais de embalagem.

2.7.2.4. Óxido de etileno

Durante anos, o vapor de óxido de etileno foi considerado a solução definitiva para produtos fabricados com materiais termossensíveis como plásticos e borrachas semi-sintéticas. O gás químico de baixa temperatura, no entanto, possui o inconveniente de ser altamente tóxico, cancerígeno e agressivo à atmosfera. Sua manipulação exige procedimentos rigorosos de segurança para evitar a dispersão para o meio ambiente (Martin, 2000).

A Tabela 5 apresenta alguns exemplos de métodos de esterilização e tipos de materiais de embalagem a que estes métodos se adequam.

TABELA 5 - Exemplos de métodos de esterilização adequados aos diferentes tipos de embalagens.

TIPO DE EMBALAGEM	MÉTODO DE ESTERILIZAÇÃO
latas metálicas	vapor superaquecido
copos de plástico pré-formados	H ₂ O ₂ e calor, vapor saturado
recipientes termoformados-enchidos-selados	calor da extrusão, H ₂ O ₂ e calor
bolsas e sacos plásticos	irradiação gama, calor da extrusão, H ₂ O ₂
<i>retort pouch</i> (embalagens flexíveis autoclaváveis)	mistura de ar quente e vapor saturado em autoclaves estáticas
garrafas plásticas	oxônia (mistura de H ₂ O ₂ e ácido peracético), ozônio
laminados cartonados	H ₂ O ₂ e calor, H ₂ O ₂ e irradiação infravermelho

Fonte: Food Processors Institute (1989), Uso de ozônio... (1999).

2.7.3. Taxa de não-esterilidade e taxa de contaminação

A taxa de não-esterilidade, definida como $F_s = (N_0/R) \cdot A$ é resultante de uma esterilização insuficiente do material de embalagem. Ela depende do número inicial de microrganismos aderido à superfície da embalagem (N_0/m^2), da redução absoluta de microrganismos (R) atingida no processo de esterilização e da dimensão da superfície interna da embalagem (A em m^2). Portanto, quanto maior as dimensões da embalagem maior será o valor de F_s , se N_0 e R mantiverem-se constantes (Reuter, 1993). A taxa de contaminação, segundo Faria (1993), é definida como sendo o número de embalagens contaminadas dividido pelo número total de embalagens produzidas.

2.7.4. Sistemas comerciais de esterilização

Oliveira & Padula (1988) citam alguns sistemas comercialmente usados na esterilização de materiais de embalagem, descritos a seguir:

Sistema *Contitherm*

Este sistema utiliza embalagens semi-rígidas pré-formadas. A esterilização, tanto do corpo quanto da tampa, é feita por H_2O_2 (30% a 80°C), que aplicado na forma de vapor, adere à superfície da embalagem na forma de um fino filme de condensado, que é ativado com ar quente. O sistema pode utilizar embalagens plásticas, laminados e cartonados, permitindo o uso de diversos formatos e o envase de produtos líquidos, pastosos, inclusive contendo pequenas partículas.

Sistema *Freshfill*

Assim como o sistema *Contitherm*, utiliza embalagens semi-rígidas pré-formadas. O agente esterilizante utilizado é o H_2O_2 a 35%, aplicado na forma de *spray*. Jatos de ar quente estéril ativam o peróxido e eliminam o residual. O sistema *Freshfill* permite a utilização de embalagens de diversos materiais, entre eles, poliestireno, polipropileno, polietileno e suas combinações com materiais de alta barreira. O equipamento permite o acondicionamento de produtos líquidos, viscosos e particulados.

Sistema *Bottelpack*

Utiliza embalagens sopradas e consiste basicamente no sopro, enchimento e fechamento da embalagem em um único equipamento. O material plástico fundido é introduzido na forma de *parison* em um molde. Após o fechamento do molde é feito o sopro utilizando ar estéril que dará forma à garrafa. Em seguida, enquanto o ar de sopro é evacuado, a embalagem moldada recebe o produto estéril. Após o sopro e envase, é feito o fechamento da embalagem por pressão e termosselagem da parte superior da garrafa. A câmara onde ocorre a operação de sopro/enchimento/fechamento, assim como todas as partes do equipamento que

entram em contato com o alimento são esterilizados no início da produção com vapor. O ar utilizado no sopro é constantemente filtrado através de filtros com 0,2µm. Os materiais de embalagem mais utilizados nesse sistema são as poliolefinas, tais como o polietileno e o polipropileno. A temperatura de extrusão desses materiais, geralmente entre 170 e 230°C, promove a esterilização da embalagem. O sistema é adequado para líquidos de alta e baixa viscosidade e acidez e o equipamento pode operar com embalagens que variam entre 0,1ml e 20l.

Sistema Serac

Desenvolvido para produtos de baixa acidez, utiliza garrafas plásticas sopradas. Aqui também, tem-se por princípio que as elevadas temperaturas empregadas na extrusão da resina plástica são suficientes para esterilizar a embalagem. A garrafa é fechada imediatamente após o sopro, o que garante sua esterilidade até a etapa de enchimento. Para produtos ácidos, o sistema *Serac* parte de garrafas já prontas, que são esterilizadas por uma mistura de água clorada, peróxido de hidrogênio e ácido acético. A embalagem permanece em contato com o agente esterilizante por cerca de 90 segundos. A seguir é feito o enxágüe das embalagens com água estéril, o enchimento e fechamento asséptico. As tampas são esterilizadas por uma mistura de peróxido de hidrogênio e ácido peracético, conhecida como oxônia. O sistema opera com garrafas de PVC (policloreto de vinila) orientado, PET (polietileno tereftalato) e PEBD (polietileno de baixa densidade) com capacidade variando entre 0,25 e 2 litros.

Sistema Tetra Pak

Para laminados cartonados, o sistema *Tetra Pak* utiliza o processo de esterilização por imersão em banho de peróxido de hidrogênio a 35% mantido a temperatura próxima a 70°C por um tempo de exposição de 7 segundos. O excesso de peróxido é removido pela ação combinada de compressão mecânica por cilindros e jatos de ar estéril aquecido. Um agente ativo de superfície é adicionado à solução de peróxido para redução da tensão superficial. O plástico

que está em contato direto com o alimento é hidrofóbico e um filme de H_2O_2 em sua superfície poderá ser produzido somente se um tenso ativo for adicionado à solução. O processo descrito ocorre antes da formação das embalagens (Von Bockelmann, 1988).

Outros sistemas

Yokoyama (1987) e Chambers & Nelson (1993) apresentam uma diversidade de sistemas aplicados na esterilização de materiais de embalagens. As possibilidades de sistemas alternativos são várias, pois as opções quanto aos diferentes agentes químicos, suas combinações e processos de aplicação permitem o desenvolvimento de tecnologias visando aplicações para o segmento de envase asséptico (Petrus & Faria, 1999).

2.8. FATORES QUE AFETAM A VIDA-DE-PRATELEIRA

Por definição, a estabilidade ou vida-de-prateleira é o período de tempo que corresponde, em condições definidas, a uma tolerável diminuição da qualidade de um alimento acondicionado em uma embalagem (Piergiovanni, 1998). Faria (1993) & Faria (1990) destacam a seguir alguns fatores que exercem efeito na estabilidade dos alimentos.

2.8.1. Desenvolvimento microbiano

As transformações nos alimentos em consequência do desenvolvimento de microrganismos podem ocorrer em velocidades bem superiores às demais alterações, principalmente quando a temperatura e a atividade de água forem favoráveis. As modificações nos alimentos acondicionados, causadas por microrganismos, são em geral mais facilmente evidenciadas do que as provenientes de reações enzimáticas ou químicas. De maneira geral, essas deteriorações resultam em:

- Formação de gases e compostos voláteis;
- Produção de compostos tóxicos;
- Acumulação de focos de microrganismos, como bolores e leveduras.

2.8.2. Temperatura

Este é o fator do ambiente que mais afeta a conservação dos alimentos durante a estocagem e comercialização. Todas as alterações de natureza biológica ou físico-química apresentam taxas de transformações que variam com a temperatura ambiente. A relação existente entre a temperatura e a velocidade de transformação em um produto pode ser expressa pelo valor Q_{10} , definido como a razão entre a velocidade da reação à temperatura $(T+10^{\circ}\text{C})$ e a velocidade da reação à temperatura T ; ou seja, Q_{10} representa o aumento da velocidade das reações quando a temperatura do sistema aumenta 10°C .

2.8.3. Concentração de oxigênio

A presença de oxigênio no espaço livre das embalagens influencia as alterações oxidativas e o crescimento microbiano. A embalagem pode atenuar as alterações provenientes da oxidação ao controlar, além do oxigênio disponível, a luz e a umidade relativa. Se a embalagem for hermética, a reação oxidativa será limitada pela presença de oxigênio residual no produto e no espaço livre. Por outro lado, se a embalagem for permeável ao oxigênio, a velocidade dependerá do suprimento de oxigênio pela difusão através da embalagem.

As modificações em alimentos como consequência das reações de oxidação resultam em perdas do valor nutritivo, quando envolvem as vitaminas e outros componentes essenciais, perdas de propriedades sensoriais e formação de compostos voláteis desagradáveis. Basicamente, todas essas reações dependem, além da presença de oxigênio livre nas embalagens, de fatores como a temperatura, a atividade de água, a luz e a composição do produto.

2.8.4. Barreira e formato da embalagem

A continuação do processo oxidativo, após consumido o oxigênio disponível, irá depender da sua reposição pelas paredes da embalagem e do sistema de fechamento. Essa reposição será tanto mais rápida quanto menor for a barreira do material à passagem do oxigênio do ambiente externo para o interior da embalagem. Por essa razão, os materiais de embalagem devem apresentar boa barreira ao oxigênio. Como alternativa, existem os laminados contendo folha de alumínio ou os coextrusados com etileno-vinil-álcool (EVOH) ou policloreto de vinilideno (PVDC).

O tamanho e o formato da embalagem também interferem na vida-de-prateleira. À medida que o tamanho aumenta, a relação área/volume diminui e, portanto, mais protetora torna-se a embalagem. Isso porque a penetração de oxigênio aumenta numa ordem quadrática, enquanto que o volume do produto que reagirá com este gás aumenta numa ordem cúbica. Ou seja, se todos os outros fatores permanecerem constantes, a necessidade de proteção diminui à medida que o tamanho da embalagem aumenta. É importante considerar que apenas a permeabilidade do material de embalagem não é suficiente para se estabelecer seu grau de proteção. O processo de transformação, bem como o formato da embalagem afetam intensamente a sua taxa de permeabilidade, estando o maior efeito de perda de barreira relacionado com as regiões de fechamento ou dobras no material, feitas para dar o formato final.

2.8.5. Alterações sensoriais

O gosto, odor e aparência de um alimento também são critérios utilizados na determinação de sua estabilidade. A qualidade sensorial de um alimento altera quando sua microbiota se desenvolve e metaboliza os nutrientes disponíveis no meio. As alterações sensoriais podem ser sutis no início, mas posteriormente tornam o alimento inaceitável, não sendo geralmente detectadas até que um número elevado de microrganismos seja atingido. A população necessária para

causar deterioração varia com o alimento e tipo de microrganismo, podendo a vida-de-prateleira ser estimada com base na densidade microbiana. Como regra geral, assume-se que uma população de 10^7 bactérias, 10^5 leveduras/g ou ml ou bolores visíveis indicam o fim de estabilidade microbiológica do alimento (Curiale, 1991).



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Bebida isotônica

A bebida isotônica foi preparada por dissolução e mistura manual dos ingredientes em água deionizada. A formulação usada na elaboração da mistura, com teor de sólidos próximo a 7%, é apresentada na *Tabela 6*. As concentrações do conservador químico (sorbato de potássio) adicionadas foram 0, 50 e 100 mg/l, níveis correspondentes a cada lote de bebida produzido.

TABELA 6 - Formulação isotônica ($\overline{\text{pH}}=3,4$).

INGREDIENTES	COMPOSIÇÃO (g/L)
sacarose	44,914
glucose anidra	20,138
fosfato de potássio	0,317
cloreto de sódio	0,427
sorbato de potássio	0 - 0,100
citrato de sódio	0,208
ácido cítrico	0,638
ácido ascórbico	0,120
aroma de laranja	1,500

Fonte: baseado em Rusig (1998)

3.1.2. Embalagem

Foram utilizadas garrafas transparentes de polietileno tereftalato (PET), mostradas na *Figura 6*, com capacidade para 500 ml e tampas de polipropileno fornecidas pela Rhodia-Ster Ltda, Poços de Caldas - MG. Tais embalagens apresentavam-se em uma unidade paletizada totalizando-se 2000 unidades das quais foram retiradas as amostras para a assepsia e acondicionamento da bebida.

Essas garrafas foram produzidas pelo processo de transformação por injeção-estiramento-sopro. A etapa de sopro é realizada com o molde aquecido, diferentemente do sopro de garrafas para refrigerantes, onde o molde é resfriado. Essa modificação melhora a resistência física da embalagem durante o enchimento a quente e, associada ao peso e *design* da garrafa, proporciona uma resistência final adequada (Anjos, 2000).



FIGURA 6 - Garrafa plástica utilizada no experimento.

3.1.3. Sanificantes químicos

Os sanificantes utilizados nos testes das embalagens foram produtos de uso comercial, a saber:

- ▶ Asepticper[®] (H₂O₂ a 35% para envase asséptico de alimentos) fornecido pela Peróxidos do Brasil;
- ▶ Proxitane 1512[®] (mistura de 15,6% de ácido peracético e 23,3% de H₂O₂), Peróxidos do Brasil;
- ▶ Vortex[®] (6,1% de H₂O₂ e 4,7% de ácido peracético) fornecido pela Ecolab;
- ▶ Etanol 70%, adquirido de atacadista local.

As soluções preparadas com Proxitane 1512[®] continham 0,1; 0,3; 0,5 e 1% de ácido peracético e as soluções de Vortex[®], 0,13 e 0,30% do produto na forma comercial, sendo todos os agentes testados à temperaturas próximas a 25°C.

3.1.4. Reagentes

- ▶ Soluções de permanganato de potássio (KMnO₄) 0,5N e tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,1N padronizadas foram utilizadas na determinação volumétrica de peróxido de hidrogênio e ácido peracético, respectivamente;
- ▶ Na análise de peróxido de hidrogênio residual das embalagens foram utilizadas soluções de tiron 5x10⁻⁴ mol/l {4,5 dihidroxi-1,3 ácido benzenodisulfônico-sal disódico monohidratado/[(OH)₂C₆H₂(SO₃Na)₂.H₂O]}, sulfato de cobalto heptahidratado 10ppb [CoSO₄ .7H₂O] e hidróxido de sódio 1mol/l [NaOH];
- ▶ Na determinação da acidez titulável da bebida isotônica foram utilizadas solução padronizada de NaOH 0,1N e fenolftaleína como indicador;
- ▶ Solução de 2,6-diclorofenolindofenol-sódio (DCFI) e ácido oxálico foram usados na determinação volumétrica de ácido ascórbico na bebida.

3.1.5. Microrganismo teste utilizado na avaliação da eficiência dos sanificantes

- › Cultura pura de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, fornecida pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos/Campinas-SP, mantida sob refrigeração e repicada 24 horas antes do uso.

Os microrganismos do gênero *Enterobacter* são bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas de importância para a microbiologia de alimentos. São bacilos móveis, fazem parte da microbiota intestinal do homem e pertencem ao grupo dos coliformes (Franco, 1996). Segundo Leitão (1999), a espécie *Enterobacter aerogenes*, está amplamente disseminada no ambiente.

3.1.6. Meios de cultivo para microrganismos

- › Ágar padrão para contagem (PCA) DIFCO® e MERCK® para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos em profundidade;
- › Ágar batata dextrose (PDA) MERCK® suplementado com cloranfenicol para contagem de bolores e leveduras em superfície;
- › Caldo tripticase de soja (TSB) OXOID® para reativação das células de *Enterobacter aerogenes*;
- › Caldo selenito cistina MERCK®, caldo tetracionato DIFCO®, ágar xilose lisina desoxicolato de sódio (XLD) OXOID® e ágar bismuto sulfito DIFCO®, para pesquisa de *Salmonella*;
- › Baird-Parker agar base DIFCO®, para pesquisa de *Staphylococcus aureus*;
- › Ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP) DIFCO®, para *Bacillus cereus*;
- › Caldo lauril sulfato MERCK®, para pesquisa de coliformes;
- › Meio base para *Clostridium perfringens* + cicloserina (TSC) OXOID®, para Clostrídios sulfito redutores.

3.1.7. Equipamentos

3.1.7.1. Equipamentos de laboratório

- Osmômetro de pressão de vapor, KNAUER modelo A0280, para determinação do valor osmótico da bebida. O osmômetro de pressão de vapor é constituído por dois termistores pareados localizados dentro de uma célula saturada com vapor de solvente (água, neste caso);
- Medidor eletrônico de espessura MAGNA-MIKE[®] modelo 8000 para medida da espessura das garrafas plásticas;
- Potenciômetro ACCUMET[®] modelo 15;
- Refratômetro CARL ZEISS JENA, modelo 32G, utilizado na determinação de sólidos solúveis totais (°Brix);
- Espectrofotômetro FEMTO modelo 432 equipado com cela de fluxo de 18mm de caminho ótico e 300µl de capacidade, bomba peristáltica com 8 canais e velocidade variável, ISMATEC modelo IPC, injetor comutador confeccionado em acrílico, registrador potenciométrico KIPP & ZONEN modelo BD III, tubos de *tygon* de diversos diâmetros para o transporte de reagentes e amostra, tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,7 mm para a confecção de reatores, linhas de transmissão e alças de amostragem, utilizados na determinação da concentração residual de peróxido de hidrogênio nas embalagens;
- Amostrador de ar MERCK[®] MAS-100 para verificação da qualidade microbiológica do ar durante o processamento na planta piloto;
- Estufas isotérmicas FANEM[®] modelo BOD, ajustadas a 25°C para estocagem dos lotes do produto processado.

3.1.7.2. Equipamentos em escala piloto

- Trocador de calor a placas Micro Plak, de fabricação SUMÁ INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA - Campinas/SP, com vazão média de 135l/h e capacidade de regeneração de 84,5%;
- Compressor de ar comprimido para acionamento da válvula pneumática de retorno de produto não pasteurizado do trocador de calor;
- Tanque de aço inoxidável cilíndrico com agitação manual para preparação do produto, com capacidade para 100l;
- Tanque de aço inoxidável cilíndrico para recepção e envase do produto pasteurizado, com capacidade para 80l;
- Tanque de aço inoxidável contentor da solução sanificante, com capacidade para 50l;
- Tanque de aço inoxidável encamisado para aquecimento da água utilizada no enxágüe das embalagens, capacidade 200l;
- Trocador de calor em serpentina utilizado no resfriamento da água de enxágüe;
- Sistema de sanificação de garrafas do tipo *spray*.

As Figuras 7, 8, 9, 10 e 11 ilustram os equipamentos, em escala piloto, utilizados no processamento da bebida e na assepsia das embalagens, sendo os ensaios realizados no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp.



FIGURA 7 - Vista da planta piloto utilizada no processamento da bebida isotônica, composta por trocador de calor a placas (ao centro) e tanques para elaboração do produto (à esquerda) e envase (à direita).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



FIGURA 8 - Sistema desenvolvido para assepsia das garrafas (Faria, 1999).

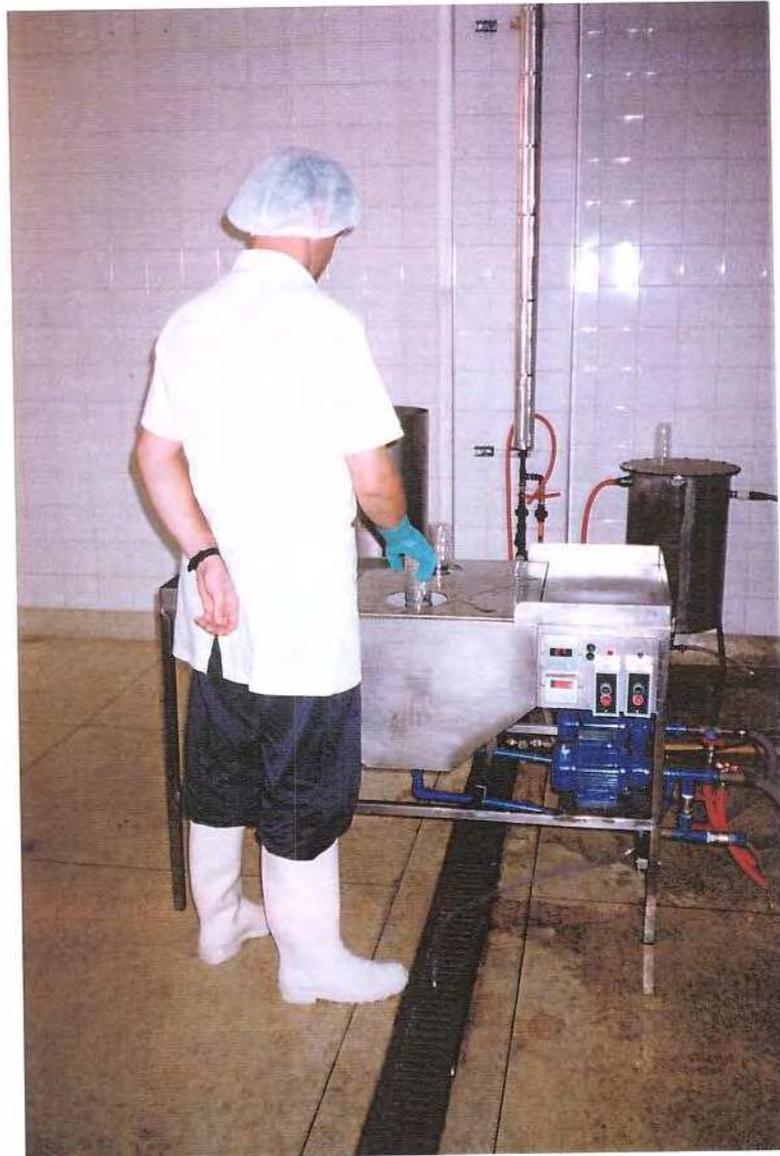


FIGURA 9 - Operação de assepsia das embalagens.



FIGURA 10 - Detalhe da assepsia e enxágüe das garrafas por *spray*.



FIGURA 11 - Envase da bebida em garrafas de PET assépticas.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Formulação isotônica

A formulação da mistura isotônica, baseado em Rusig (1998), foi ajustada tendo como referência o valor osmótico do plasma sanguíneo humano, que varia de 285 a 295 mOsmolal, conforme citado por Srebernich (1998).

3.2.1.1. Medida do valor osmótico da bebida isotônica

O valor osmótico de uma bebida pode ser determinado através de uma metodologia conhecida como osmometria de pressão de vapor. A osmometria de pressão de vapor é uma técnica baseada nas propriedades coligativas de uma solução, que apresenta uma pressão de vapor inferior àquela do solvente puro. O potencial químico do solvente puro é reduzido pela presença do soluto, e conseqüentemente, a pressão de vapor do solvente na solução é também reduzida. Portanto, para manter constante a pressão de vapor na célula do equipamento, o solvente deve ser transferido a solução por condensação. Essa técnica é chamada osmometria porque há transferência de solvente de um sistema diluído para um sistema mais concentrado. A condensação do solvente eleva a temperatura do meio contendo a solução e seu efeito induz a um sinal elétrico que pode ser detectado pelo equipamento (Sabadini *et al*, 1997).

A osmolalidade da bebida foi determinada em osmômetro de pressão de vapor, Knauer modelo A0280, através da medida do número de partículas osmoticamente ativas. Este método é adequado para determinar pesos moleculares de compostos em solventes aquosos ou orgânicos como também a osmolalidade total de soluções biológicas. Permite também medidas com soluções de alta viscosidade e com elevada concentração osmolal*.

* Manual de operação do equipamento

O osmômetro de pressão de vapor é constituído por dois termistores pareados localizados dentro de uma célula saturada com vapor de solvente (água, neste caso). A temperatura da célula, ajustável em uma ampla faixa, fica eletronicamente termostaticada. As gotas do solvente, suspensas em ambos termistores, têm diferencial de temperatura igual a zero. Quando uma das gotas do solvente é substituída por uma gota de uma solução, ocorre a condensação do vapor do solvente devido à menor pressão de vapor da solução. O calor liberado pela condensação eleva a temperatura da gota da solução, aumentando, portanto, a sua pressão de vapor. A condensação do vapor do solvente cessa quando a pressão de vapor da solução se iguala à pressão de vapor do solvente puro dentro da célula. A diferença de temperatura resultante entre os termistores é proporcional a concentração osmolal, definida como a relação entre o número de moles do soluto e a massa do solvente expressa em kg, e detectada através de um sinal elétrico pelo equipamento. Devido a perdas térmicas, por dissipação através dos componentes do equipamento, assim como devida à radiação e convecção, o efeito medido é sensivelmente inferior àquele teoricamente calculado. Portanto, o equipamento deve ser previamente calibrado*.

Antes da leitura foi construída uma curva de calibração utilizando soluções de cloreto de sódio (NaCl) com diferentes concentrações conhecidas. O osmômetro foi ajustado para operar nas seguintes condições:

- › Temperatura da célula de inserção da amostra: 50°C;
- › Intervalo programado para leitura após a inserção das gotas de solvente e solução na célula: 2 minutos.

* Manual de operação do equipamento

3.2.2. Medida da espessura e peso das embalagens

Cinco garrafas foram retiradas, aleatoriamente, da unidade paletizada para pesagem. A sua espessura foi determinada eletronicamente em medidor de espessura MAGNA-MIKE® modelo 8000.

3.2.3. Critérios adotados na seleção do sanificante e assepsia das embalagens

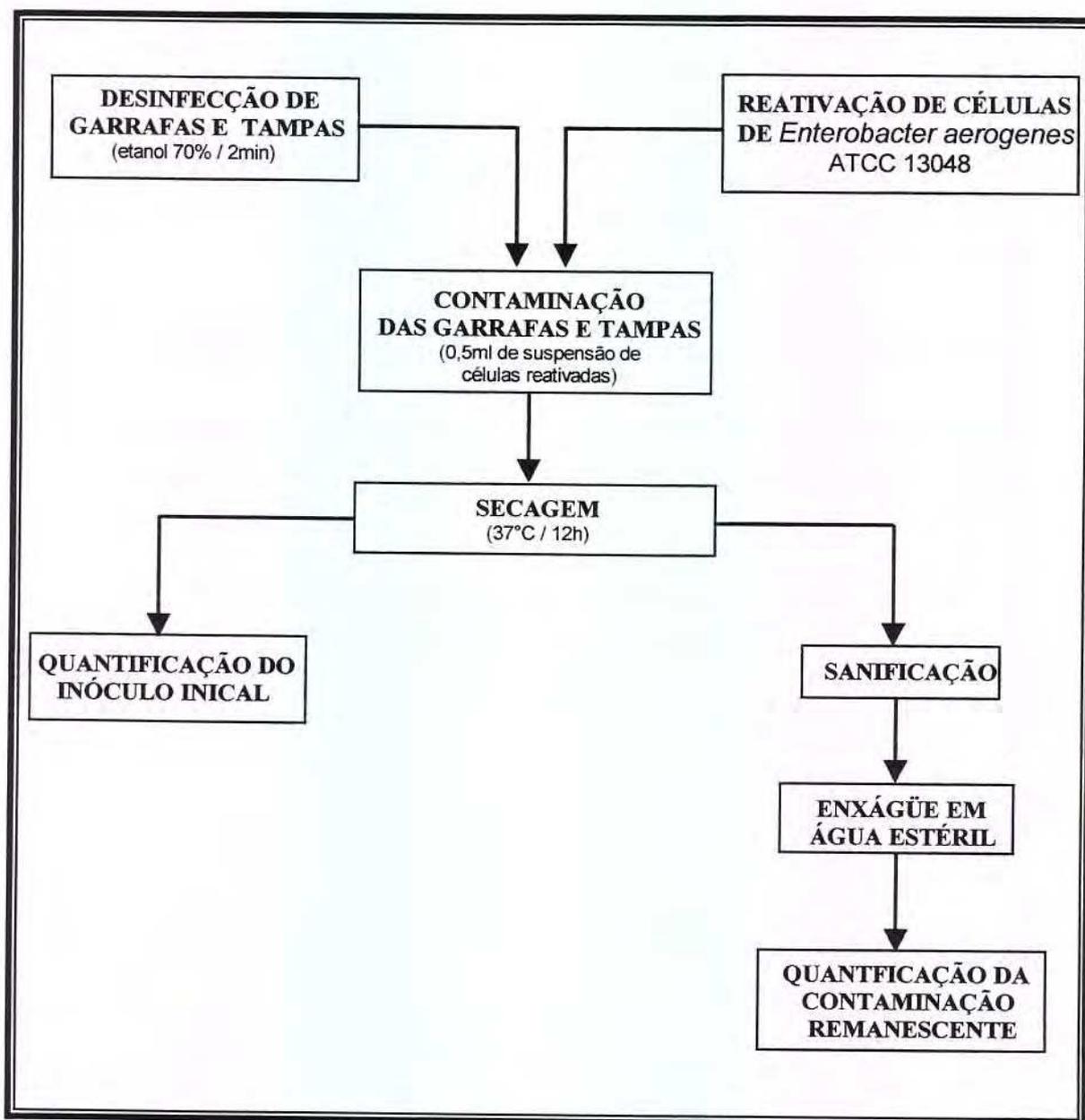
O delineamento do processo de assepsia das embalagens na planta em escala piloto foi fundamentado em alguns critérios e testes detalhados a seguir:

- Desempenho nos testes microbiológicos;
- Efeito residual na qualidade sensorial do produto envasado;
- Resíduo de peróxido de hidrogênio nas embalagens;
- Facilidade e segurança no manuseio;
- Custo do agente químico.

3.2.3.1. Testes microbiológicos de assepsia

As garrafas foram sanificadas por imersão em recipientes de vidro com capacidade para 4 litros e imediatamente enxaguadas com água estéril para a remoção do resíduo de sanificante das embalagens. As metodologias aplicadas nas análises microbiológicas, ilustradas pelas *Figuras 12 e 13*, foram baseadas no teste desafio para avaliar o desempenho de lavadoras de garrafões de água mineral, proposto por Silva (1999) e na técnica da solução de enxágüe, proposta por Sveum *et al* (1992). Os resultados foram expressos como média de três repetições, em número de reduções logarítmicas ou decimais (RD).

Outros métodos para monitoramento microbiológico de superfícies, incluindo embalagens, superfícies de instrumentos e equipamentos são descritos por Sveum, *et al* (1992).



Fonte: adaptado de Silva (1999)

FIGURA 12 - Teste desafio para avaliação do desempenho de agentes químicos na sanitização das garrafas.

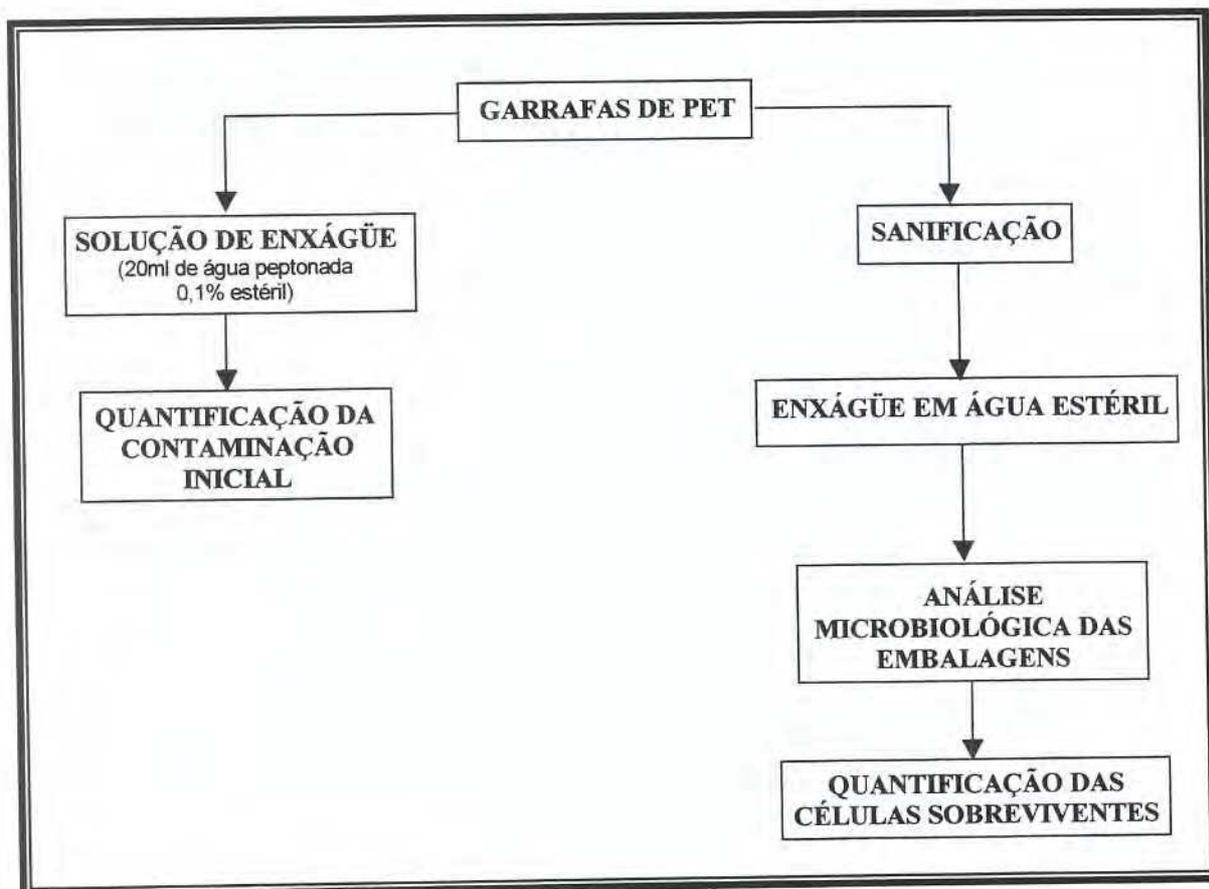
A descrição detalhada da metodologia, esquematizada pela *Figura 12*, é apresentada a seguir:

- ▶ Inicialmente as garrafas e tampas plásticas foram desinfetadas em solução de etanol 70% (v/v) durante 2 minutos de imersão. Este tratamento foi estabelecido considerando 70% como a concentração de etanol mais efetiva quanto ao efeito microbicida, de acordo com Pelczar (1980). O tempo de contato selecionado foi baseado em testes previamente realizados, assegurando a completa desinfecção das embalagens. As garrafas foram tampadas com algodão estéril e mantidas em ambiente limpo durante 24h, aproximadamente, para garantir a eliminação completa do resíduo de etanol;
- ▶ Uma alçada da cultura pura de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 foi inoculada em 30 ml de caldo tripticase de soja (TSB) e incubado a 35°C/24h;
- ▶ Os 30 ml de cultura foram transferidos para 30 ml de água peptonada 0,1% estéril. Sob constante agitação, foi retirada uma alíquota de 1ml, diluída e plaqueada. Contagens da ordem de 10⁸ UFC/ml foram verificadas confirmando a alta viabilidade celular. Da mesma suspensão, foram retiradas alíquotas de 0,5 ml com micropipeta e adicionadas nas garrafas, previamente desinfetadas. Depois de tampadas, as garrafas foram vigorosamente agitadas de forma que a alíquota da suspensão de células pudesse se distribuir por toda a sua superfície. As garrafas foram tampadas com gase estéril e secas em estufa a 37°C durante 12h para que as células ficassem bem fixadas à sua superfície;
- ▶ Três das garrafas contaminadas foram separadas, para a quantificação do inóculo inicial. A cada uma das garrafas foi adicionado 20 ml de água peptonada 0,1% estéril. As garrafas foram agitadas vigorosamente para lavar as paredes e remover as células de sua superfície. 1 ml da água de lavagem foi coletada, diluída, plaqueada em ágar padrão para contagem (PCA) seguido de incubação a 35°C/48h. As placas foram submetidas à contagem e a média do valor obtido entre as três garrafas foi considerada como inóculo inicial;
- ▶ Para a realização do teste desafio, novas séries de três garrafas foram imersas nos diferentes sanificantes. As garrafas foram mantidas em contato com o agente químico por diferentes tempos variando de 3 a 40 segundos,

dependendo do sanificante e de sua concentração testada e imediatamente enxaguadas em água estéril para remoção do residual químico. O tempo de exposição ao sanificante foi considerado a partir do instante em que a solução preencheu completamente a superfície interna da garrafa após a imersão;

- A quantificação das células sobreviventes seguiu o mesmo procedimento utilizado na quantificação do inóculo inicial. O número de reduções decimais (RD) obtido em cada garrafa foi calculado subtraindo o log do número de sobreviventes (N) do log do inóculo inicial (N_0).

Um novo teste, esquematizado pela *Figura 13*, foi realizado com garrafas expostas à contaminação natural do ambiente de estocagem. Neste caso, as concentrações dos sanificantes foram selecionadas com base no seu desempenho verificado no teste desafio, adotando-se um procedimento similar ao descrito anteriormente, eliminando-se apenas a etapa de contaminação das embalagens.



Fonte: adaptado de Sveum *et al* (1992)

FIGURA 13 - Avaliação do desempenho dos agentes químicos na sanificação de garrafas com contaminação natural do ambiente de estocagem.

A concentração dos princípios ativos no Vortexx[®] e Proxitane 1512[®] foi verificada por análise volumétrica, de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações de peróxido de hidrogênio e ácido peracético foram determinadas por titulação com soluções de permanganato de potássio (KMnO₄) 0,5N e tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,1N padronizadas, respectivamente. A mesma metodologia foi sugerida por Langeveld *et al* (1996).

A concentração de peróxido de hidrogênio no produto Asepticper[®] foi verificada através de dois métodos de análise. Por titulação, com solução de KMnO₄ 0,5N padronizada, também recomendado pelo fabricante e por Langeveld

et al (1996), e através da leitura da densidade e temperatura da solução utilizando-se um nomograma específico, apresentado no *Anexo I*, proposto pela Tetra Pak LTDA, Montemor-SP.

3.2.3.2. Teste sensorial de residual químico

O efeito residual dos sanificantes na qualidade sensorial da bebida isotônica foi verificado através do método triangular por um painel de 27 provadores não treinados, em cabines individuais iluminadas com luz branca, baseado na metodologia apresentada por Chaves (1993). Foram feitos testes com amostras da bebida acondicionadas em garrafas sanificadas com e sem enxágüe final.

Foram apresentadas três amostras aos provadores: duas idênticas e uma diferente e pedido que identificassem a amostra diferente. As duas amostras iguais eram de bebidas acondicionadas em garrafas não sanificadas e a amostra diferente, em garrafa sanificada, contendo resíduos do sanificante. A ficha para avaliação sensorial utilizada é mostrada no *Anexo II*.

A bebida isotônica, preparada no dia anterior às análises, foi acondicionada imediatamente após a operação de sanificação das embalagens. Depois do envase, o produto foi mantido sob refrigeração e o teste sensorial realizado, aproximadamente, após 15 horas. As amostras foram servidas aos provadores em copos plásticos de 50ml a uma temperatura próxima a 13°C.

3.2.3.3. Análise de residual de H₂O₂ nas embalagens

A determinação do residual de H₂O₂ em garrafas sanificadas foi feita por análise espectrofotométrica utilizando-se um sistema de fluxo monossegmentado. Neste sistema a amostra é inserida entre duas bolhas de ar, reduzindo sua dispersão e aumentando, portanto, a sensibilidade do método. Este teste baseia-

se na reação de Tiron com H_2O_2 , catalisado pelo cobalto em pH básico, mantido com solução de NaOH, como proposto por Pereira Filho (1999).

Os sanificantes utilizados foram Asepticper[®], Proxitane 1512[®] e Vortexx[®]. As soluções de Proxitane 1512[®] e Vortexx[®] preparadas continham 0,46 e 0,021% de H_2O_2 , respectivamente. O produto Asepticper[®] foi utilizado na sua forma comercial, contendo 35% de H_2O_2 . As concentrações dos sanificantes mencionadas foram selecionadas com base nos resultados obtidos nos testes microbiológicos para avaliação de seu desempenho. As análises foram feitas em séries de cinco garrafas sanificadas com os três produtos com e sem enxágue final.

3.2.3.4. Considerações sobre a estabilidade e segurança no manuseio dos sanificantes

De acordo com o fabricante, o Asepticper[®] é um produto estável podendo ser estocado a temperaturas entre $-25^{\circ}C$ a $+45^{\circ}C$ pelo prazo de 1 ano. Todavia, é bastante oxidante e corrosivo exigindo muito cuidado quando manuseado. Precauções devem ser tomadas, pois o peróxido de hidrogênio concentrado pode gerar oxigênio suficiente para causar risco de incêndio. Além disso, pode causar irritação na pele e danos nas córneas dos olhos.

O Proxitane 1512[®], na sua forma comercial, apresenta propriedades oxidantes e corrosivas e boa estabilidade, podendo ser mantido por 6 meses a temperaturas entre -30 e $+35^{\circ}C$, segundo o fabricante. A solução de uso, entretanto, é instável, devendo ser preparada, preferencialmente, momentos antes do uso como sugerido por Leitão (1998).

Segundo o fabricante, o produto Vortexx[®] é efetivo a temperaturas entre 4 a $40^{\circ}C$ e pode ser estocado por até 6 meses. Por suas propriedades corrosivas requer cuidados especiais ao ser manipulado, não devendo ser aplicado em sua forma comercial.

3.2.4. Delineamento do tratamento térmico da bebida isotônica

O binômio tempo / temperatura delineado para o processamento da bebida foi baseado nas seguintes premissas:

- ▶ Foram considerados os limites superiores das faixas aproximadas de resistência térmica de bolores e leveduras para alimentos de alta acidez que, conforme Stumbo (1973), são $D_{65,6^{\circ}\text{C}} = 0,5 - 1,0\text{min}$ e $z = 8 - 10^{\circ}\text{C}$. Ou seja, foram assumidos os valores $D_{65,6^{\circ}\text{C}} = 1,0\text{min}$ e $z = 10^{\circ}\text{C}$;
- ▶ O número inicial de microrganismos na bebida (N_0) e de sobreviventes após a pasteurização (N) assumidos foram 10^6 e 10^0UFC/ml , respectivamente, como sugerido por Leitão (1999).

Aplicando as equações das curvas de destruição térmica $F=(\log N_0 - \log N)D$, onde F representa o tempo de aquecimento a uma dada temperatura, e de tempo de destruição térmica $D_1=D_2 \cdot 10^{(T_2 - T_1)/z}$, alguns binômios, equivalentes, foram calculados: $65,6^{\circ}\text{C}/6\text{min}$, $78^{\circ}\text{C}/21\text{seg}$, $80^{\circ}\text{C}/13\text{seg}$, $85^{\circ}\text{C}/5\text{seg}$.

As características do trocador de calor utilizado e a busca por um tratamento térmico menos agressivo às qualidades nutricional e sensorial do produto justificaram a escolha da condição de tratamento igual a $85^{\circ}\text{C}/5\text{seg}$.

3.2.5. Elaboração e processamento em escala piloto

A elaboração, pasteurização da bebida e assepsia das embalagens foram conduzidos na planta piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp, conforme o diagrama de fluxo representado pela *Figura 14*.

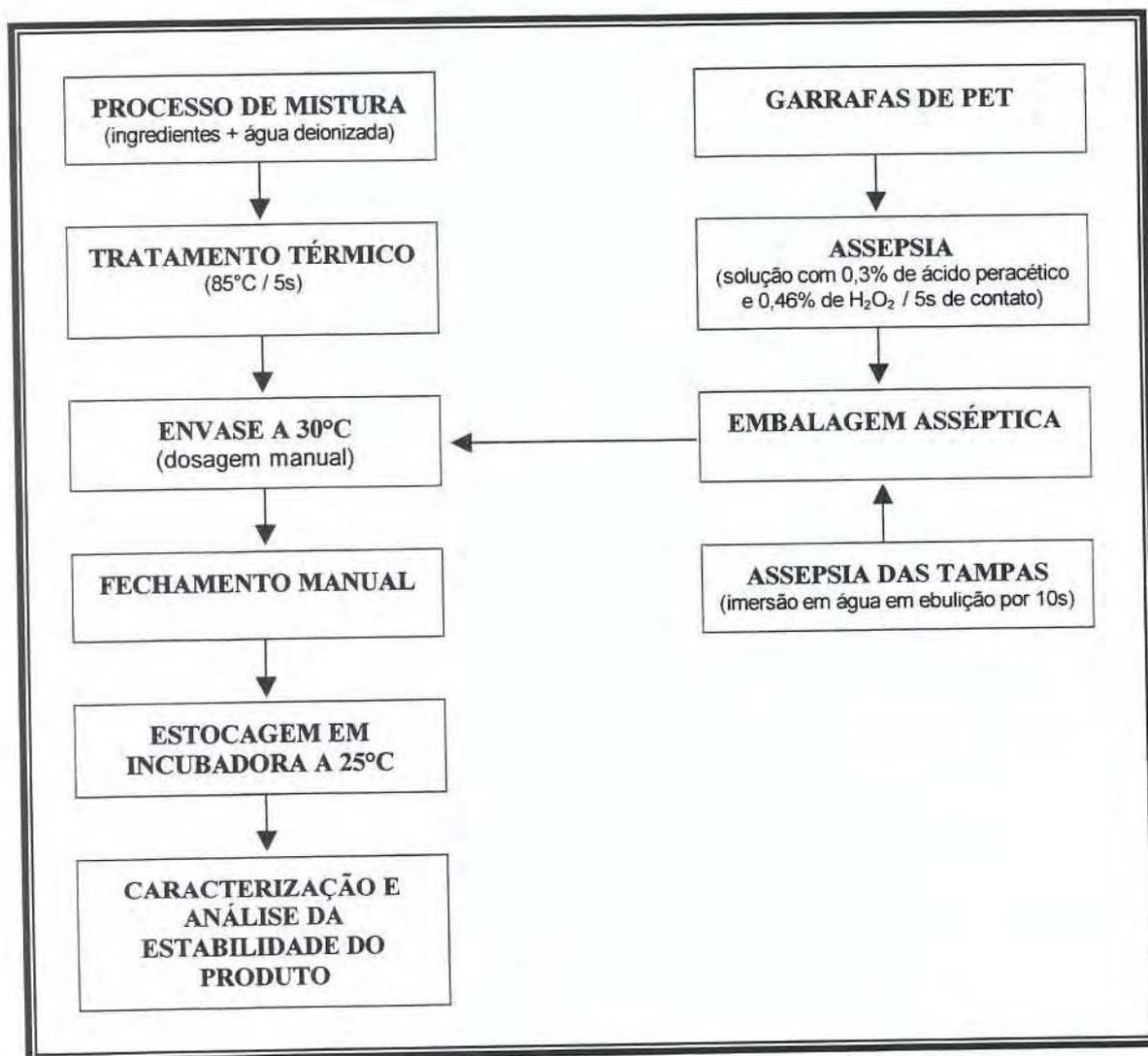


FIGURA 14 - Diagrama de fluxo de processamento e envase da bebida isotônica.

3.2.5.1. Preparação da bebida

Os lotes da bebida isotônica foram preparados em batelada por dissolução dos ingredientes em água deionizada e agitação manual em um tanque de aço inoxidável com capacidade para 100l. Foram preparados três lotes de 80 litros, contendo cada lote diferentes níveis de sorbato de potássio: 0, 50 e 100 mg/l; sendo o último, o nível máximo permitido pela legislação brasileira para refrescos e refrigerantes, já que não foram encontradas referências para a categoria de

isotônicos. De acordo com Sofos (1989), 100 mg/l de sorbato é um nível que não apresenta efeitos adversos na qualidade sensorial de alimentos e bebidas. Depois de homogeneizado, o produto foi bombeado ao trocador de calor para pasteurização. Os lotes foram identificados da seguinte maneira:

- Lote 1 - 100 mg/l de sorbato;
- Lote 2 - 50 mg/l de sorbato;
- Lote 3 - 0 mg/l de sorbato.

3.2.5.2. Pasteurização

A bebida isotônica foi pasteurizada em trocador de calor a placas Micro Plak. Como descrito, o binômio calculado e aplicado foi 85°C/5seg. O produto pasteurizado foi armazenado em um tanque de aço inoxidável fechado durante um tempo aproximado de 30 minutos e envasado manualmente em garrafas de PET de 500ml sanificadas com solução de Proxitane 1512®. Os parâmetros aplicados no processamento térmico da bebida foram os seguintes:

- Temperatura de entrada do produto: 27°C;
- Temperatura de pasteurização: 85°C;
- Tempo de retenção: 5 segundos;
- Temperatura de saída do produto: 36°C;
- Vazão do equipamento: 130 l/h;
- Capacidade de regeneração do trocador de calor : 84,5%.

3.2.6. Assepsia das embalagens em escala piloto

As garrafas plásticas foram sanificadas e enxaguadas por aspersão, utilizando-se o sistema de sanificação desenvolvido por Faria (1999), conforme Figuras 8, 9 e 10. Foi utilizado uma solução sanificante contendo 0,30% de ácido peracético e 0,46% de H₂O₂ preparada com Proxitane 1512®, com base nos testes microbiológicos, já mencionados. As tampas foram esterilizadas por imersão em água fervente durante 10 segundos. A solução sanificante foi recirculada pelo

sistema durante 40 minutos, aproximadamente, e as concentrações de ácido peracético e de peróxido de hidrogênio na solução foram monitoradas antes (após a preparação) e ao final do processo.

A água utilizada no enxágüe final das garrafas foi filtrada e fervida em tanque de aço inoxidável encamisado e conduzida a um trocador de calor em serpentina utilizando água a temperatura ambiente como meio de resfriamento. A assepsia das embalagens foi realizada nas seguintes condições:

- Temperatura média da solução sanificante: 30°C;
- Temperatura média da água de enxágüe: 50°C;
- Tempo de sanificação: 5 segundos;
- Tempo de enxágüe: 7 segundos, para garantir a remoção do odor acético das embalagens produzido pelo sanificante.

3.2.6.1. Validação do sistema de assepsia

Para avaliar o desempenho do sistema de sanificação e enxágüe foram feitos testes, previamente, com as embalagens, simulando as operações desenvolvidas durante o processamento nas mesmas condições citadas no item anterior. Amostras das garrafas foram analisadas antes e após a sanificação para verificação do sistema, utilizando a metodologia da solução de enxágüe, anteriormente descrita.

3.2.6.2. Monitoramento das concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio na solução sanificante

As concentrações dos ingredientes ativos na solução sanificante foram verificadas antes e após a sanificação das embalagens. As concentrações de peróxido de hidrogênio e ácido peracético foram determinadas através de titulação com soluções de permanganato de potássio 0,5N e tiosulfato de sódio 0,1N padronizadas, respectivamente.

3.2.7. Monitoramento do ar na planta piloto

A qualidade do ar na planta foi monitorada em pontos estratégicos durante os três dias de processamento, utilizando-se o equipamento MAS-100/MERCK. De acordo com o fabricante, o equipamento é um tipo de compactador baseado no princípio de aspiração de ar através de uma placa perfurada. A corrente de ar resultante, que contém partículas, é dirigida à superfície de uma placa de *petri* padrão com diâmetro de 90 mm. O sistema opera com um dispositivo de sucção de alto desempenho com monitoramento contínuo do fluxo de ar a 100l/min.

Terminada a aspiração de ar, a placa foi incubada, as colônias foram contadas e convertidas em unidades formadoras de colônia por metro cúbico (UFC/m³ de ar), utilizando a tabela apresentada no *Anexo III*. Foram monitoradas as áreas próximas ao tanque de assepsia de garrafas, preparação do produto e trocador de calor e envase. Em cada área foram utilizadas placas com PCA, ágar padrão para contagem de aeróbios mesófilos e PDA, para bolores e leveduras.

3.2.8. Limpeza e sanificação dos equipamentos

Ao final de cada processamento, os equipamentos foram limpos e, somente sanificados imediatamente antes do processamento seguinte. As conexões foram higienizadas manualmente utilizando detergente e imersão em solução sanificante. Toda a água utilizada na planta de processamento foi tratada e filtrada. O programa de limpeza e sanificação dos equipamentos adotado, baseado em Andrade & Macêdo (1994), foi o seguinte:

- Pré-lavagem com água à temperatura ambiente para remoção dos resíduos do produto;
- Circulação de solução detergente alcalina (NaOH) 1% a 50°C durante 30 minutos para remoção de carboidratos;
- Enxágüe;
- Limpeza com HNO₃ 3%;

- Enxágüe com água para remoção de resíduos do detergente da superfície;
- Sanificação com solução de Vortexx[®] 0,3% a temperatura ambiente;
- Enxágüe final.

3.2.9. Caracterização físico-química da bebida isotônica

As análises físico-químicas dos 3 lotes da bebida, citadas a seguir, foram realizadas com 2, 16 e 26 semanas de estocagem a 25°C:

- Potencial de hidrogênio (pH);
- Sólidos solúveis totais (°Brix), medido por refratometria;
- Acidez total titulável (ATT) determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N padronizada;
- Ácido ascórbico, titulado com diclorofenolindofenol;
- Osmolalidade em osmômetro de pressão de vapor, realizada apenas durante o desenvolvimento da formulação isotônica.

3.2.10. Avaliação da estabilidade microbiológica

Ao final de cada processamento, os lotes da bebida foram incubados à temperatura constante de 25°C, reconhecida como dentro da faixa ótima para desenvolvimento de bolores e leveduras (Pelczar, 1980), microflora principal presente no produto. Segundo Curiale (1991), temperaturas próximas a 24°C são utilizadas em estudos que visam estocagem à temperatura ambiente.

Três unidades de cada lote foram retiradas, aleatoriamente, para análises microbiológicas realizadas no dia seguinte ao processamento, com 2, 4, 8, 16 e 26 semanas de armazenagem. Como indicadores da estabilidade do produto foram feitas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em profundidade e bolores e leveduras em superfície. Os meios de cultivo utilizados foram, respectivamente, ágar padrão para contagem (PCA) com incubação a 35°C/48h e ágar batata dextrose (PDA) suplementado com cloranfenicol com incubação a 25°C/5dias.

A Portaria 451 do Ministério da Saúde estabelece situações e convenções microbiológicas para avaliação de alimentos para os quais não existem padrões específicos, como as bebidas isotônicas. Para atender às exigências legais vigentes, foram feitas pesquisas de *Salmonella*, *S. aureus*, *B. cereus*, Clostrídios sulfito redutores e Coliformes fecais ao final do experimento, mesmo considerando que a elevada acidez do produto não oferece condições para o desenvolvimento da microflora acima citada.

3.2.10.1. Plano de amostragem para análise microbiológica

A definição do plano de amostragem para análise microbiológica dos lotes obedeceu os seguintes critérios, baseado em SENAI/SEBRAE (1999):

- Foi adotado um plano de duas classes, separando a qualidade da amostra em apenas dois níveis: aceitável e não aceitável, com $n=3$, onde n é o número de unidades amostrais ou garrafas analisadas;
- Os tipos de microrganismos analisados foram mesófilos aeróbios e bolores e leveduras;
- Como metodologia de análise foram realizadas contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos em profundidade e bolores e leveduras em superfície.

Os limites que definiram a conformidade do produto, proposto por Leitão (1999), foram:

- Contagem padrão: $\leq 10^5$ UFC/ml;
- Bolores e leveduras: $\leq 10^3$ UFC/ml.

3.2.11. Teste de aceitação sensorial

Amostras do lote sem conservador químico foram analisadas com 2, 16 e 26 semanas de estocagem a 25°C, por um painel de 50 provadores não treinados,

que avaliou o grau de aceitação do produto quanto ao sabor e aparência. As amostras foram servidas aos provadores em copos plásticos de 50ml a uma temperatura média de 9°C. Os testes foram realizados em cabines individuais iluminadas com luz branca utilizando-se uma escala hedônica verbal de nove pontos, conforme Chaves (1993). A ficha para avaliação sensorial apresentada aos provadores é mostrada no *Anexo IV*.

3.2.12. Análise estatística dos resultados

Os dados referentes às análises físico-químicas dos três lotes de bebida isotônica pasteurizada foram tratados estatisticamente para verificar a existência ou não de diferença significativa entre as médias das determinações de pH, acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis (°Brix) e ácido ascórbico, com 2, 16 e 26 semanas de armazenagem. A diferença estatística entre as médias, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), foi determinada pelo teste de Tuckey. As análises estatísticas foram realizadas em microcomputador, utilizando-se o programa STATISTICA® versão 6.0. A mesma metodologia foi aplicada para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos testes de aceitação sensorial para o lote 3 (sem conservador), também analisados com 2, 16 e 26 semanas de estocagem. Neste caso, foi utilizado o programa estatístico SAS, versão 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DO AGENTE QUÍMICO USADO NA ASSEPSIA DAS EMBALAGENS

Os critérios adotados na seleção do agente sanificante foram fundamentados em testes microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. Estes testes foram realizados com embalagens sanificadas por imersão, visto que o sistema de assepsia de garrafas por *spray*, posteriormente utilizado na planta piloto, encontrava-se em fase de desenvolvimento. Era de se esperar uma eficiência de processo superior para o sistema de sanificação por *spray*; já que, à ação química do sanificante seria associado o efeito mecânico do jato a alta pressão; apesar desta hipótese não ter sido verificada.

4.1.1. Avaliação do desempenho dos sanificantes químicos

A avaliação do desempenho do sanificante foi necessária para verificar sua eficiência quando em contato com o material a ser sanificado. É sabido que cada método de sanificação requer seu próprio procedimento de análise. No caso de sanificantes líquidos, os microrganismos utilizados em testes de suspensão incluem, normalmente, bactérias esporuladas das espécies *Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes* (Block, 1992). Entretanto, de acordo com Denny *et al* (1979), os testes com microrganismos podem diferir conforme o sanificante utilizado já que, a resistência dos mesmos aos agentes químicos é bastante variável.

No presente trabalho, foi utilizada uma cultura pura de *Enterobacter aerogenes*, bactéria não esporulada pertencente ao grupo dos coliformes. Testes desafio para avaliar a resistência de microrganismos foram citados por Chambers & Nelson (1993) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido peracético considerados pelos autores como os agentes mais comumente utilizados na assepsia de embalagens.

A necessidade de detectar diferenças sutis na eficiência do sanificante foi essencial para selecionar o melhor agente químico. Para atingir este objetivo, dois desafios tiveram de ser solucionados. Primeiro, a superfície das garrafas teria que ser inoculada uniformemente, antes de se aplicar a técnica de desinfecção. Segundo, a inoculação teria que ser em um nível alto para que as diferenças entre os sanificantes pudessem ser evidenciadas.

4.1.1.1. Testes desafio

Muitos sistemas assépticos utilizam elevadas concentrações de H_2O_2 , variando de 25 a 35%, para esterilização de embalagens, sendo o mesmo normalmente aplicado a temperaturas superiores à ambiente (Leaper, 1984). Embora o peróxido de hidrogênio tenha um rápido poder de destruição e se decomponha em água e oxigênio, há restrições com relação ao seu uso, por ser classificado como uma substância perigosa (Perkin, 1982 citado por Chambers & Nelson, 1993). Um microrganismo bastante utilizado nos testes com peróxido de hidrogênio é o *Bacillus subtilis*, que tem se mostrado o mais resistente à inativação em soluções aquosas de H_2O_2 , quando comparado a outros microrganismos (Wang & Toledo, 1986).

A Tabela 7 mostra o desempenho da solução de H_2O_2 a 35%, testada na forma comercial, à temperatura ambiente. Foi verificado que, mesmo para um tempo de exposição bastante reduzido, a solução atingiu um número de reduções logarítmicas bastante elevado.

TABELA 7 - Avaliação do desempenho do Asepticper[®] na sanificação de garrafas plásticas contaminadas com células de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 a 24°C.

SANIFICANTE QUÍMICO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (segundos)	CONTAGEM MICROBIANA *		REDUÇÃO LOGARÍTMICA
		contaminação inicial (N ₀)	número de sobreviventes (N)	log(N ₀ /N)
Asepticper [®] (H ₂ O ₂ 35% p/p)	3	3,6x10 ⁷	< 2,0 x10 ¹	> 6,3

* resultado expresso como média de três repetições.

Wang & Toledo (1986) relataram, no entanto, que o efeito microbicida do peróxido de hidrogênio na fase líquida e à temperatura ambiente é reduzido em tempos de contato curtos. O grau de inativação microbiana desejado é obtido quando o peróxido líquido é vaporizado no material de embalagem durante o aquecimento. Porém, a geometria da embalagem também define o sistema de desinfecção, a fim de se obter a máxima eficiência. Para garrafas, a utilização do sanificante na fase líquida parece mais adequado, devido à sua maior facilidade de contato com a superfície.

Estudos comparativos entre peróxido de hidrogênio a 30% e baixas concentrações de ácido peracético, entre 0,3 e 1%, revelaram o seu efeito esporicida a temperatura ambiente. O peróxido de hidrogênio teve pequeno efeito em esporos de *B. subtilis var niger* (ATCC 9372), ao passo que soluções de ácido peracético apresentaram considerável atividade esporicida (Han *et al*, 1980 citado por Leaper, 1984). Alasri *et al* (1993) também investigaram as propriedades esporicidas do peróxido de hidrogênio e ácido peracético individualmente e combinados em solução, frente à várias espécies de *Bacillus*. O ácido peracético apresentou uma excelente atividade antimicrobiana. A combinação entre os dois agentes sanificantes revelou uma ação sinérgica, permitindo a redução da sua

concentração de uso de duas a oito vezes quando comparado àquela dos biocidas individualmente.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos a partir dos testes feitos com soluções de Proxitane 1512[®], preparadas com diferentes concentrações de ácido peracético e H₂O₂, em dois tempos de exposição a 23°C. Como mencionado anteriormente, o Proxitane[®] representa uma mistura estabilizada de peróxido de hidrogênio e ácido peracético. Foi verificado que, para 3 segundos de contato, as soluções preparadas com concentrações de 0,3, 0,5 e 1,0% de ácido peracético atingiram valores superiores a 4,9 reduções logarítmicas no número de células. Uma eficiência inferior foi observada quando se utilizou a concentração de 0,1% de ácido peracético durante dez segundos de contato.

TABELA 8 - Avaliação do desempenho do Proxitane 1512[®] na sanificação de garrafas contaminadas com células de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 a 23°C.

% (v/v) DOS INGREDIENTES ATIVOS NA SOLUÇÃO		TEMPO DE EXPOSIÇÃO (segundos)	CONTAGEM MICROBIANA* (UFC/garrafa)		REDUÇÃO LOGARÍTMICA
H ₂ O ₂	ácido peracético		contaminação inicial (N ₀)	número de sobreviventes (N)	log(N ₀ /N)
1,53	1,0	3	1,5x10 ⁶	< 2,0x10 ¹	> 4,9
0,77	0,5	3	1,5x10 ⁷	< 2,0x10 ¹	> 5,9
0,46	0,3	3	2,6x10 ⁶	< 2,0x10 ¹	> 5,1
0,15	0,1	10	1,1x10 ⁶	1,1x10 ²	4,0

* resultado expresso como média de três repetições.

De acordo com Chambers & Nelson (1993), o ácido peracético é removido mais rapidamente de superfícies de polietileno que o H_2O_2 e que aquele pode ser útil para assepsia de materiais de embalagem sensíveis a altas temperaturas.

Rammert (1996) sugere o uso de ácido peroxiacético, contendo 4,5% de ácido peracético e 28% de peróxido de hidrogênio, que se decompõe em água e ácido acético evitando, assim, a poluição na água residual. Durante o processo de desinfecção, a solução sanificante é coletada e reutilizada. Enxaguando as garrafas com água estéril em abundância, a concentração residual é reduzida aliado ao efeito de limpeza mecânico.

As concentrações do produto Vortexx[®] nas soluções sanificantes preparadas foram definidas com base nos limites superior e inferior propostos pelo fabricante em operações de sanificação, que foram 0,30 e 0,13% do produto na forma comercial. Os resultados da *Tabela 9* mostram o desempenho do sanificante, não tendo sido observada, praticamente, diferença entre as duas concentrações testadas para os mesmos tempos de exposição a 25°C.

TABELA 9 - Avaliação do desempenho do Vortexx[®] na sanificação de garrafas contaminadas com células de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 a 25°C.

% (v/v) DOS INGREDIENTES ATIVOS NA SOLUÇÃO		TEMPO DE EXPOSIÇÃO (segundos)	CONTAGEM MICROBIANA* (UFC/garrafa)		REDUÇÃO LOGARÍTMICA
H_2O_2	ácido peracético		contaminação inicial (N_0)	número de sobreviventes (N)	$\log(N_0/N)$
0,009	0,006	10	$1,1 \times 10^6$	$5,0 \times 10^3$	2,3
0,021	0,014	10	$1,3 \times 10^6$	$4,8 \times 10^3$	2,4

* resultado expresso como média de três repetições.

O desempenho do sanificante, nas condições de teste, foi considerado insatisfatório devido a baixa redução atingida no processo de sanificação, baseado em Von Bockelmann (1988), que recomenda o alcance de 4 a 6 reduções logarítmicas no número de esporos bacterianos.

Leaper (1984) realizou testes com concentrações inferiores de ácido peracético; no entanto, não foi mencionada a presença de H₂O₂ na composição da solução sanificante. Nos estudos com esporos de *B.subtilis* SA22, na presença de 0,08% (v/v) de ácido peracético, foi verificado valores D variando de 19,9 a 47,2 minutos dependendo do meio usado na produção dos esporos.

A concentração de ácido peracético necessária para atingir 5 reduções logarítmicas em uma suspensão de bacteriófagos, durante 5 minutos de contato à temperatura ambiente, foi determinada por Langeveld *et al* (1996). Para um dos tipos de fagos estudados, 0,006% de ácido peracético foi suficiente para atingir 6 reduções logarítmicas no número de células durante cinco minutos de contato. A mesma redução foi atingida para outro tipo de fago durante 1 minuto.

Testes realizados por Baldry (1983), compararam as propriedades antimicrobianas de soluções de ácido peracético e peróxido de hidrogênio. O ácido peracético apresentou excelente desempenho, especialmente em condições ácidas. Reduções logarítmicas da ordem de 10⁶ no número de células bacterianas vegetativas foram atingidas em 1 minuto de contato, usando solução de ácido peracético com concentração de 0,01%. O peróxido de hidrogênio foi mais efetivo como esporicida do que como bactericida.

Jones *et al* (1991) avaliaram a sensibilidade de células vegetativas de *Saccharomyces cerevisiae* a 20°C. As concentrações de ácido peracético utilizadas foram 0,0025; 0,01 e 0,04% e o número de reduções logarítmicas atingidas após cinco minutos de contato em testes de suspensão foram 2,6; 3,0 e > 5,8, respectivamente. De acordo com Block (1992), vários experimentos têm mostrado que o ácido peracético é um agente esporicida mais potente que o peróxido de hidrogênio e outros agentes químicos, mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,05%.

A ação esporicida do ácido peracético foi verificada por Marquis *et al* (1995). Em seu estudo também foram feitos testes com células vegetativas a 25°C. Como era de se esperar, os esporos foram mais resistentes comparado a células vegetativas. Também foi constatado que a ação esporicida do ácido peracético é muito menos afetada por variações de temperatura do que o peróxido de hidrogênio.

Em testes feitos com microbiota de água, Alasri *et al* (1992) constataram a excelente atividade antimicrobiana do ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Em seu trabalho foram observadas mais de 5 reduções logarítmicas no número de bactérias totais após 1h de tratamento com solução contendo 3 mg/l de ácido peracético.

Os álcoois mais empregados em desinfecção são o etanol e o isopropanol, sendo o primeiro o mais usado, em função de sua disponibilidade e baixo custo. Apresentam atividade rápida sobre as bactérias na forma vegetativa como os cocos Gram-positivos, enterobactérias e bactérias Gram-negativas, atuando, também, sobre *Mycobacterim tuberculosis*, alguns fungos e vírus lipofílicos (Hugo & Russel, 1982; Rutala, 1987 e 1990).

A *Tabela 10* mostra os resultados obtidos na avaliação do desempenho da solução de etanol a 70% em tempos de contato variando de 10 a 40 segundos, sendo a maior eficácia do sanificante observada em tempos superiores a 20 segundos.

TABELA 10 - Avaliação do desempenho do etanol 70%(v/v) na sanificação de garrafas plásticas contaminadas com células de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 a 24°C.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO (segundos)	CONTAGEM MICROBIANA*	REDUÇÃO LOGARÍTMICA log(N ₀ /N)
	(UFC/garrafa)	
NÚMERO DE SOBREVIVENTES (N)		
10	6,0x10 ²	3,3
20	3,2x10 ¹	4,5
30	1,1x10 ¹	5,0
40	8,0x10 ⁰	5,1

* resultado expresso como média de três repetições.

A contaminação inicial (N₀) quantificada nas embalagens foi igual a 1,1x10⁶ UFC/garrafa.

Na literatura consultada não foi mencionada a utilização de solução aquosa de etanol a 70% em processos de sanificação ou esterilização de embalagens destinadas ao acondicionamento de alimentos. Entretanto, alguns estudos preconizam a utilização de concentrações inferiores de álcoois primários combinados com outros agentes sanificantes.

Nos estudos realizados por Leaper (1984), com esporos de *B. subtilis* SA22 na presença de 0,08% (v/v) de ácido peracético foi verificado valores D variando de 19,9 a 47,2 min dependendo do meio usado na produção dos esporos. Quando misturados com 9,9% (v/v) de álcoois primários o valor D variou de 0,7 a 17,3 min, também dependendo do meio usado para o desenvolvimento dos esporos, mostrando que o ácido peracético em combinação com pequenos níveis de álcool é bastante eficaz.

Garrafas expostas à contaminação natural do ambiente de estocagem foram sanificadas com os agentes anteriormente testados. As embalagens foram expostas aos sanificantes durante 5 e 10 segundos à temperatura média de 24°C. As concentrações escolhidas basearam-se nos resultados dos testes anteriores;

ou seja, foram selecionadas aquelas que tiveram um desempenho mais satisfatório em tempos de contato reduzidos.

Como mostra a *Tabela 11*, o desempenho dos sanificantes frente à contaminação natural das embalagens foi bastante semelhante. Dentre os microrganismos sobreviventes, notou-se uma predominância de fungos em todas as garrafas analisadas após o processo de sanificação, sugerindo sua maior resistência à ação química comparada às células bacterianas, como também a predominância de esporos de bolores no ar conforme o artigo *Salas limpas...* (1999).

TABELA 11 - Desempenho de agentes químicos na sanificação de garrafas plásticas a 24°C / 5 segundos de exposição.

SANIFICANTE QUÍMICO	% DOS INGREDIENTES ATIVOS NA SOLUÇÃO		CONTAGEM MICROBIANA* (UFC/garrafa)
	H ₂ O ₂	ácido peracético	número de sobreviventes (N)
Asepticper [®]	35	–	2,3
Proxitane [®]	0,46	0,3	3,0
Vortexx [®] 0,3%	0,021	0,014	3,0
Etanol 70%	–	–	2,3

* resultado expresso como média de três repetições.
a contaminação inicial (N₀) quantificada nas embalagens foi igual a 2,1x10² UFC/garrafa.

A *Tabela 12* mostra que para 10 segundos de contato todos os sanificantes foram, de forma similar, eficientes. O número de microrganismos nas garrafas foi reduzido a valores próximos a zero pela ação sanificante; embora a contagem inicial de células tenha sido inferior quando comparado à apresentada na *Tabela 11*. Isso evidencia a desuniformidade da contaminação presente nas garrafas expostas ao ambiente; fato também observado por Roland (1996). Neste caso, a

contaminação inicial quantificada está de acordo com Chevroton (1996); ou seja, menos que 20UFC/garrafa.

TABELA 12 - Desempenho de agentes químicos na sanificação de garrafas plásticas a 24°C / 10 segundos de exposição.

SANIFICANTE QUÍMICO	% DOS INGREDIENTES ATIVOS NA SOLUÇÃO		CONTAGEM MICROBIANA* (UFC/garrafa)
	H ₂ O ₂	ácido peracético	número de sobreviventes (N)
Asepticper [®]	35	–	0
Etanol 70%	–	–	0,3
Proxitane 1512 [®]	0,46	0,3	0,7
Vortexx [®] 0,3%	0,021	0,014	0,3

* resultado expresso como média de três repetições a contaminação inicial (N₀) quantificada nas embalagens foi igual a 1,9x10¹UFC/garrafa

Uma importante consideração relativa aos dados apresentados nas *Tabelas 11 e 12* se refere à dificuldade em se discutir a eficácia de sanificantes partindo de populações iniciais muito baixas, ou seja, 10¹ – 10² UFC/garrafa.

Como apresentado nas *Tabelas 11 e 12*, valores $\leq 2,1 \times 10^2$ UFC/garrafa foram verificados em embalagens antes da exposição a qualquer processo de limpeza ou sanificação. Para embalagens destinadas a uma linha de enchimento asséptico, Chevroton (1996) recomenda que a contaminação inicial das garrafas seja controlada, sendo menos que 20UFC/garrafa.

As concentrações dos sanificantes químicos, enquadradas dentro dos limites propostos para aplicação na esterilização de materiais de embalagem, de acordo com os diversos artigos revisados, foram testadas e escolhidas visando o alcance de tempos de exposição reduzidos e elevada destruição da carga microbiana inoculada ou naturalmente presente na embalagem. A necessidade de

tempos de contato reduzidos se fundamenta na agilidade dos processos industriais de sanificação de embalagens atualmente praticados, o que pode ser confirmado por Grimm (1998). De acordo com o autor, em linhas de enchimento asséptico para bebidas de alta acidez é desejável taxas de destruição de microrganismos extremamente elevadas dentro de períodos de tratamento curtos, variando de 8 a 12 segundos. De acordo com Rammert (1996), em testes conduzidos em laboratório foram atingidas até 5 reduções logarítmicas na contagem de conidiosporos de bolores num período de 7,5 segundos, incluindo as operações de sanificação e enxágüe das garrafas. Os conidiosporos, segundo o mesmo autor, são os mais resistentes em bebidas de alta acidez, sendo as taxas de redução para leveduras e bactérias ainda superiores. Também foi constatado que o efeito mecânico do enxágüe, por si só, podia atingir até 3 reduções logarítmicas.

Segundo Andrade & Macêdo (1994), consideram-se eficientes os sanificantes que eliminam 99,999% (atingem 5 reduções decimais) das células em 30 segundos de contato a 20°C, em testes de suspensão.

A interpretação dos resultados obtidos neste estudo deve considerar, primariamente, a utilização de células bacterianas vegetativas. Testes com fungos ou outros microrganismos formadores de esporos certamente apresentariam resultados distintos, como indicam as pesquisas conduzidas por Alasri *et al* (1993) e outros autores citados. A maioria dos experimentos realizados nos artigos revisados utiliza microrganismos esporulados em testes desafio para avaliação de agentes químicos de sanificação. Entretanto, os testes realizados neste trabalho indicam a eficiência relativa entre os sanificantes químicos nas respectivas concentrações empregadas frente à células vegetativas, representando um referencial para os processos de sanificação de garrafas plásticas.

Verificação da concentração dos princípios ativos nos produtos sanificantes comerciais

A concentração dos princípios ativos na solução sanificante foi determinada por análise volumétrica e os resultados obtidos para o produto Vortexx[®] encontram-se na *Tabela 13*. As concentrações de peróxido de hidrogênio e ácido peracético determinadas encontram-se dentro das faixas previstas, estando em conformidade com as informações apresentadas nos rótulos das embalagens.

TABELA 13 - Concentrações dos ingredientes ativos no Vortexx[®].

INGREDIENTE ATIVO	CONCENTRAÇÃO NOMINAL (%)	CONCENTRAÇÃO DETERMINADA (%)
peróxido de hidrogênio	5,5 – 8,3	6,1
ácido peracético	3,8 – 5,6	4,7

Para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio no Asepticper[®] dois métodos foram empregados e os resultados são apresentados na *Tabela 14*. A concentração de peróxido de hidrogênio determinada pelos dois métodos foi bastante próxima à prevista, ou seja, a indicada no rótulo do produto.

TABELA 14 - Concentração de peróxido de hidrogênio no Asepticper[®].

MÉTODO	CONCENTRAÇÃO PREVISTA (%)	CONCENTRAÇÃO DETERMINADA (%)
volumetria	35	34,98
nomograma	35	35,5

Na *Tabela 15* estão indicadas as concentrações de peróxido de hidrogênio e ácido peracético determinadas no Proxitane 1512[®]. As concentrações dos

ingredientes ativos verificadas foram, novamente, bastante próximas às concentrações esperadas.

TABELA 15 - Concentração de peróxido de hidrogênio e ácido peracético no Proxitane 1512®.

INGREDIENTE ATIVO	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA PREVISTA (%)	CONCENTRAÇÃO DETERMINADA (%)
peróxido de hidrogênio	23,0	23,3
ácido peracético	15,0	15,6

4.1.2. Determinação de H₂O₂ residual nas embalagens

Com a finalidade de evitar problemas associados à saúde do consumidor e alterações sensoriais indesejáveis no alimento, é imperativo o controle da concentração residual de H₂O₂ nas embalagens. A FDA aprovou o uso de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 35% para esterilização de embalagens plásticas. Todavia, a eliminação dos resíduos do sanificante é tão importante quanto sua atividade microbicida na seleção do produto a ser usado em sistemas assépticos (Wang & Toledo, 1986).

O H₂O₂ é quimicamente bastante reativo, atacando os tecidos celulares e o DNA causando lesões (Manahan, 1992). Estudos realizados com ratos constataram a presença de câncer nos animais quando foi ingerida água com concentrações de peróxido de hidrogênio entre 0,1 e 0,4%, conforme Toyoda *et al* (1982). Do ponto de vista sensorial, o H₂O₂ interfere negativamente no sabor e aroma de alguns alimentos como aqueles ricos em vitamina C, especialmente os sucos cítricos. De acordo com os testes realizados por Petrus *et al* (1999), o residual de H₂O₂ presente em garrafas plásticas alterou negativamente o sabor de suco de laranja reconstituído, sendo claramente notado pelo painel sensorial, mesmo quando o produto foi acondicionado em embalagens sanificadas com enxágüe final.

A *Tabela 16* apresenta o nível residual de peróxido de hidrogênio determinado nas embalagens sanificadas por imersão, com e sem enxágüe final, pelo sistema de análise espectrofotométrica monossegmentado.

TABELA 16 - Níveis médios de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas garrafas sanificadas com e sem enxágüe final, obtidos pelo sistema espectrofotométrico monossegmentado.

AGENTE SANIFICANTE	H ₂ O ₂ NA SOLUÇÃO DE USO (%)	COM ENXÁGÜE FINAL (mg/l)	SEM ENXÁGÜE FINAL (mg/l)
Asepticper [®]	35	3,10	336
Proxitane 1512 [®]	0,46	< ld	5,61
Vortexx [®]	0,021	< ld	0,23

ld - limite de detecção do método (0,019mg/l)

Os limites de detecção e quantificação do método empregado são 0,019 e 0,063 ppm, respectivamente. Esses valores são bastante inferiores ao limite de residual de H₂O₂ permitido pela FDA, que é de 0,5 ppm, conforme Reuter (1993).

Tendo em vista o limite permitido pela FDA, os resultados da *Tabela 16* indicam que o enxágüe final poderia ser dispensado quando se utiliza o produto Vortexx[®], devido a baixa concentração residual de peróxido de hidrogênio na garrafa. Para o Proxitane 1512[®] e Asepticper[®], entretanto, fica evidente a necessidade do enxágüe final, sugerindo um maior rigor na operação quando o produto Asepticper[®] for utilizado.

4.1.3. Análise sensorial

Os testes sensoriais avaliaram o feito residual do sanificante no sabor da bebida isotônica acondicionada em garrafas sanificadas com e sem enxágüe final, como mostrado na *Tabela 17*. Esta análise, juntamente com os testes anteriormente discutidos, compuseram a base de escolha do sanificante indicando ou não a necessidade de enxágüe final das embalagens, já que a alteração sensorial do produto envasado causada pelo residual químico foi considerada indesejável. A concentração do produto Vortexx[®] escolhida foi a máxima recomendada pelo fabricante. Para o Proxitane 1512[®] foi selecionada a menor concentração cujo desempenho foi considerado satisfatório nos testes microbiológicos.

TABELA 17 - Número de seleções corretas das amostras de bebida isotônica acondicionadas em garrafas sanificadas com e sem enxágüe final obtidas no teste triangular.

SANIFICANTE	% DE H ₂ O ₂ NA SOLUÇÃO DE USO	% DE ÁCIDO PERACÉTICO NA SOLUÇÃO DE USO	SEM ENXÁGÜE FINAL	COM ENXÁGÜE FINAL
Etanol 70%	–	–	25 ^{***}	10 ^{ns}
Vortexx [®]	0,021	0,014	13 ^{ns}	8 ^{ns}
Asepticper [®]	35	–	15 [*]	7 ^{ns}
Proxitane 1512 [®]	0,46	0,3	11 ^{ns}	10 ^{ns}

número de julgamentos: 27

níveis de significância: ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns (não significativo)

Os resultados apresentados na *Tabela 17*, analisados através da tabela no *Anexo V*, mostram que os sanificantes Vortexx[®] e Proxitane 1512[®] dispensam o enxágüe final das garrafas após a operação de sanificação, já que não foi notada diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%. No entanto, um odor

residual acético foi percebido no momento da abertura das embalagens. Quando o etanol e Asepticper[®] foram utilizados, ficou evidente a necessidade de enxágue, já que houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 0,1 e 5%, respectivamente. Em garrafas com enxágue, não foi notada diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%, para todos os sanificantes testados.

4.2. DETERMINAÇÃO DO VALOR OSMÓTICO DA MISTURA ISOTÔNICA

A formulação da bebida foi ajustada para que se enquadrasse dentro dos limites de valor osmótico do plasma sanguíneo humano. Antes da determinação da osmolalidade da mistura foi construída uma curva padrão, mostrada na *Figura 15*, utilizando soluções de cloreto de sódio (NaCl) nas seguintes concentrações, expressas em osmolal: 0; 0,2224; 0,2979; 0,4183; 0,4855; 0,6151. A concentração osmolal ou osmolalidade de cada solução de NaCl foi calculada através da fórmula:

$$C_{\text{osmolal}} = (n_1/m_2) \times 2$$

Onde:

n_1 - número de moles do soluto (NaCl)

m_2 - massa do solvente em kg (H₂O)

2 - número de partículas ionizadas (Na⁺ / Cl⁻)

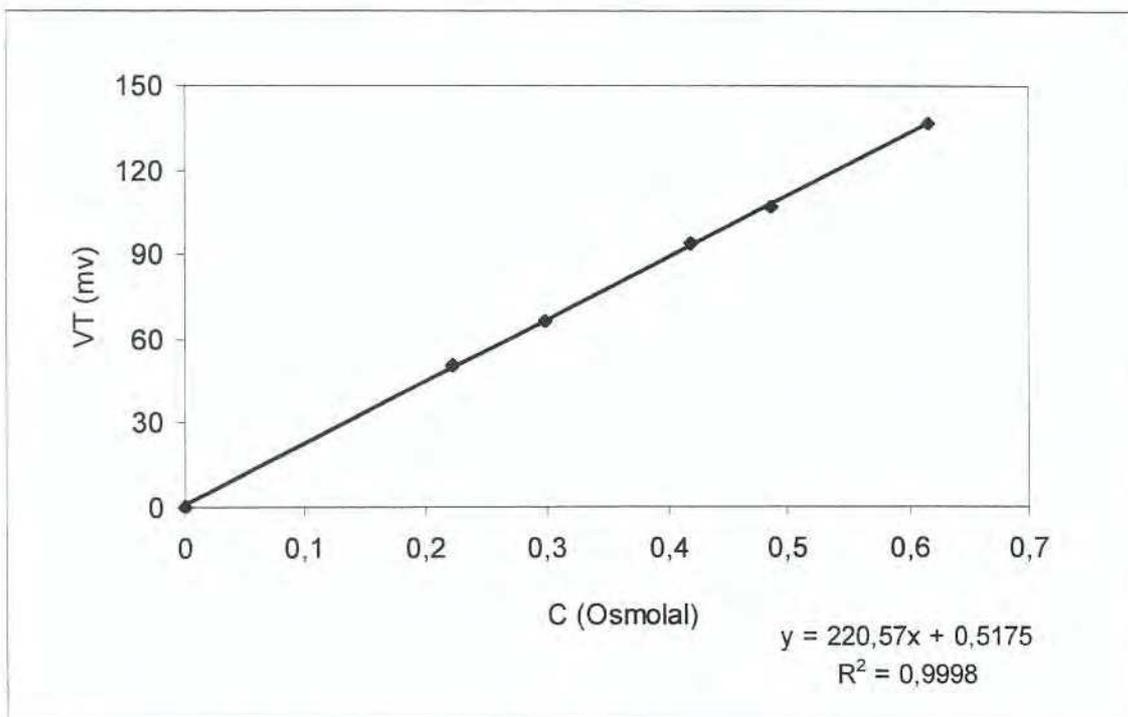


FIGURA 15 - Curva padrão para determinação do valor osmótico da bebida isotônica.

Para a formulação mostrada na *Tabela 6*, que apresenta a composição da mistura isotônica, a média das leituras do sinal elétrico (VT), em mvolt, detectado pelo equipamento foi igual a 63,7. Substituindo esse valor na equação de regressão da *Figura 15*, obteve-se 0,2865 Osmolal; dentro, portanto, da faixa do valor osmótico do plasma sanguíneo humano, que varia de 0,285 a 0,295 Osmolal, conforme citado por Srebernich (1998).

Da mesma forma, a determinação da osmolalidade da formulação sem adição de sorbato de potássio se manteve dentro da faixa do valor osmótico do plasma sanguíneo humano mencionada acima.

4.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA E ESPESSURA DAS GARRAFAS

A *Tabela 18* apresenta a massa e a espessura das garrafas de PET utilizadas no experimento.

TABELA 18 - Determinação da massa e espessura das garrafas utilizadas.

MASSA MÉDIA* (g)	desvio padrão	ESPESSURA (mm)		
		ombro	corpo	base
27,88	0,02	0,32-0,36	0,43-0,45	0,35-0,43

* média de cinco pesagens.

4.4. PROCESSAMENTO EM ESCALA PILOTO

4.4.1. Contagem de microrganismos no ar na planta piloto

As contagens de microrganismos no ar podem atingir até 10^4 UFC/m³, casos em que sua qualidade é considerada insatisfatória (Troller, 1993). Heldman (1974) verificou uma média de $2,8 \cdot 10^2$ UFC/m³ em plantas de embalagem de leite. Geralmente, as contagens de microrganismos no ar atingem 10^3 UFC/m³ durante um período normal de processamento. Kang & Frank (1989) sugerem padrões para contagem inferiores a $1,8 \cdot 10^3$ UFC/m³ em áreas limpas para acondicionamento asséptico.

A medida da poluição biológica é feita com dois critérios, um absoluto, outro relativo. O absoluto é o número de unidades formadoras de colônias de fungos por metro cúbico de ar ambiente (UFC/m³). O padrão relativo compara a qualidade dos ambientes fechados com o ar exterior. Para locais de trabalho, a Portaria que está sendo preparada pelo Ministério da Saúde tomará como referência um limite de $7,5 \cdot 10^2$ UFC/m³ de ar em ambiente climatizado (Qualidade do ar, 1999).

A Tabela 19 mostra os resultados da contagem de microrganismos no ar da planta piloto utilizada nesta pesquisa. Foram monitoradas três áreas, próximas ao sistema de assepsia de garrafas, tanque de preparação do produto e envase durante os três dias de processamento, sendo os três lotes processados em dias diferentes.

TABELA 19 - Contagens de microrganismos no ar da planta de processamento em escala piloto.

LOTE PROCESSADO	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS (UFC/m ³)			CONTAGEM TOTAL DE AERÓBIOS MESÓFILOS (UFC/m ³)		
	área (a)	área (b)	área (c)	área (a)	área (b)	área (c)
1	1,6x10 ³	1,4x10 ³	1,5x10 ³	3,2x10 ²	2,2x10 ²	2,1x10 ²
2	9,0x10 ²	4,8x10 ²	9,6x10 ³	2,5x10 ²	2,2x10 ²	7,9x10 ²
3	9,0x10 ²	3,2x10 ²	2,0x10 ²	2,5x10 ²	5,0x10 ¹	1,4x10 ²

Áreas próximas ao sistema de assepsia de garrafas (a), tanque de preparação do produto (b) e envase (c).

Os resultados obtidos mostram uma contaminação ambiente variável em função do local e dia de processamento, atingindo uma diferença de até 2,3 ciclos logarítmicos entre o número de microrganismos no ar. Alguns índices obtidos enquadram-se dentro dos limites propostos e permitidos para contaminação ambiente. Outros, entretanto, excedem esses limites, mencionados anteriormente.

4.4.2. Determinação da concentração dos ingredientes ativos na solução sanitizante utilizada na assepsia das embalagens em escala piloto

As concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio na solução sanitizante, preparada com Proxitane 1512[®] e utilizada na assepsia das garrafas em escala piloto, foram verificadas no início e no término do processo, que se

estendeu por 1,5h, aproximadamente. A solução foi coletada e reutilizada durante o processo de desinfecção, conforme relatado por Rammert (1996). A *Tabela 20* apresenta os dados obtidos através de análise volumétrica.

TABELA 20 - Concentração dos princípios ativos na solução de uso no início e término do processo de assepsia das embalagens.

INGREDIENTE ATIVO	CONCENTRAÇÃO INICIAL (após o preparo)		CONCENTRAÇÃO FINAL (término do processo)
	prevista (%)	determinada (%)	determinada (%)
H ₂ O ₂	0,46	0,48%	0,46
ácido peracético	0,30	0,31%	0,23

Os resultados mostram que a concentração de peróxido de hidrogênio na solução de uso se manteve, praticamente, constante durante o processo de desinfecção. A concentração de ácido peracético, em contrapartida, sofreu uma redução maior, possivelmente devido à sua decomposição em ácido acético e oxigênio, confirmando a baixa estabilidade da solução de uso, conforme mencionado por Leitão (1998). Isso sugere um monitoramento constante, acompanhado de reajuste na concentração da solução de uso, especialmente para processos de longa duração.

4.4.3. Validação do sistema de assepsia

Para verificar a contaminação inicial das embalagens e o desempenho do sistema de assepsia desenvolvido em escala piloto, as garrafas retiradas da unidade paletizada foram analisadas antes e após o processo. Os resultados das análises microbiológicas são apresentados na *Tabela 21*.

TABELA 21 - Quantificação da contaminação microbiológica nas garrafas antes e após o processo de assepsia.

SANIFICANTE QUÍMICO UTILIZADO	% DOS PRINCÍPIOS ATIVOS NA SOLUÇÃO		CONTAGEM TOTAL DE MESÓFILOS AERÓBIOS* (UFC/garrafa)	
	H ₂ O ₂	ácido peracético	contaminação inicial	número de sobreviventes
Proxitane®	0,46	0,3	1,3	0

* resultado expresso como média de três repetições.

Conforme sugerido por Chevroton (1996), a contaminação inicial quantificada nas embalagens foi reduzida, de acordo com o limite proposto que é < 20UFC/garrafa, recomendado para embalagens destinadas a uma linha de enchimento asséptico.

4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA BEBIDA ISOTÔNICA PASTEURIZADA

4.5.1. Análises físico-químicas

Três unidades de cada lote foram analisadas com 2, 16 e 26 semanas de estocagem a 25°C. Os resultados, expressos como média das três amostras, estão apresentados nas *Tabelas 22, 23, 24 e 25*. As médias dos resultados obtidos foram comparadas, separadamente para cada lote, para verificar a existência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras analisadas nos três períodos de estocagem.

As determinações de pH, cujas médias são apresentadas na *Tabela 22*, não indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas no início e fim do período de estocagem, para os três lotes da bebida. Foi notada uma elevação no valor de pH no período entre 2 e 16 semanas. Entretanto, as determinações feitas na 26^a semana foram próximas àquelas

realizadas no início da vida-de-prateleira, não diferindo entre si. Observou-se que os valores de pH foram superiores para os lotes que continham sorbato de potássio em sua composição.

TABELA 22 - Resultados das determinações de pH para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada.

PERÍODO DE ESTOCAGEM (semanas)	LOTE 1 (100mg/l de sorbato)		LOTE 2 (50mg/l de sorbato)		LOTE 3 (0mg/l de sorbato)	
	média	dp	média	dp	média	dp
2	3,38 ^a	0,012	3,38 ^a	0,010	3,22 ^a	0,006
16	3,48 ^b	0,010	3,48 ^b	0,040	3,37 ^b	0,046
26	3,39 ^a	0,026	3,42 ^{a,b}	0,010	3,27 ^a	0,006

médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

dp - desvio padrão.

O desenvolvimento de microrganismos em um meio pode resultar em alterações no valor do pH. Entretanto, como mostram os resultados das análises microbiológicas, apresentados a seguir, não foi observado crescimento microbiano em nenhum dos lotes analisados durante 26 semanas de vida-de-prateleira. Interações químicas entre os componentes da bebida ou a degradação de substâncias são hipóteses que poderiam justificar variações no pH durante a estocagem.

A *Tabela 23* mostra que, para o mesmo lote analisado, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos valores de sólidos solúveis (°Brix), determinadas no início e fim do estudo da vida-de-prateleira.

TABELA 23 - Resultados das determinações de sólidos solúveis (°Brix) para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada.

PERÍODO DE ESTOCAGEM (semanas)	LOTE 1 (100 mg/l de sorbato)		LOTE 2 (50mg/l de sorbato)		LOTE 3 (0mg/l de sorbato)	
	Média	dp	média	dp	média	dp
2	6,20 ^a	0,289	6,30 ^a	0,153	6,04 ^a	0,058
16	6,44 ^a	0,237	6,75 ^a	0,289	6,44 ^a	0,237
26	5,94 ^a	0,289	6,45 ^a	0,318	6,10 ^a	0,289

médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

dp - desvio padrão.

Para suco de laranja pasteurizado, Martin *et al* (1995) verificaram que não houve alteração significativa no teor de sólidos solúveis durante 6 meses de armazenamento.

Da mesma forma, para acidez total titulável (ATT), a *Tabela 24* indica que não houve diferença ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados obtidos, comparando-se as amostras de um mesmo lote com 2, 16 e 26 semanas de estocagem. Uma pequena variação na acidez da bebida foi verificada no lote 2, comparando-se os resultados obtidos no início e fim da estocagem, fato que pode ser atribuído à sensibilidade do método utilizado.

TABELA 24 - Resultados das determinações de acidez total titulável (ATT) para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada*.

PERÍODO DE ESTOCAGEM (semanas)	LOTE 1 (100mg/l de sorbato)		LOTE 2 (50mg/l de sorbato)		LOTE 3 (0mg/l de sorbato)	
	média	dp	média	dp	média	dp
2	0,090 ^a	0	0,080 ^a	0	0,080 ^a	0
16	0,087 ^a	0,006	0,083 ^{a,b}	0,006	0,080 ^a	0
26	0,091 ^a	0,002	0,090 ^b	0	0,084 ^a	0,003

*resultados expressos em gramas de ácido cítrico/100ml de amostra.
 médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).
 dp - desvio padrão.

Com exceção do lote 2, não foi observada alteração no nível de ácido cítrico presente na mistura isotônica. Os resultados da *Tabela 24* foram ligeiramente superiores à concentração do ácido adicionada na bebida, que foi 0,064g/100ml; diferença que também pode ser atribuída à sensibilidade do método de determinação.

A comparação entre os resultados obtidos na determinação da concentração de ácido ascórbico, para o mesmo lote, nos três períodos de estocagem, conforme a *Tabela 25*, mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, evidenciando a degradação de vitamina C ao longo do tempo.

TABELA 25 - Resultados das determinações de ácido ascórbico para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada*.

PERÍODO DE ESTOCAGEM (semanas)	LOTE 1 (100mg/l de sorbato)		LOTE 2 (50mg/l de sorbato)		LOTE 3 (0mg/l de sorbato)	
	média	dp	média	dp	média	dp
2	10,04 ^a	0,308	10,07 ^a	0,153	10,05 ^a	0,180
16	6,25 ^b	0,981	6,25 ^b	0,981	6,25 ^b	0,981
26	3,19 ^c	0	2,93 ^c	0,456	3,19 ^c	0,795

* resultados expressos em mg de ácido ascórbico/100ml de bebida. médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).
dp - desvio padrão.

Dentre as alterações físico-químicas ocorridas na bebida isotônica, a que apresentou maior intensidade foi a redução de vitamina C, atingindo 17% (12⇒10mg/100ml) durante a pasteurização e 70,7% (10⇒2,93mg/100ml), considerando o lote 2, durante 26 semanas de estocagem a 25°C, totalizando uma redução próxima a 76%, em relação a quantidade inicial (12mg/100ml) adicionada durante a elaboração da bebida.

De acordo com Faria (1990), o ácido ascórbico é um forte agente redutor, cuja principal perda ocorre por degradação química, que, por sua vez depende da concentração de sal e açúcar, atividade de água, pH, concentração de oxigênio e temperatura. Se o índice de qualidade considerado na vida-de-prateleira do produto for degradação de vitamina, 50% de perda nutricional é bem comum na maioria dos casos reais.

A vida-de-prateleira da bebida isotônica poderia ser estabelecida, eventualmente, em função da degradação de vitamina C, que às 16 semanas, atingiu 50% de redução em relação ao valor inicial adicionado, conforme a *Tabela 25*. Entretanto, como uma bebida isotônica não tem, primariamente, a pretensão de se apresentar como fonte de vitamina C, mas sim com repositores

hidroeletrólítico, essa perda não consistiria em fator crítico ou limitante da vida-de-prateleira do produto.

A degradação de vitamina C pode ser atribuída, principalmente, à presença de oxigênio dissolvido na bebida e no espaço livre da embalagem, o qual é rapidamente consumido durante a estocagem. Em um estudo do efeito de interação entre sucos cítricos e materiais plásticos da embalagem Miltz *et al* (1990) concluíram que a degradação de vitamina C ocorreu devido às reações oxidativas; o que pode ser justificado pela instabilidade da vitamina frente a disponibilidade de oxigênio no sistema de embalagem, como também pelo fato de que o PET, não é um polímero de alta barreira ao oxigênio.

A temperatura de armazenamento também influencia na degradação de ácido ascórbico. Mannheim & Havkin (1981) verificaram que sucos estocados a 4°C apresentaram menor perda de ácido ascórbico em relação aos que foram armazenados a 15 e 25°C.

4.5.2. Avaliação da estabilidade microbiológica

A estabilidade microbiológica da bebida isotônica foi avaliada durante 26 semanas de estocagem a 25°C, através da contagem de mesófilos aeróbios totais e bolores e leveduras. De cada lote foram retiradas três amostras para análise.

4.5.2.1. Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais

A *Figura 16* ilustra a evolução da contagem de mesófilos aeróbios totais para os três lotes da bebida isotônica pasteurizada e acondicionada em embalagens assépticas, em função do tempo de estocagem. Como as contagens foram muito reduzidas, o número de células, expresso em UFC/ml, foi apresentado em escala linear. Silva *et al* (1997) recomendam que a faixa de contagem seja entre 25 e 250 UFC/placa e se nenhuma placa atingir 25 colônias, os resultados devem ser apresentados como contagem estimada.

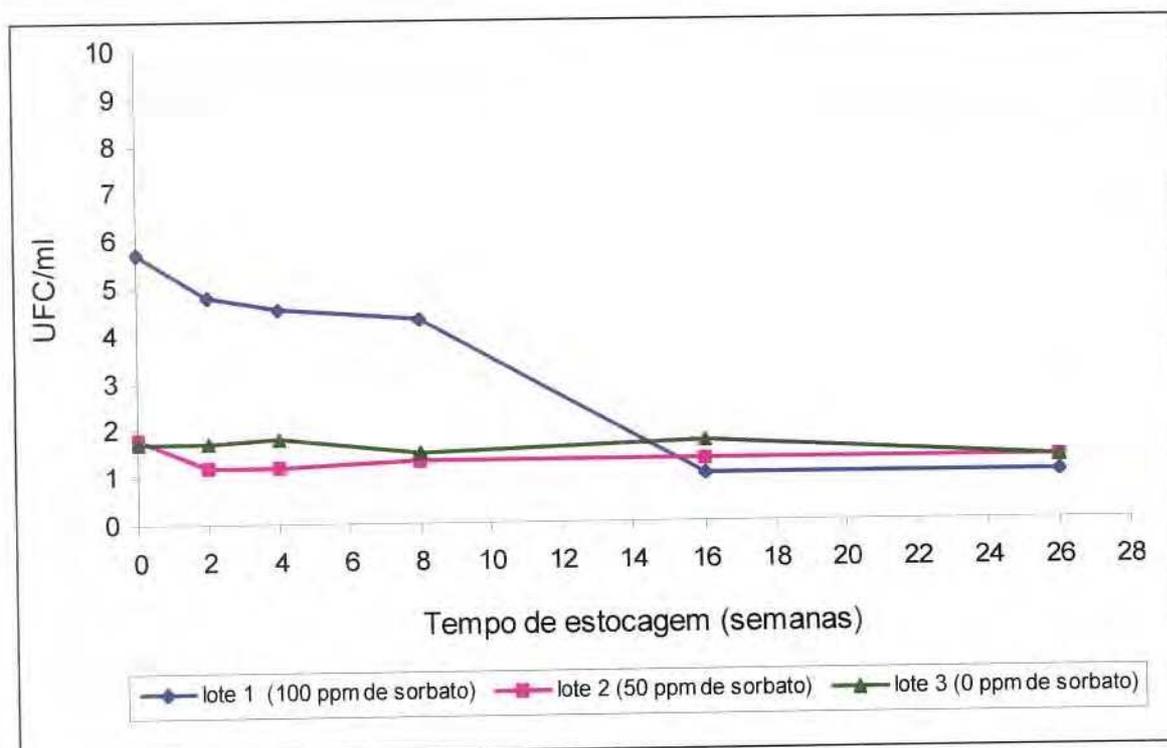


FIGURA 16 - Evolução das contagens de mesófilos aeróbios totais para os três lotes de bebida isotônica em função do tempo de estocagem a 25°C.

Conforme a *Figura 16*, podemos assumir que as contagens para os três lotes, praticamente, não diferiram entre si e se mantiveram constantes durante todo o período de estocagem. A contaminação levemente mais elevada, verificada no lote 1, pode ser atribuída ao fato de que os lotes foram elaborados e processados em dias diferentes. Notou-se, também, pequenas variações nas contagens de células. Entretanto, este aspecto pode ser considerado microbiologicamente irrelevante porque a variação de resultados foi apenas de 1,0 a 5,7 UFC/ml, entre todos os lotes analisados ao longo de 26 semanas. A adição de conservador não interferiu na estabilidade do produto, confirmando a possibilidade de sua eliminação.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.5.2.2. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi, igualmente, bastante reduzida, como mostrado na *Tabela 26*. Os resultados foram apresentados como valores estimados; já que, a faixa de contagem é de 10 a 150 UFC/placa, conforme Silva *et al* (1997).

TABELA 26 - Médias das contagens de bolores e leveduras (UFC/ml) para os três lotes de bebida isotônica pasteurizada em função do tempo de estocagem a 25°C*.

TEMPO DE ESTOCAGEM (semanas)	LOTE 1 (100mg/l de sorbato)	LOTE 2 (50mg/l de sorbato)	LOTE 3 (0mg/l de sorbato)
0	< 10	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10
16	< 10	< 10	< 10
26	< 10	< 10	< 10

*valores estimados.

Como mencionado na revisão bibliográfica deste estudo, a Portaria 451 do Ministério da Saúde ainda não estabelece padrões microbiológicos específicos para bebidas isotônicas ou repositores hidroeletrólitos.

Segundo Curiale (1991), a distribuição de microrganismos em uma amostra de alimento, ou mesmo entre amostras de um mesmo lote de produção não é necessariamente uniforme. Os planos de amostragem devem considerar a possível distribuição de microrganismos dentro do lote, fator especialmente crítico quando os níveis iniciais são inferiores a 10 UFC/g ou ml, que representa o limite

de sensibilidade dos procedimentos de plaqueamento em ágar usados nas análises. Níveis inferiores podem ser detectados, mas com menores exatidão e precisão.

A estabilidade microbiológica da bebida isotônica produzida pode ser atribuída à ausência de microrganismos nas amostras analisadas ou ao fato de que os microrganismos contaminantes não foram capazes de se desenvolver na formulação do produto em condições normais de estocagem, independente da presença de conservador químico no meio.

Informações específicas sobre a estabilidade microbiológica e físico-química de bebidas isotônicas ou repositores hidroeletrólíticos não foram encontradas em toda a revisão bibliográfica realizada neste estudo.

4.5.2.3. Pesquisa de bactérias patogênicas

Como estabelecido pela Portaria 451 do Ministério da Saúde, foram feitas análises de *Salmonella*, *S. aureus*, *B. cereus*, Clostrídios sulfito redutores e Coliformes fecais na bebida isotônica, sendo os resultados apresentados na Tabela 27.

TABELA 27 - Pesquisa de bactérias patogênicas na bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico.

MICROORGANISMO PESQUISADO	SITUAÇÃO MICROBIOLÓGICA
<i>Salmonella</i>	ausência em 25 ml
<i>S. aureus</i>	< 100/ml
<i>B. cereus</i>	< 100/ml
Clostrídios sulfito redutores	< 1/ml
Coliformes fecais	NMP < 0,02/ml

De acordo com os resultados mostrados na *Tabela 27*, a bebida pôde ser classificada como aceitável para consumo humano quanto à análise microbiológica.

4.6. TESTE DE ACEITAÇÃO SENSORIAL DA BEBIDA ISOTÔNICA

Os testes de aceitação da bebida, pasteurizada e acondicionada em embalagens assépticas, foram realizados com 2, 16 e 26 de estocagem. A reduzida contagem microbiana obtida na análise dos três lotes, como mostram a *Figura 16* e a *Tabela 26*, justificou a escolha do lote sem conservador para análise sensorial visto que, este lote foi considerado o “alvo” principal do presente estudo, que objetivou a produção de uma bebida que apresentasse uma boa estabilidade sem adição de conservadores químicos. Além disso, não é de se esperar que o conservador, nas concentrações empregadas (50 e 100mg/l), altere sensorialmente o produto, conforme (Sofos, 1989).

A *Figura 17* representa o histograma do teste de aceitação sensorial para o lote de bebida isotônica sem conservador, duas semanas após o processamento; indicando, para a aparência uma maior frequência de respostas apresentadas pelo painel sensorial, concentrada em “gostei muito”. Para o sabor, a maior frequência de respostas se concentrou entre “gostei regularmente” e “gostei muito”.

Com relação à aparência, a cor foi citada de forma genérica como atributo mais agradável. Entretanto, sua alta intensidade foi destacada como aspecto negativo por uma pequena parcela de provadores. No tocante ao sabor, a suavidade e doçura foram as características que mais satisfizeram aos provadores. Como aspecto negativo foi mencionado, principalmente, a sua fraca intensidade.

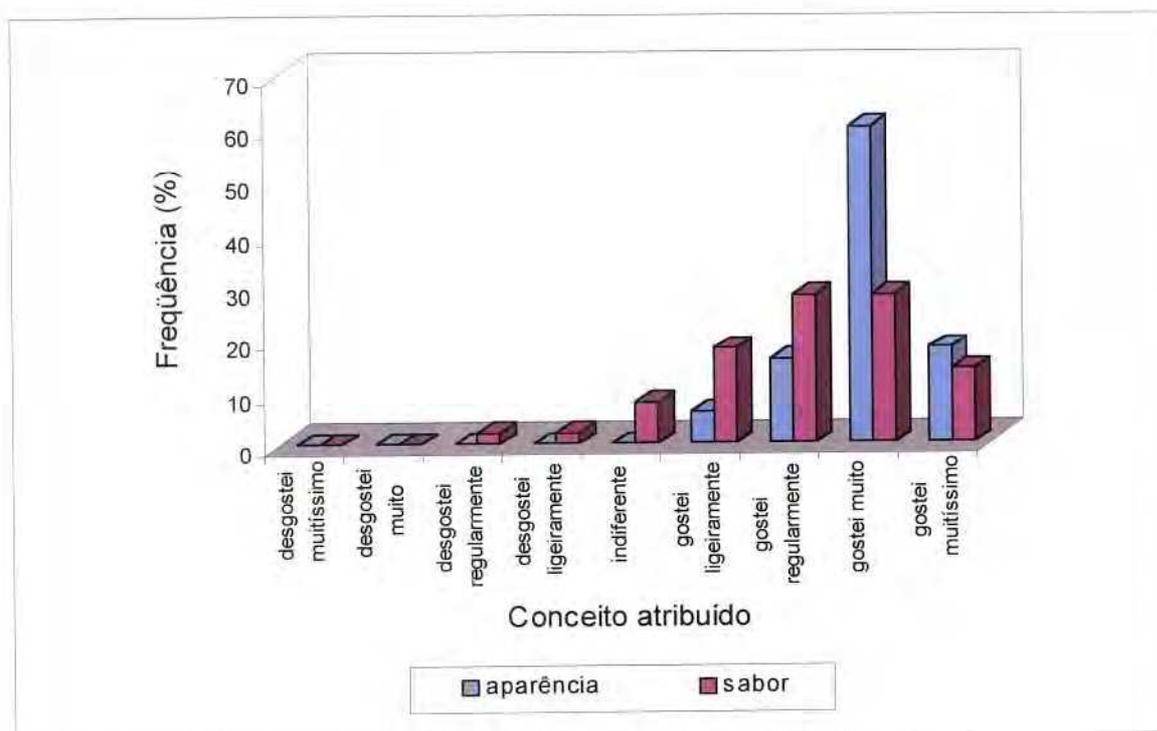


FIGURA 17 - Histograma do teste de aceitação para aparência e sabor do lote da bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico com 2 semanas de estocagem a 25°C.

O histograma do teste de aceitação sensorial para o lote sem conservador, estocado 16 semanas a 25°C, é ilustrado pela *Figura 18*. A avaliação da aparência mostrou uma maior frequência de respostas apresentadas pelo painel sensorial concentrada entre “gostei regularmente” e “gostei muito”. Para o atributo sabor, a maior frequência de respostas se manteve entre “gostei ligeiramente” e “gostei muito”.

Com relação à aparência, a cor foi citada de forma genérica como atributo mais agradável, seguida pela homogeneidade, transparência e brilho. Alguns provadores mencionaram a intensidade e artificialidade da cor como aspectos negativos. No tocante ao sabor, a doçura foi a característica que mais agradou ao

painel sensorial. No entanto, os termos “um pouco fraco”, “pouco doce” e “aguado” foram mencionados, por alguns, como aspectos negativos.

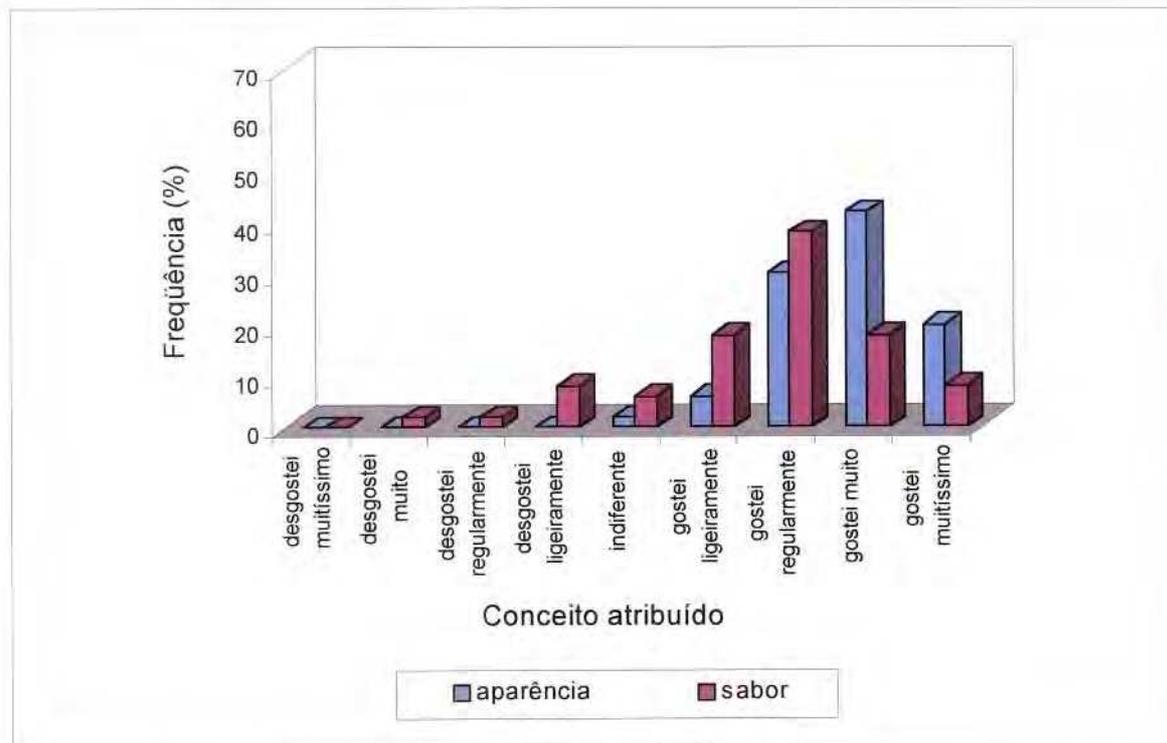


FIGURA 18 - Histograma do teste de aceitação para aparência e sabor do lote da bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico com 16 semanas de estocagem a 25°C.

Quando a bebida foi avaliada após 26 semanas de estocagem a maior parte das notas atribuídas à aparência concentrou-se entre “gostei regularmente” e “gostei muitíssimo”. Para o sabor, a maior frequência das notas se enquadrou entre “gostei regularmente” e “gostei muito”. Uma menor parcela dos provadores, entretanto, “desgostou ligeiramente” da bebida, como mostra o histograma da *Figura 19*.

No tocante à aparência, a coloração, a limpidez, brilho e homogeneidade foram citados como características positivas da bebida. A sua cor artificial e muito

intensa foi mencionada como atributo negativo por alguns provadores. Com relação ao sabor, a doçura e suavidade foram as características que mais agradaram aos provadores. Entretanto, a sua fraca intensidade, ausência de acidez e sabor aguçado foram relatados como aspectos negativos apresentados pelo produto.

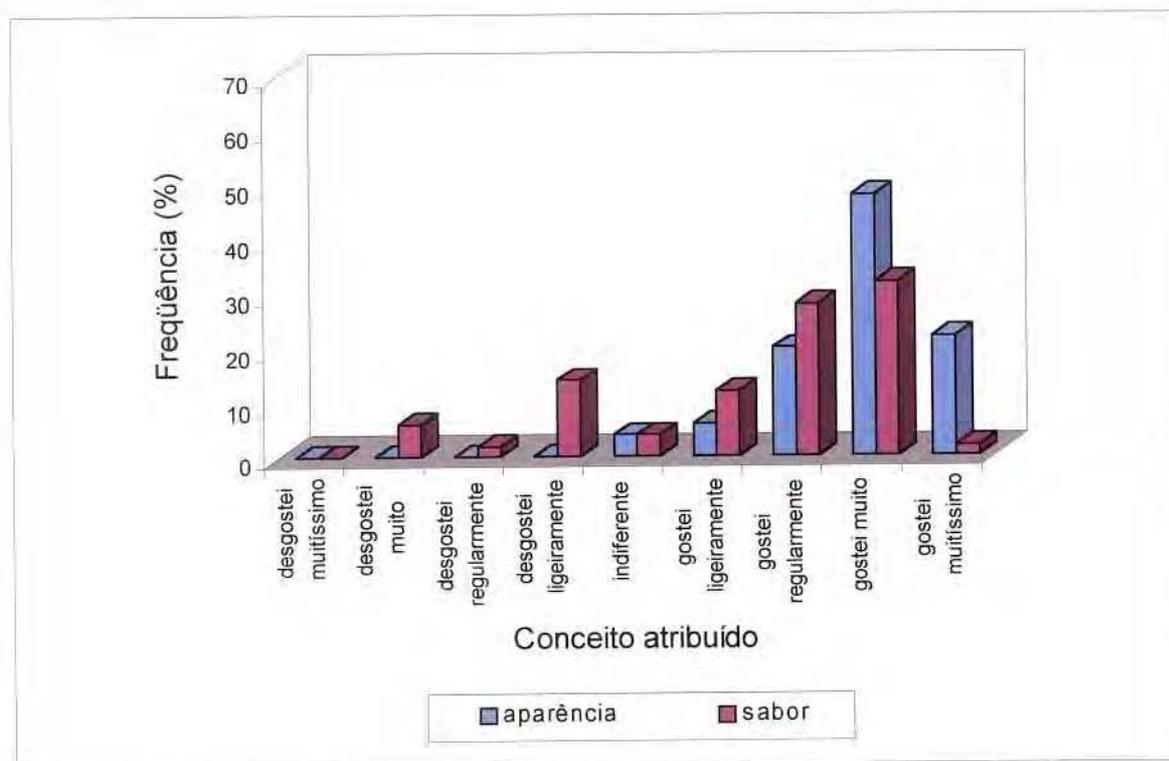


FIGURA 19 - Histograma do teste de aceitação para aparência e sabor do lote da bebida isotônica pasteurizada sem conservador químico com 26 semanas de estocagem a 25°C.

As médias das notas atribuídas para o sabor e aparência são apresentadas na *Tabela 28*. Para a aparência, a média calculada classifica a bebida entre “gostei regularmente” e “gostei muito” dentro da escala hedônica aplicada, para os três períodos avaliados. A média para o sabor apresentou uma sensível queda. No início, o produto foi classificado entre “gostei regularmente” e “gostei muito”, e

entre “gostei ligeiramente” e “gostei regularmente”, com 16 e ao final de 26 semanas de estocagem.

TABELA 28 - Médias das notas dos testes de aceitação para o lote 3 (sem conservador) estocado a 25°C.

TEMPO DE ESTOCAGEM (semanas)	ATRIBUTO AVALIADO	
	aparência	sabor
2	7,9 ^a	7,1 ^b
16	7,7 ^a	6,6 ^b
26	7,8 ^a	6,4 ^b

médias com o mesmo expoente não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A análise de variância (ANOVA) não apontou existência de diferença entre as amostras analisadas. O teste de Tukey indicou que as médias para ambos atributos avaliados não diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre o início e fim do período de estocagem, demonstrando que o grau de aceitação sensorial da bebida se manteve durante 26 semanas.

5. CONCLUSÕES

- ▶ Os resultados obtidos neste estudo, aliados às informações disponíveis na literatura, reafirmam a posição de destaque do ácido peracético e peróxido de hidrogênio como agentes sanificantes ou esterilizantes de embalagens;
- ▶ O sanificante Asepticper[®] (H₂O₂ 35%) apresentou excelente desempenho frente a células de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 a 24°C, atingindo valores superiores a 6,3 reduções decimais (RD) em três segundos de contato;
- ▶ As soluções de Proxitane 1512[®] com concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio variando de 0,3 a 1% e 0,46 a 1,54%, respectivamente, atingiram valores superiores a 4,9 RD em 3 segundos de contato. Os resultados obtidos indicaram 0,3% de ácido peracético na solução de uso como concentração ideal em operações de assepsia de embalagens;
- ▶ As soluções preparadas a partir do Vortexx[®] contendo 0,006 e 0,014% de ácido peracético e 0,009 e 0,021% de peróxido de hidrogênio, nas soluções de uso, alcançaram 2,4 RD durante 10 segundos de exposição, desempenho considerado insatisfatório;
- ▶ A solução de etanol 70% foi eficaz em tempos de contato superiores a 20 segundos, atingindo 5,1 RD durante 40 segundos;
- ▶ O desempenho das soluções sanificantes testadas frente à contaminação natural presente nas embalagens foi bastante similar, possivelmente, devido a reduzida contaminação inicial das garrafas;
- ▶ Em processos de sanificação por imersão é recomendado um enxágüe final das embalagens, quando são utilizadas soluções de Proxitane, contendo 0,46% de H₂O₂, e Asepticper[®] (35% de H₂O₂), para que a sua concentração residual seja levada a níveis inferiores a 0,5mg/l, regulamentado pela FDA;
- ▶ Quando soluções de etanol a 70% e Asepticper[®] foram utilizadas, ficou evidente a necessidade de enxágüe final das garrafas para evitar alteração sensorial na bebida isotônica;

- Os testes físico-químicos dos lotes da bebida isotônica indicaram, para o teor de ácido ascórbico, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados obtidos no início e fim da estocagem. Para acidez total titulável, pH e sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), praticamente, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$);
- As análises microbiológicas da bebida isotônica pasteurizada e acondicionada em garrafas plásticas assépticas evidenciaram a excelente estabilidade dos três lotes produzidos, indicando a possibilidade de eliminação do conservador químico da composição do produto;
- Finalmente, a bebida apresentou uma boa aceitação sensorial, quanto à aparência e sabor, não havendo variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias das notas atribuídas ao longo de 26 semanas de estocagem a 25°C .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. 7.rev. São Paulo, 1999. 3.35.
2. A assepsia na embalagem. **Embanews**, São Paulo v.8, n.4, p.24-26, abr.,1997.
3. ACNielsen (Instituto de Pesquisa de Mercado). **Consulta pessoal**, 2000.
4. ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.7, p.635-642, jul.1992.
5. ALASRI, A.; VALVERDE, M.; ROQUES, C.; MICHEL, G.; CABASSUD, C.; APTEL, P. Sporocidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, in comparison with chlorine and formaldehyde for ultrafiltration membrane disinfection. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, n.1, p.52-60, jan, 1993.
6. AL-DAGAL, M.; FUNG, D.Y.C. Aeromicrobiology – A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.29, n.5, p.333-340, 1990.
7. ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. Viçosa, 1994. 151p.
8. ANJOS, C. A. R. **Consulta pessoal**. Campinas, Unicamp/FEA, 2000.
9. ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1995. 335p.
10. BALDRY, M. G. C. The bactericidal, fungicidal and sporocidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.54, n.3, p.417-423, jun.1983.

11. BARUFFALDI, R.; DE OLIVEIRA, M. N. Conservação de alimentos por tratamento térmico. In: BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. V.3, cap.5. p. 97-98, 118-119.
12. Bebidas isotônicas prometem agitar mercado. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, v.8, n.55, p.34-37, jan./fev., 1998.
13. BLOCK, S. S. Sterilization. In: LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**. London: Academic Press, 1992. v.4, p. 87-103.
14. BLÜMKE, H. Sterile room techniques in the food industry. In: REUTER, H. **Aseptic processing of foods**. 1ª ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.6.11 p.265-270.
15. BROWN, W.E. **Plastics in food packaging**: properties, design, and fabrication. New York: Marcel Dekker, 1992. 539p.
16. BUCHNER, N. Aseptic packaging in glass and plastic bottles. In: REUTER, H. **Aseptic processing of foods**. 1ª ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.6.8. p.237-239.
17. CALDERÓN-MIRANDA, M. L.; GONZÁLEZ, M. F. S. M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 1, n.1,2, p.3-11, jan./dez., 1998.
18. CHAMBERS, J. V.; NELSON, P. E. **Principles of aseptic processing and packaging**. 2ª ed. Washington, 1993. 257p.
19. CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1993. 91p.

20. CHAVES, J. B. P; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1993. 81p.
21. CHEVROTON, D. The aseptic filling of beverage in bottles. **Industrie delle Bevande**, Dreux, v.25, n.142, p.120-122, aprile, 1996.
22. CHIPLEY, J. R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in foods**. 2^a ed. New York: Dekker, 1993. Cap.2 p.11-37.
23. Climatização cria novos conceitos na produção de alimentos. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.6, n.28, p.22-32, jan./fev., 2000.
24. COLÓQUIO FRANCO-BRASILEIRO, 1998, São Paulo. **Tecnologias de acondicionamento e de conservação de produtos alimentares**.
25. CORRÊA NETO, R. S. **Processamento de suco de laranja pasteurizado em garrafas de polietileno tereftalato (PET)**. Campinas, 1998. 93p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
26. CORRÊA NETO, R. S.; FARIA, J. A. F. - Tecnologia do PET para envase a quente. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, v.7, n.50, p.79-86, mar./abr.1997.
27. COSTA, S. M. Hot fill. **Plásticos em Revista**, São Paulo, v.35, n.424, p.31-36, dez.1997/jan.1998.
28. CURIALE, M. S. Shelf-life evaluation analysis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 11, n.7, p.364-369, jul., 1991.
29. DENNY, C. B. SHAFER, B. & ITO, K. Inactivation of bacterial spores in products and on container surfaces. In: Proceedings Int. Conf. On UHT processing and aseptic packaging of milk products. North Caroline State University, Raleigh, NC and Dairy Research, Inc., U.D.I.A. p.82. 1979.

30. Descartáveis em ritmo de globalização. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, v.8, n.56, p.16-28, mar./abr.1998.
31. Embalagem – setor aposta em tecnologia. **Plástico Moderno**, São Paulo, n.289, p.65, jul.,1998.
32. FARIA, J. A. Campinas, Unicamp/FEA, 1999.
33. FARIA, J. A. F; ATENCIA, E. E. Desempenho dos polímeros é aprovado para a irradiação. **Plástico Moderno**, São Paulo, v.22, n.227, p.20-22, nov.,1992.
34. FARIA, J. A. Estabilidade de alimentos em embalagens plásticas. **Apostila de aula**. Campinas, Unicamp/FEA, 1990.
35. FARIA, J. A. F. Vida-de-prateleira de alimentos processados assepticamente. In: II SEMINÁRIO LATINO AMERICANO - AVANÇOS EM TECNOLOGIA PARA O PROCESSAMENTO E ENVASAMENTO ASSÉPTICO DE ALIMENTOS. Campinas, 1993. p.7-28.
36. FRANCO, B. D. G. M. Importância dos microrganismos nos alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap. 1. p. 8 – 9.
37. FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology**: principles and practice. New York: Ellis Horwood, 1988. 505p. (Food Science and Technology)
38. FOOD PROCESSORS INSTITUTE. **Alimentos enlatados**: princípios de controle do processo térmico, acidificação e avaliação do fechamento de recipientes. Trad. de membros do Instituto de Tecnologia de Alimentos. 4.ed. Campinas, 1989. 239p.
39. GRIMM, L. Assepsia a frio – Um processo de envase do futuro? **Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, v.8, n.56, p.72-74, mar./abr., 1998

40. GRIMM, L. Beverage aseptic cold filling. **Fruit Processing**, Bad Kreuznach, v.8, n.7, p.262-265, jul,1998.
41. HARRIGAN, W. F.; Mc CANCE. **Laboratory methods in foods and dairy microbiology**. London: Academic Press. 1976. p.231-236.
42. HELDMAN, D. R. Factors influencing air-borne contamination of foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.39, n.5, p.962-969, set./out.1974.
43. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods: application of the HACCP system to ensure microbiological safety and quality**. Book 4. 1988. 357p.
44. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ed. São Paulo, 1985. v.1, 533p.
45. INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. A embalagem de bebidas como objeto de pesquisa. **Embalagem & Cia**, São Paulo. p.44-45, maio, 1998.
46. JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5th edition. New York: Chapman & Hall, 1996. 661p.
47. JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Análise química quantitativa – Vogel**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 1992. 712p.
48. JONES, M. V.; JOHNSON, M. D.; HERD, T.M. Sensitivity of yeast vegetative cells and ascospores to biocides and environmental stress. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, n.6, p.254 - 257, 1991.
49. JOYCE, D. A. Microbiological aspects of aseptic processing and packaging. In: WHILLHOFT, E. M. A. **Aseptic processing and packaging of particulate foods**. First edition. London: Chapman & Hall, 1993. cap.8. p.160-164.

50. KANG, Y.J.; FRANK, J. F. Evaluation of air samplers for recovery of artificially generated aerosols of pure cultures in a controlled environment. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.8, p.560-563, ago.1989.
51. KILLORAN, J. J. Packaging irradiated food. In: **Presevation of food by ionizing Radiation**. 1983, v.2, cap.8. p.317-326.
52. LANGEVELD, L. P. M.; VAN MONTFORT-QUASIG, R. M. G. E. Bacteriophage inactivation and starter-inhibiting properties of a peracetic acid disinfectant. **Journal of Dairy Research**, Cambridge. v.63, n.4, p.649-654, nov.1996.
53. LEAPER, S. Synergistic killing of spores of *Bacillus subtilis* by peracetic acid and alcohol. **Journal of Food Technology**, London, v.19, n.3, p.355-360, jun.1984.
54. LEITÃO, M. F. F. Limpeza e desinfecção na indústria de alimentos. **Boletim do ITAL**, Campinas, n.43, 34p. set.1975.
55. LEITÃO, M. F. F. **Anotações de aula**. Campinas, Unicamp/FEA, 1998.
56. LEITÃO, M. F. F. **Consulta pessoal**. Campinas, Unicamp/FEA, 1999.
57. MANAHAN, S. E. **Toxicological chemistry**. Michigan: Lewis Publishers 2nd ed, 1992. 449p.
58. MANNHEIM, C.H.& HAVKIN, M. Shelf-life of aseptically bottled orange juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v.5, n.1, p.1-6, mar.1981.
59. MARQUIS, R. E.; RUTHERFORD, G. C.; FARACI, M. M.; SHIN, S. Y. Sporicidal action of peracetic acid and protective effects of transition metal ions. **Journal of Industrial Microbiology**, New York, v.15, n.6, p.486-492, 1995.

60. MARTIN, G. Processo de esterilização deve ser compatível com produto. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. São Paulo, v.4 n.16, p.36-44, mar./abr.2000.
61. MARTIN, J. J.; SOLANES, E.; BOTA, E.; SANCHO, J. Evolucion química y organoleptica del zumo de naranja pasteurizado. **Alimentaria**. Madrid, p.59-63, abr.1995.
62. MARTINS, J. F. P; LUCHESE, R. H. Prevenção e controle de contaminação na indústria de alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**. São Paulo, v.3 n.13, p.36-38, set./out.1999.
63. MERMELSTEIN, N. H. Interest in pulsed electric field processing increases. **Food Technology**, Chicago. v.52, n.1, p.81-82, jan.1998.
64. MILTZ, J.; MANHEIM, C.H; HARTE, B. R. Packaging of juices using polymeric barriers containers. In: **Barrier polymers and structures**. Washington: American Chemical Society, 1990. 406p.
65. NIELSEN, K. B.; NIELSEN, P.V. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. **Journal of Food Protection**. Denmark, v.59 n.3, p.268-275, mar.1996.
66. Novas normas para alimentos e bebidas. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**. São Caetano do Sul, v.8 n.57, p.32-36, maio/jun. 1998.
67. OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M. Embalagens assépticas. In: Centro de Tecnologia de Embalagem de Alimentos/Instituto de Tecnologia de Alimentos **Novas Tecnologias de Acondicionamento de Alimentos**. Campinas: ITAL/SBCTA, 1988. cap:6 p.141-162.
68. PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. v.1. Trad. Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. 566p.

69. PEREIRA FILHO, E. R. **Sistemas mecanizados acoplados a forno de microondas para a mineralização em linha de amostras de interesse alimentício: determinação de ferro e cobalto.** Campinas, 1999. 100p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
70. PERKIN, A. G. Hydrogen peroxide and aseptic packaging. **Dairy Industries International**, London, v.47, n.3, p.20-22, mar.1982.
71. PETRUS, R. R.; FARIA, J. A. F. Sistema de embalagem para bebidas isotônicas. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**. São Caetano do Sul, v.10, n.68, p.40-41, ago. 1999.
72. PETRUS, R. R.; FARIA, J. A. F. Sistemas de esterilização de embalagens. **Revista Técnica de Bebidas e Alimentos Engarrafador Moderno**. São Caetano do Sul, v.10, n.70, p.36-38, out. 1999.
73. PETRUS, R. R.; CORRÊA NETO, R. S.; GÂNDARA, A. L. N.; FARIA, J. A. F. Sanificação de garrafas de polietileno tereftalato (PET) por agentes químicos e seu efeito residual na qualidade sensorial de suco de laranja e bebida isotônica. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS. Livro de programa e resumos. Campinas, 1999. P.170
74. PHILLIPS, C. R. Gaseous sterilization. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 2^a ed. London: Lea & Febiger, 1977. Cap30. p.606.
75. PIERGIOVANNI, L. Materiais de Embalagem e Tecnologias de Envase. In: BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. V.3, cap.10: p.246-258.
76. PRAPHAILONG, W.; FLEET, G.H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, London, v.14, n.5, p.459-468, out.1997.

77. Qualidade do ar. **Folha de São Paulo**. São Paulo, 22 out. 1999. Folha Campinas 3, p.9.
78. QUEST INTERNATIONAL. **Osmolarity**. Naarden, 1996. 2p.
79. RAMMERT, M. Aseptic cold fill: experiences and developments. **Industrie delle Bevande**, Dreux, v.25, n.142, p.123-128, aprile, 1996.
80. REUTER, H. Evaluation criteria for aseptic filling and packaging systems. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. Hamburg: Technomic, 1988. Cap.4 p95.
81. REUTER, H. Processes for packaging materials sterilization and system requirements. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.5 p155-165.
82. RODRIGUES, H. R. Manual de rotulagem. ISSN: 1516-8247. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 1999. 39p.
83. ROESSLER, E. B., PANGBORN, R. M., SIDEL, J. L. STONE, H. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired difference, duo/trio and triangle tests. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, n.3, p.940-943, 1978.
84. ROLAND, N. Aseptic packaging system for PET bottles. **Fruit Processing**, La Ferté Bernard, v.6, n.9, p.367-371, sep, 1996.
85. ROMANO, A. R., FARIA, J. A. F. Influência do design de garrafas de PET para óleos comestíveis sobre a colapsagem. **Óleos & Grãos**, v.7, n.31, p.26-29, 1996.
86. RUSIG, O. **Consulta pessoal**. Campinas, 1998.
87. SABADINI, E.; ASSANO, E. M.; ATVARIS, T. D. Z. Molecular weight of polyethylene glycols by vapor pressure osmometry: an alternative data treatment. **Journal of Applied Polymer Science**, Danvers, v.65, n.3, p.595-600, jul.1997.

88. SACHS, B. Glass for aseptic packaging. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.7.3 p.293-294.
89. Salas limpas na indústria alimentícia. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.5, n.26, p.22-24, set./out.1999.
90. SENAI/SEBRAE. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Brasília, 1999. 371p.
91. SHAPTON, D. A ; SHAPTON, N. F. **Principles and practices for the safe processing of foods**. Oxford: Heinz, 1991. 457p.
92. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.
93. SILVA, N. **Embalagem plástica para água mineral e de mesa. Garrafão retornável - requisitos da empresa engarrafadora**. Campinas: ITAL, 1999. 9p. Projeto de norma ABNT 23:005.08 – 003.
94. SOFOS, J. N. **Sorbate food preservatives**. Boca Raton: CRC, 1989. 237p.
95. SREBERNICH, S. M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*cocos nucifera*), variedades gigante e híbrido pb-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco**. Campinas, 1998. 189p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
96. STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A. **Mundo dos micróbios**. Trad. De E. KIRCHNER. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1969. 741p.
97. STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in food processing**. 2^aed. London: Academic Press, 1973. 329p.

98. SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3^a ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap.3. p.51-62.
99. TATSUNOU, T. About Packaging Containers for Liquid Foods from the Viewpoint of Food Sanitation. **Packaging Japan**, Tokyo, v.14, n.76, p.48-52, jul. 1993.
100. Tecnologias de barreira e esterilização são apresentadas em seminário. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.3, n.14, p.40, dez/1999.
101. TOLEDO, R. T. Chemical sterilants for aseptic packaging. **Food Technology**, Chicago, v.29, n.5, p.102-112, maio,1975.
102. TOYODA, M.; ITO, Y.; IWAIDA, M.; FUJII, M. Rapid procedure for the determination of minute quantities of residual hydrogen peroxide in food by using a sensitive oxygen electrode. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.30, n.2, p.346-349, mar./abr.1982.
103. TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2nded. London: Ed. Academic Press. 1993. 478p.
104. WANG, J.; TOLEDO, R. T. Sporicidal properties of mixtures of hydrogen peroxide vapor and hot air. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.12, p.60-67, dez.1986.
105. Uso de ozônio traz vantagens para indústrias de bebidas. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.5, n.26, p.25,1999.
106. VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3^a ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

107. VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Beverages**: technology, chemistry and microbiology. London: Chapman & Hall, 1994. v.2.
108. VOIROL, F. Energy drinks, S.I, Xyrofin Ltd, s.d. 32p.
109. VON BOCKELMANN, B. V. **Long life products**: long life from raw materials to finished products. Värnamo: Tetra Pak, 1988. 68p.
110. YOKOYAMA, M. New aseptic packaging systems. **Packaging Japan**, Tokyo, p.23-27, set.1987.

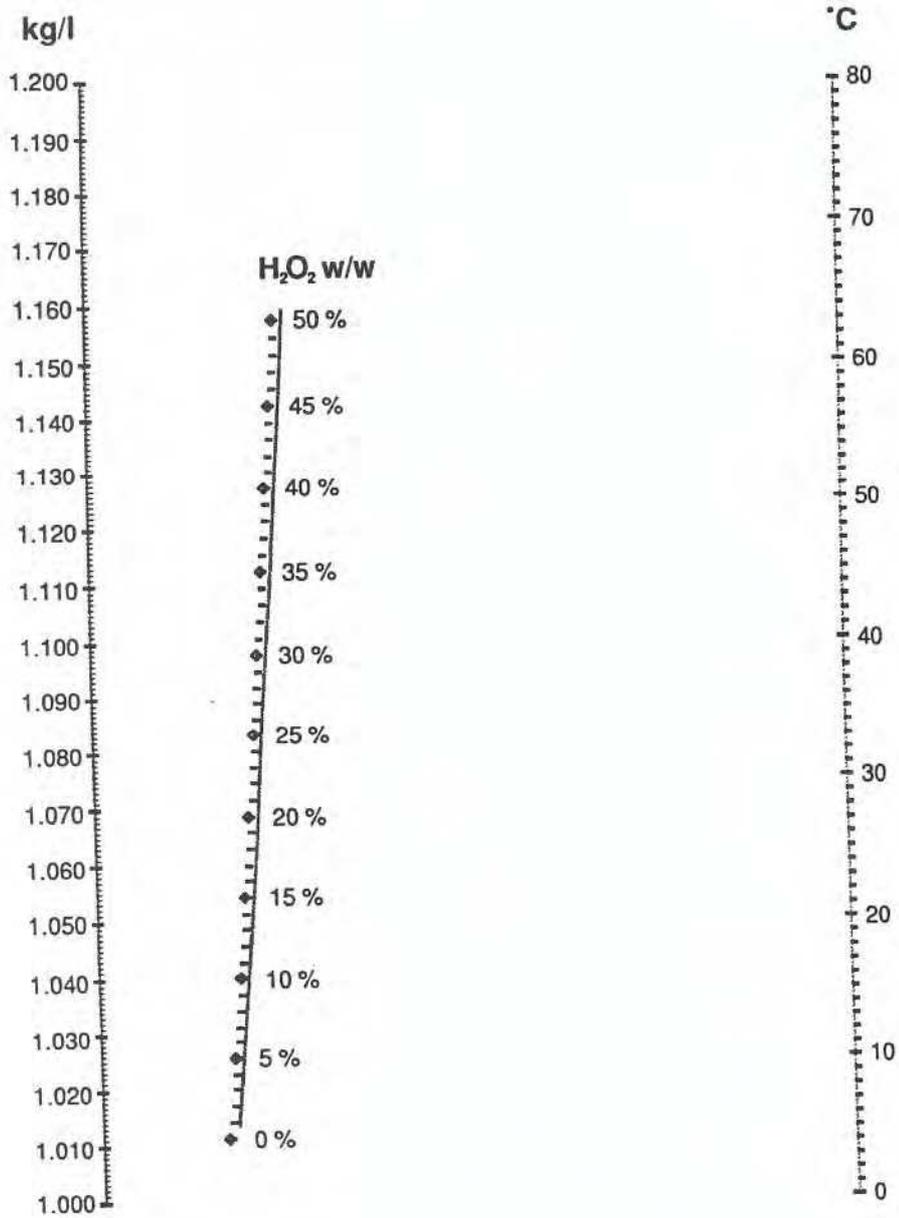
ANEXOS

ANEXO I - Nomograma específico para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio em solução.

 Tetra Brik Packaging Systems

970630
RO 2:3/97

Hydrogen Peroxide Nomogram DO NOT REPRODUCE!



ANEXO II - Ficha para avaliação sensorial de bebida isotônica (teste triangular).

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo três amostras de bebida isotônica. Duas são idênticas e uma diferente. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e circule o código daquela que lhe pareça diferente.

Comentários: _____

ANEXO III - Tabela para conversão de número de unidades formadoras de colônia (UFC)/placa em UFC/m³ de ar.

Positive hole conversion table MAS-100

Merck KGaA, Darmstadt, Germany

r = Number of colony forming units counted on 90 mm Petridish

Pr = Probable statistical total

r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr
1	1	51	54	101	116	151	189	201	279	251	394	301	557	351	836
2	2	52	58	102	118	152	191	202	281	252	397	302	561	352	844
3	3	53	57	103	119	153	193	203	283	253	400	303	565	353	853
4	4	54	58	104	120	154	194	204	285	254	402	304	569	354	861
5	5	55	59	105	122	155	196	205	287	255	405	305	573	355	870
6	6	56	60	106	123	156	197	206	289	256	408	306	578	356	879
7	7	57	61	107	124	157	199	207	291	257	411	307	582	357	888
8	8	58	63	108	126	158	201	208	293	258	413	308	586	358	897
9	9	59	64	109	127	159	202	209	295	259	416	309	591	359	907
10	10	60	65	110	128	160	204	210	297	260	419	310	595	360	917
11	11	61	66	111	130	161	206	211	299	261	422	311	599	361	927
12	12	62	67	112	131	162	207	212	301	262	425	312	604	362	937
13	13	63	68	113	133	163	209	213	304	263	428	313	608	363	947
14	14	64	70	114	134	164	211	214	306	264	431	314	613	364	958
15	15	65	71	115	135	165	212	215	308	265	433	315	618	365	969
16	16	66	72	116	137	166	214	216	310	266	436	316	622	366	981
17	17	67	73	117	138	167	216	217	312	267	439	317	627	367	992
18	18	68	74	118	140	168	218	218	314	268	442	318	632	368	1005
19	19	69	76	119	141	169	219	219	317	269	445	319	637	369	1017
20	20	70	77	120	142	170	221	220	319	270	449	320	642	370	1030
21	22	71	78	121	144	171	223	221	321	271	452	321	647	371	1043
22	23	72	79	122	145	172	224	222	323	272	455	322	652	372	1057
23	24	73	80	123	147	173	226	223	325	273	458	323	657	373	1071
24	25	74	82	124	148	174	228	224	328	274	461	324	662	374	1086
25	26	75	83	125	150	175	230	225	330	275	464	325	667	375	1102
26	27	76	84	126	151	176	232	226	332	276	467	326	673	376	1118
27	28	77	85	127	153	177	233	227	335	277	471	327	678	377	1134
28	29	78	87	128	154	178	235	228	337	278	474	328	684	378	1152
29	30	79	88	129	156	179	237	229	339	279	477	329	689	379	1170
30	31	80	89	130	157	180	239	230	342	280	480	330	695	380	1189
31	32	81	90	131	158	181	241	231	344	281	484	331	701	381	1209
32	33	82	92	132	160	182	242	232	346	282	487	332	706	382	1230
33	34	83	93	133	161	183	244	233	349	283	491	333	712	383	1252
34	35	84	94	134	163	184	246	234	351	284	494	334	718	384	1276
35	37	85	95	135	164	185	248	235	353	285	497	335	724	385	1301
36	38	86	97	136	166	186	250	236	356	286	501	336	730	386	1327
37	39	87	98	137	167	187	252	237	358	287	504	337	737	387	1356
38	40	88	99	138	169	188	254	238	361	288	508	338	743	388	1387
39	41	89	101	139	171	189	255	239	363	289	511	339	749	389	1420
40	42	90	102	140	172	190	257	240	366	290	515	340	756	390	1456
41	43	91	103	141	174	191	259	241	368	291	519	341	763	391	1496
42	44	92	104	142	175	192	261	242	371	292	522	342	769	392	1541
43	45	93	106	143	177	193	263	243	373	293	526	343	776	393	1591
44	47	94	107	144	178	194	265	244	376	294	530	344	783	394	1648
45	48	95	108	145	180	195	267	245	378	295	534	345	791	395	1715
46	49	96	110	146	181	196	269	246	381	296	537	346	798	396	1795
47	50	97	111	147	183	197	271	247	384	297	541	347	805	397	1895
48	51	98	112	148	185	198	273	248	386	298	545	348	813	398	2028
49	52	99	114	149	186	199	275	249	389	299	549	349	820	399	2228
50	53	100	115	150	188	200	277	250	391	300	553	350	828	400	2628

Diese Tabelle basiert auf der Wahrscheinlichkeit, dass bei zunehmender Anzahl Mikroorganismen pro Probenahme mehrerer Mikroorganismen in das gleiche Loch des Lochdeckels eintreten.

This table is based upon the principles that as the number of viable particles being impinged on a given plate increases, the probability of the next particle going into an "empty hole" decreases.

La méthode de correction statistique se base sur le principe suivant: la probabilité que, par prélèvement, plusieurs micro-organismes entrent dans le même trou du couvercle à trous plus le nombre de micro-organismes croît, augment.

El método de corrección estadística se basa en el siguiente principio: a mayor cantidad de microorganismos en cada toma de muestras, aumenta la probabilidad de que penetren varios microorganismos por el mismo orificio de la tapa.

The values in the table are calculated from the basic formula (Feller, 1950) $P_r = N [1/N + 1/N-1 + 1/N-2 + \dots + 1/N-r+1]$

(Appendix 1)

ANEXO IV - Ficha para avaliação sensorial de bebida isotônica (teste de aceitação/escala hedônica).

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou EM RELAÇÃO A APARÊNCIA.

9. Gostei muitíssimo
8. Gostei muito
7. Gostei regularmente
6. Gostei ligeiramente
5. Indiferente
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei regularmente
2. Desgostei muito
1. Desgostei muitíssimo

amostra

Valor

Agora, diga o que você mais gostou e desgostou na amostra EM
RELAÇÃO A APARÊNCIA

amostra

mais gostou

menos gostou

Por favor, avalie novamente a amostra usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou EM RELAÇÃO AO SABOR.

9. Gostei muitíssimo
8. Gostei muito
7. Gostei regularmente
6. Gostei ligeiramente
5. Indiferente
4. Desgostei ligeiramente
3. Desgostei regularmente
2. Desgostei muito
1. Desgostei muitíssimo

amostra

Valor

Agora, diga o que você mais gostou e desgostou na amostra EM
RELAÇÃO AO SABOR

amostra

mais gostou

menos gostou

ANEXO V - Tabela de número mínimo de seleções corretas da amostra diferente, necessário para estabelecer diferença significativa a vários níveis de probabilidade, pelo método triangular.

Número (N) de julgamentos	Níveis de probabilidade						
	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,005	0,001
5	4	5	5	5	5	5	
6	5	5	5	5	6	6	
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20
32	16	16	17	17	18	19	20
33	17	17	17	18	18	19	21
34	17	17	18	18	19	20	21
35	17	18	18	19	19	20	22
36	18	18	18	19	20	20	22
37	18	18	19	19	20	21	22
38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	21	22	24
41	20	20	20	21	22	23	24

42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
55	25	25	25	26	27	28	30
60	27	27	28	29	30	31	33
65	28	29	29	30	31	32	34
70	31	31	32	33	34	35	37
75	32	33	33	34	35	36	38
80	35	35	36	36	38	39	41
85	36	36	37	38	39	40	42
90	38	39	40	40	42	43	45
95	40	40	41	42	43	44	46
100	42	43	43	44	45	47	49

^aValores de X não listados na tabela acima podem ser obtidos pela fórmula
 $X = (Z(\sqrt{2N}) + N + 1,5)/3$

Fonte: ROESSLER *et al* (1978)