

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



**ADAPTAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE  
SISTEMA ASSÉPTICO PARA LEITE FLUIDO EM  
GARRAFA PLÁSTICA**

**Rodrigo Rodrigues Petrus  
ENGENHEIRO DE ALIMENTOS**

**Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria  
ORIENTADOR**

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

Campinas – SP

2004

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

P449a Petrus, Rodrigo Rodrigues  
Adaptação e avaliação de desempenho de sistema  
asséptico para leite fluido em garrafa plástica / Rodrigo  
Rodrigues Petrus. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.Sistema asséptico. 2.Leite. 3.Garrafa plástica.  
4.Sala limpa. I.Faria, José de Assis Fonseca. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III.Título.

CARS

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria  
Orientador

---

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão  
Membro

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos  
Membro

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Membro

---

Profa. Dra. Helena Maria André Bolini  
Membro

---

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig  
Suplente

---

Profa. Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer  
Suplente

*”Um caminho de 1000Km começa com o primeiro passo.”*

*“O tempo vivido enriquece o espírito, pois traz a sabedoria da experiência.”*

*Dedico esta conquista aos meus pais e fiéis amigos, Hédio  
e Zélia, à Cristiane e ao Vinícius*

## AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo e de todos;

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

Ao professor Assis pela amizade, paciência e orientação dedicada;

Aos membros da banca examinadora pelas consultas e correções da tese;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa e auxílio pesquisa concedidos;

Às amigas Laura Abreu e Ana Lourdes por participar dos momentos mais árduos da pesquisa;

Ao José Carlos Petrus pelo incentivo e amizade;

Aos funcionários da FEA

Alice, Bete, Marlene, Adauto, Bernadete, Nelson, Jaime, Babia, Carlos, Ana Maria;

Aos professores e pesquisadores Alfredo Vitali e Viotto;

Aos colegas e amigos Dom Pedro, Dom Leonel, Jovem Eduardo, João, Vanessa, Raphael, Rafaela, Selma, Paulo, Cristiane, Alessandra, Daniela, Dirce e Celina;

À Sumá Ltda, representada pelo Paulo e Miguel;

À Sandet, representada pelo Rodrigo.

Palavras-chaves:

Sistema asséptico (aseptic system)

Leite (milk)

Garrafa plástica (plastic bottle)

Avaliação de processo (process assessment)

Sala limpa (clean room)

---

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XX</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XXII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>XXVIII</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>XXIX</b>
3.1 SISTEMAS ASSÉPTICOS .....	XXIX
3.1.1 Caracterização dos sistemas assépticos.....	xxx
3.1.1.1 Esterilização comercial do produto .....	xxx
3.1.1.2 Esterilização da embalagem.....	xxxi
3.1.1.2.1 Ácido peracético .....	xxxiv
3.1.1.2.2 Peróxido de hidrogênio .....	xxxv
3.1.1.3 Acondicionamento asséptico .....	xxxvi
3.1.2 Embalagens plásticas para sistemas assépticos.....	xxxvii
3.1.3 Origem de problemas microbianos em sistemas assépticos .....	xxxix
3.2 CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS .....	XL
3.2.1 Fontes de contaminantes do ar .....	xli
3.2.1.1 Microrganismos no ar .....	xl ii
3.3 TECNOLOGIA DE SALAS LIMPAS .....	XLIII
3.3.1 Evolução tecnológica .....	xl iv
3.3.2 Conceito de sala limpa .....	xl iv
3.3.3 Aplicações na indústria de alimentos.....	xl v
3.3.4 Classificação de salas limpas.....	xl v
3.3.5 Características de salas limpas .....	xl viii
3.3.6 Operadores em salas limpas .....	xl ix
3.3.7 Certificação de salas limpas .....	I
3.4 FUNDAMENTOS DA HIGIENE INDUSTRIAL .....	LI
3.4.1 Princípios básicos da higienização .....	li
3.4.2 Agentes de limpeza.....	lii
3.4.3 Agentes de sanificação .....	liii



3.4.4	Avaliação microbiológica dos procedimentos de higienização.....	liii
3.5	LEITE LONGA VIDA .....	LV
3.5.1	Uso de altas temperaturas .....	lv
3.5.1.1	Efeito de esterilização do tratamento térmico .....	lviii
3.5.2	Microbiologia de leite.....	lix
3.5.3	Alterações que ocorrem no leite acondicionado .....	lxi
3.5.3.1	Alterações no sabor.....	lxii
3.5.3.2	Alterações nas proteínas .....	lxiv
3.5.3.3	Alterações nutricionais .....	lxiv
3.5.3.4	Aparência .....	lxv
3.5.3.5	Gelificação e formação de sedimentos .....	lxvi
3.5.4	Aspectos legais .....	lxvi
3.5.5	Defeitos na produção de leite UHT.....	lxvii
3.6	EMBALAGENS PARA LEITE LONGA VIDA .....	LXVII
3.6.1	Embalagens plásticas.....	lxviii
3.6.1.1	Polietileno de alta densidade .....	lxix
3.6.2	Acondicionamento e fechamento.....	lxix
3.7	ESTERILIDADE COMERCIAL DE ALIMENTOS TERMOPROCESSADOS .....	LXX
3.8	ESTABILIDADE DE LEITE PROCESSADO ASEPTICAMENTE.....	LXXI
3.8.1	Efeito da barreira e do formato da embalagem.....	lxxii
3.8.2	Disponibilidade de oxigênio .....	lxxiii
3.8.3	Efeito da temperatura.....	lxxiii
3.8.4	Transformações físicas e químicas .....	lxxv
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>LXXVII</b>
4.1	MATERIAL E EQUIPAMENTOS .....	LXXVII
4.2	DESCRIÇÃO DA PLANTA PILOTO UTILIZADA .....	LXXVII
4.3	DESCRIÇÃO DA ÁREA LIMPA.....	LXXVIII
4.4	CERTIFICAÇÃO DA ÁREA LIMPA .....	LXXX
4.5	DESCRIÇÃO DO PROCESSO .....	LXXXI
4.5.1	Matéria-prima .....	lxxxi
4.5.2	Processamento térmico.....	lxxxi
4.5.3	Assepsia das embalagens.....	lxxxii
4.5.4	Acondicionamento asséptico.....	lxxxiii
4.5.5	Diagrama do processo .....	lxxxiii
4.6	SANITIZAÇÃO E ESTERILIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS .....	LXXXV
4.6.1	Limpeza CIP da linha de processamento .....	lxxxv

4.6.1.1	Pré-lavagem .....	lxxxv
4.6.1.2	Limpeza ácida .....	lxxxvi
4.6.1.3	Enxágüe .....	lxxxvi
4.6.1.4	Limpeza alcalina.....	lxxxvi
4.6.1.5	Enxágüe final.....	lxxxvi
4.6.2	Limpeza do tanque asséptico e válvula de envase.....	lxxxvii
4.6.3	Sanificação da sala limpa.....	lxxxvii
4.6.4	Esterilização da linha de processamento e envase .....	lxxxvii
4.6.5	Limpeza e sanificação do equipamento de esterilização de garrafas .....	lxxxvii
4.6.6	Esterilização dos filtros de água da linha de enxágüe das embalagens ..	lxxxviii
4.7	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO SISTEMA ASSÉPTICO.....	LXXXVIII
4.7.1	Testes que antecederam aos processamentos .....	lxxxviii
4.7.1.1	Conformidade das condições operacionais da área limpa .....	lxxxviii
4.7.1.1.1	Pressurização da sala de envase .....	xc
4.7.1.1.2	Velocidade, vazão e taxa de movimentação de ar .....	xc
4.7.1.1.3	Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão .....	xcii
4.7.1.1.4	Monitoração ativa de microrganismos no ar.....	xcii
4.7.1.1.5	Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies .....	xciii
4.7.1.2	Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase.....	xciii
4.7.2	Controles simultâneos aos processamentos preliminares .....	xciv
4.7.2.1	Conformidade das condições operacionais da área limpa .....	xciv
4.7.2.1.1	Pressurização.....	xciv
4.7.2.1.2	Contagem de partículas totais e microrganismos no ar .....	xciv
4.7.2.1.3	Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies .....	xciv
4.7.2.2	Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase.....	xcv
4.7.3	Controles simultâneos aos processamentos finais .....	xcv
4.7.3.1	Condições operacionais da área limpa .....	xcv
4.7.3.2	Análise da água de enxágüe da linha .....	xcv
4.7.3.3	Análise da água de enxágüe das embalagens .....	xcv
4.7.3.4	Análise microbiológica das embalagens .....	xcvi
4.7.3.5	Controle de residual de peróxido de hidrogênio nas embalagens.....	xcvi
4.8	AVALIAÇÃO DO LEITE PROCESSADO.....	XCVII
4.8.1	Teste de esterilidade comercial do leite.....	xcvii
4.8.1.1	Incubação das amostras.....	xcvii
4.8.1.2	Inspeção visual dos lotes.....	xcvii
4.8.1.3	Determinação do pH.....	xcvii

4.8.2	Procedimento microbiológico para detecção de contaminantes .....	xcvii
4.8.3	Avaliação sensorial para estimativa da vida útil do leite .....	cii
4.9	CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM.....	CIII
4.9.1	Avaliação dimensional.....	ciii
4.9.2	Distribuição de espessura .....	ciii
4.9.3	Peso da embalagem .....	ciii
4.9.4	Capacidade volumétrica .....	civ
4.9.5	Torque de fechamento e abertura .....	civ
4.9.6	Integridade do fechamento através de termosselagem por indução.....	civ
4.9.7	Taxa de permeabilidade ao oxigênio .....	civ
4.9.8	Medida da opacidade .....	civ
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	CV
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>CV</b>
5.1	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO SISTEMA ASSÉPTICO.....	CV
5.1.1	Certificação de conformidade da área limpa .....	cv
5.1.2	Testes preliminares que antecederam aos processamentos .....	cv
5.1.2.1	Conformidade das condições operacionais da área limpa .....	cv
5.1.2.1.1	Pressurização da sala de envase .....	cvi
5.1.2.1.2	Verificação da velocidade, vazão e taxa de movimentação de ar ....	cvii
5.1.2.1.3	Contagem de partículas totais em suspensão .....	cviii
5.1.2.1.4	Monitoração ativa de microrganismos no ar.....	cix
5.1.2.1.5	Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies .....	cxii
5.1.2.2	Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase.....	cxii
5.1.3	Controles simultâneos aos processamentos preliminares .....	cxiii
5.1.3.1	Conformidade das condições operacionais da área limpa .....	cxiii
5.1.3.1.1	Pressurização da área limpa.....	cxiii
5.1.3.1.2	Contagem de partículas totais no ar .....	cxiv
5.1.3.1.3	Monitoração ativa de microrganismos no ar.....	cxiv
5.1.3.1.4	Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies .....	cxv
5.1.3.2	Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase.....	cxv
5.1.4	Controles simultâneos aos processamentos finais .....	cxvi
5.1.4.1	Conformidade das condições operacionais da área limpa .....	cxvi
5.1.4.1.1	Pressurização.....	cxvi
5.1.4.1.2	Contagem de partículas totais no ar .....	cxvi
5.1.4.1.3	Monitoração ativa de microrganismos no ar.....	cxvii
5.1.4.1.4	Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies .....	cxix

5.1.4.2	Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase.....	cxx
5.1.4.3	Análise da água de enxágüe das embalagens .....	cxxi
5.1.4.4	Análise microbiológica das garrafas .....	cxxiii
5.1.4.5	Controle de residual de peróxido de hidrogênio nas embalagens.....	cxxiv
5.2	ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA.....	CXXIV
5.2.1	Testes microbiológicos.....	cxxiv
5.2.1.1	Contagem padrão em placas.....	cxxiv
5.2.2.2	Contagem de esporos de mesófilos aeróbios .....	cxxv
5.2.2	Testes físico-químicos.....	cxxvi
5.3	CÁLCULO DO EFEITO DE ESTERILIZAÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE.....	CXXVIII
5.4	AVALIAÇÃO DO PRODUTO FINAL.....	CXXXI
5.4.1	Determinação do pH .....	cxxxi
5.4.2	Teste de esterilidade comercial .....	cxxxi
5.4.2.1	Inspeção visual dos lotes após incubação a 35°C/10dias.....	cxxxii
5.4.2.2	Determinação de pH.....	cxxxii
5.4.3	Procedimento microbiológico para detecção de contaminantes .....	cxxxv
5.4.4	Caracterização físico-química do leite processado.....	cxxxviii
5.4.5	Avaliação sensorial para estimativa da estabilidade do leite .....	cxl
5.5	CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM.....	CL
5.5.1	Avaliação dimensional.....	cl
5.5.2	Distribuição de espessura .....	cli
5.5.3	Determinação do peso .....	cliv
5.5.4	Capacidade volumétrica.....	clv
5.5.5	Torque de fechamento e abertura .....	clvi
5.5.6	Integridade do fechamento.....	clvii
5.5.7	Taxa de permeabilidade ao oxigênio.....	clvii
5.5.8	Opacidade da garrafa.....	clviii
6	CONCLUSÕES .....	CLXI
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	CLXIII
8	ANEXOS .....	CLXXXI

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Métodos aplicados na assepsia de materiais de embalagem. ....	xxxiii
<b>Tabela 2</b>	- Exemplos de tipos de contaminantes e suas respectivas fontes.....	xli
<b>Tabela 3</b>	- Classificação comparativa para salas limpas e ambientes controlados. ....	xlvi

<b>Tabela 4</b> - Características das técnicas de amostragem de superfícies.....	liv
<b>Tabela 5</b> - Causas potenciais de falhas na produção de leite UHT.....	lxvii
<b>Tabela 6</b> - Binômios utilizados no tratamento térmico do leite em trocador de calor a placas. ....	lxxxii
<b>Tabela 7</b> - Área e volume da área limpa monitorada. ....	xc
<b>Tabela 8</b> - Pressão diferencial entre a sala de envase e planta adjacente.....	cvi
<b>Tabela 9</b> - Parâmetros de controle do ar insuflado na área limpa. ....	cvii
<b>Tabela 10</b> - Contagem de partículas totais em suspensão na área limpa. ....	cviii
<b>Tabela 11</b> - Contagem de partículas totais no ar no ponto de envase. ....	cix
<b>Tabela 12</b> - Contagem de microrganismos em suspensão na área limpa.....	cx
<b>Tabela 13</b> - Contagem de microrganismos no ar na sala de envase <i>em operação</i> .....	cx
<b>Tabela 14</b> - Contagem de microrganismos em suspensão no ponto de envase. ....	cx
<b>Tabela 15</b> - Contagem global de microrganismos em superfícies na sala limpa. ....	cxii
<b>Tabela 16</b> - Contagem padrão em placas na água de enxágüe da linha de processamento e envase. ....	cxiii
<b>Tabela 17</b> - Contagem de partículas totais no ar no ponto de envase da sala limpa <i>em operação</i> .....	cxiv
<b>Tabela 18</b> - Contagem de microrganismos em suspensão no ponto de envase da sala limpa <i>em operação</i> .....	cxv
<b>Tabela 19</b> - Contagem global de microrganismos em superfícies na sala limpa. ....	cxv
<b>Tabela 20</b> - Contagem padrão em placas na água de enxágüe da linha de processamento e envase. ....	cxvi
<b>Tabela 21</b> - Contagem de partículas totais no ar no ponto de envase da sala limpa <i>em operação</i> .....	cxvii
<b>Tabela 22</b> - Contagem padrão em placas de microrganismos no ar no ponto de envase da sala limpa <i>em operação</i> . ....	cxvii
<b>Tabela 23</b> - Contagem de bolores em PDA em suspensão no ponto de envase da sala limpa <i>em operação</i> .....	cxviii
<b>Tabela 24</b> - Monitoração ativa de microrganismos em suspensão no ar da planta de processamento. ....	cxix
<b>Tabela 25</b> - Contagem microrganismos em superfícies na sala de envase em placa de RODAC.....	cxx
<b>Tabela 26</b> - Contagem padrão em placas na água de enxágüe da linha de processamento e envase. ....	cxxi
<b>Tabela 27</b> - Contagem padrão em placas na água de enxágüe das embalagens <sup>1</sup> .....	cxxii

<b>Tabela 28</b> - Contagem padrão em placas nas garrafas destinadas ao sistema asséptico.	cxxiii
<b>Tabela 29</b> - Contagem padrão em placas na matéria-prima.	cxxiv
<b>Tabela 30</b> - Contagem de esporos de mesófilos aeróbios na matéria-prima.	cxxv
<b>Tabela 31</b> - Análise físico-química da matéria-prima.	cxxvii
<b>Tabela 32</b> - Efeito de esterilização do tratamento térmico ( $F_0$ ) do leite na seção de retenção durante 10s.	cxxx
<b>Tabela 33</b> - Leitura de pH a 25°C em amostras de leite ao final do processo.	cxxxii
<b>Tabela 34</b> - Leitura de pH a 25°C em amostras de leite processado após incubação a 35°C/10 dias.	cxxxii
<b>Tabela 35</b> - Resultados da fase 1 <sup>a</sup> da análise microbiológica de leite processado e acondicionado assepticamente.	cxxxv
<b>Tabela 36</b> - Resultados da fase 2 <sup>a</sup> da análise microbiológica de leite processado e acondicionado assepticamente.	cxxxvi
<b>Tabela 37</b> - Diagnóstico final do teste de esterilidade comercial de leite processado e acondicionado assepticamente em garrafa de PEAD.	cxxxvii
<b>Tabela 38</b> - Caracterização físico-química do leite processado.	cxxxix
<b>Tabela 39</b> - Médias das notas dos testes de aceitação do leite produzido e marcas comerciais estocados durante 2 semanas à temperatura ambiente.	cxli
<b>Tabela 40</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 3 semanas à temperatura ambiente.	cxlii
<b>Tabela 41</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 4 semanas à temperatura ambiente.	cxliii
<b>Tabela 42</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 7 semanas à temperatura ambiente.	cxliii
<b>Tabela 43</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 8 semanas à temperatura ambiente.	cxlv
<b>Tabela 44</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes produzidos e estocados durante 9 semanas à temperatura ambiente.	cxlv
<b>Tabela 45</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com o lote de leite produzido e estocado durante 11 semanas à temperatura ambiente.	cxlvi
<b>Tabela 46</b> - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes produzidos e estocados durante 13 semanas à temperatura ambiente.	cxlvi
<b>Tabela 47</b> - Avaliação dimensional da garrafa.	cli
<b>Tabela 48</b> - Distribuição de espessura da garrafa.	cli
<b>Tabela 49</b> - Espessura da tampa e do lacre laminado de vedação.	cliii

<b>Tabela 50</b> - Peso da garrafa plástica. ....	cliv
<b>Tabela 51</b> - Volume da garrafa plástica. ....	clv
<b>Tabela 52</b> - Taxa de permeabilidade ao oxigênio de embalagens para leite longa vida. ....	clviii
<b>Tabela 53</b> - Determinação de opacidade de embalagens para leite longa vida. ....	clix

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Comportamento das vendas de leite longa vida no Brasil .....	xxiv
<b>Figura 2</b> - Diagrama simplificado de um sistema asséptico. ....	xxx
<b>Figura 3</b> - Mistura estabilizada de ácido acético, peracético e peróxido de hidrogênio. ....	xxxiv
<b>Figura 4</b> - Detalhes operacionais dos sistemas assépticos. ....	xxxvii
<b>Figura 5</b> - Efeito “cascata” de pressões em salas limpas. ....	xliv
<b>Figura 6</b> - Diagrama do processamento e envase asséptico utilizado no experimento. ....	lxxxv
<b>Figura 7</b> - Desenho da área limpa utilizada no acondicionamento asséptico do leite. ....	xc
<b>Figura 8</b> - Pontos monitorados na linha de filtração de água para enxágüe das garrafas. .....	xcvi
<b>Figura 9</b> - Esquema da metodologia do teste de esterilidade comercial de leite. ....	xcix
<b>Figura 10</b> - Esquema da fase 1 do procedimento para detecção do contaminante. ....	c
<b>Figura 11</b> - Esquema da fase 2 do procedimento para detecção do contaminante. ....	ci
<b>Figura 12</b> - Gráfico de médias de notas para aparência dos lotes de leite produzidos. ....	cxlviii
<b>Figura 13</b> - Gráfico de médias de notas para aroma dos lotes de leite produzidos. ....	cxlviii
<b>Figura 14</b> - Gráfico de médias de notas para sabor dos lotes de leite produzidos. ....	cxlix
<b>Figura 15</b> - Gráfico de médias de notas para impressão global dos lotes de leite produzidos. ....	cxlix
<b>Figura 16</b> - Embalagem utilizada no experimento. ....	clii



## *Índice de anexos*

<b>Anexo 1</b> - Lay out da planta piloto utilizada no processamento e envase asséptico de leite, construída no DTA/FEA/UNICAMP.....	clxxxii
<b>Anexo 2</b> - Lay out da área limpa. ....	clxxxvi
<b>Anexo 3</b> - Fotos dos equipamentos da planta piloto.....	cxcii
<b>Anexo 4</b> - Ficha utilizada na avaliação sensorial de leite longa vida. ....	cxcvii
<b>Anexo 5</b> - Certificações da área limpa .....	cxcvii
<b>Anexo 6</b> - Histogramas de frequência de notas dos testes de aceitação do leite. ....	cc
<b>Anexo 7</b> - Histogramas de intenção de compra dos provadores na avaliação sensorial do leite. ....	ccxvi

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABLV – Associação Brasileira de Leite Longa Vida  
AL/PEBD – alumínio/polietileno de baixa densidade  
ANOVA – análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*  
APA – ácido peracético  
APC – *airborne particle counter*  
APHA – *American Public Health Association*  
ASTM – *American Society for Testing and Materials*  
BPF – Boas Práticas de Fabricação  
CETEA – Centro de Tecnologia de Embalagem  
CIP – *clean in place*  
DTA – Departamento de Tecnologia de Alimentos  
EVOH – copolímero de etileno com álcool vinílico  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FEA – Faculdade de Engenharia de Alimentos  
FS – *Federal Standard*  
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
GMC – Grupo de Mercado Comum  
HEPA – *high efficiency particulate air*  
HTST – *high temperature short time*  
ICMSF – *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*  
ISO – *International Standard Organization*  
IEST – *Institute of Environmental Science and Technology*  
MAA – Ministério da Agricultura e Abastecimento  
mmca – milímetros de coluna de água  
NASA – *National Aeronautics and Space Administration*  
NBR – Norma Brasileira  
Pa – Pascal  
PDA – *potato dextrose agar*  
PEAD – polietileno de alta densidade  
PET – polietileno tereftalato

RN – Resolução Normativa

RODAC – *replicate organism direct agar contact*

SBCC – Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

SIP – *sterilization in place*

TGE – *tryptone glucose extract*

TiO<sub>2</sub> – dióxido de titânio

TPO<sub>2</sub> – taxa de permeabilidade ao oxigênio

UFC – unidades formadoras de colônia

UHT – *ultra high temperature*

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UR – umidade relativa

USDA – *United States Department of Agriculture*

## *resumo*

O objetivo desta pesquisa consistiu na adaptação e avaliação do desempenho de um sistema asséptico piloto para leite fluido em garrafa plástica. O sistema foi avaliado através da identificação e monitoração sistemática de pontos de controle do processo, testes de esterilidade comercial, análises sensorial e físico-química do produto e avaliação da embalagem. Os pontos de controle foram monitorados antes e simultaneamente aos processamentos, a saber: tratamento térmico do leite; conformidade operacional da sala de envase, incluindo pressurização, taxa de movimentação de ar, contagem de partículas totais e microrganismos no ar e avaliação de limpeza e sanificação de superfícies; análise microbiológica da água de enxágüe da linha de processamento e envase, análise das embalagens e de sua água de enxágüe.

Quatro lotes de 150L de leite com pH próximo a 6,7 foram processados entre 135 a 144°C durante 10s em um trocador de calor a placas e acondicionados assepticamente em garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD) de 500mL, em uma sala limpa ISO classe 7. A assepsia das embalagens foi feita através de aspersão de uma mistura contendo 0,5% de ácido peracético e 0,8% de peróxido de hidrogênio a 30°C/10s. O leite processado através do sistema asséptico piloto avaliado foi comparado ao leite longa vida comercial em embalagens cartonadas e em garrafas plásticas de PEAD de alta barreira, aplicando-se testes de aceitação sensorial.

Os resultados da avaliação dos pontos de controle do processo indicaram um bom desempenho apresentado pelo sistema desenvolvido, justificado pelas baixas contagens ou ausência de microrganismos nos pontos avaliados. Dos 4 lotes processados, 2 atingiram a esterilidade comercial, baseado nos critérios físico-químicos e microbiológicos adotados. A vida útil do produto, estimada através de testes sensoriais, atingiu 4 semanas para os dois primeiros lotes produzidos, 8 semanas para o lote 3 e 11 semanas para o lote 4. A opacidade das embalagens utilizadas na pesquisa foi de 90%, inferior a opacidade das embalagens comerciais, que foi de 100%. Portanto, a barreira à luz foi considerada insuficiente para a embalagem em avaliação, em virtude da elevada sensibilidade do leite à fotoxidação.

Concluiu-se que o sistema asséptico piloto avaliado correspondeu às expectativas de desempenho, devendo, entretanto, ser submetido à implementação de melhorias em sua infra-estrutura para que possa ser eventualmente disponibilizado para processamentos em pequena escala, visando a produção de leite comercialmente estéril acondicionado em garrafas plásticas.

## SUMMARY

The objective of this research was the adaptation and performance evaluation of a pilot aseptic system for liquid milk filled into plastic bottles. The system was evaluated by identifying and systematically monitoring the process control points, by commercial sterility tests, sensory, physical and chemical analyses of the product and an evaluation of the packaging. The control points were monitored before and during process as follows: heat treatment of the milk; operational conformity during filling in the aseptic room including pressurization, air movement rate, total and viable particle count and evaluation of surface cleanliness and sanitation; microbiological analyses of the rinsing waters used in the process and filling lines and an analysis of the packages and their rinsing water.

Four 150L batches of milk with pH values of about 6.7 were heat processed between 135 and 144°C for 10s in a plate heat exchanger and filled aseptically into 500mL high density polyethylene (HDPE) bottles in an ISO class 7 clean room. The aseptic condition of the bottles was obtained by spraying with a mixture containing 0.5% peracetic acid and 0.8% hydrogen peroxide for 10s at 30°C. The processed milk using the pilot aseptic system was compared by sensory analysis with commercial long life milk filled into carton-type packages and plastic bottles.

The results of the microbial evaluation of the control points indicated good performance of the system developed based on the low counts and absence of microorganisms at some evaluated points. Of the 4 batches processed, 2 attained commercial sterility based on the physical-chemical and microbiological criteria adopted. The shelf life of the product, estimated according to the sensory tests, was 4 weeks for the first two batches processed, 8 for batch 3 and 11 for batch 4. The opacity of the packaging used was 90%, lower than that of commercial packaging, which was 100%. Thus the light barrier property was considered inadequate considering the high sensitivity of milk to the photooxidation.

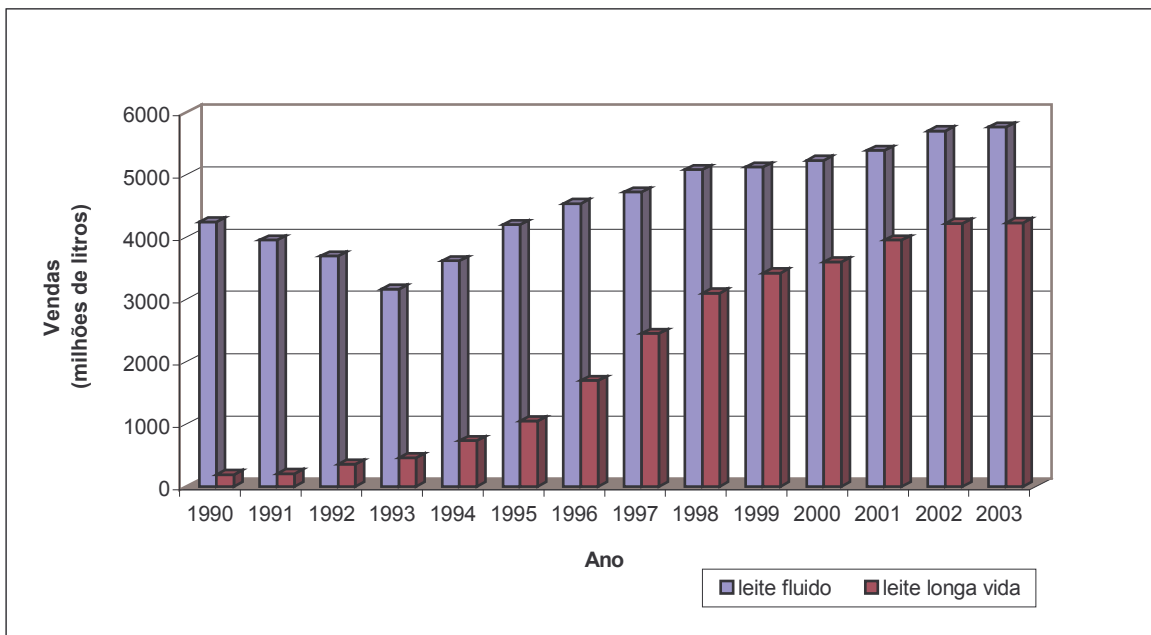
It was concluded that the pilot aseptic system evaluated corresponded to the performance expectations, however, it should be submitted to some implementations of improvements in its infrastructure in order to be recommended for small-scale commercially sterile milk production.

## 1 introdução

O crescimento no consumo de produtos que proporcionam maior conveniência e praticidade ao consumidor final tem sido notável na última década. Os alimentos que apelam à praticidade como leite longa vida são os que mais crescem no mercado brasileiro porque são ideais para um mundo em que o tempo é cada vez mais escasso. Segundo dados do instituto de pesquisa ACNielsen, essa categoria de produtos foi a que mais cresceu nos últimos anos no Brasil. As vendas de leite longa vida aumentaram de 620 milhões de litros em 1995 para quase 2 bilhões de litros em 1999 (Mano, 2000).

O Brasil está entre os maiores produtores de leite do mundo. Mas ainda tem um longo caminho pela frente na busca do padrão tecnológico nesse setor dos mercados mais desenvolvidos. A conquista de oportunidades no exterior é outro desafio, pois o país precisa também vencer barreiras comerciais (Ribas, 2003).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo. No entanto, em termos de consumo ocupa a 17<sup>a</sup> posição mundial com apenas 80L/habitante/ano. Na década de 1990, a produção nacional saltou de 8 bilhões para 21 bilhões de litros anuais. O leite mais consumido no país e que ainda busca a qualidade total é o tipo C que serve de matéria-prima tanto para o pasteurizado quanto para o longa vida e bebidas lácteas (De Martino, 2001). O fato marcante da última década no Brasil foi o crescimento no mercado de leite longa vida, de 4,4% em 1990 para 73,3% em 2003, conforme estatísticas da ABLV (2004), ilustrado pela Figura 1.



**Figura 1** - Comportamento das vendas de leite longa vida no Brasil .

Cada país apresenta um perfil peculiar de comportamento de consumo. Nos EUA, por exemplo, registra-se o maior consumo de leite pasteurizado do mundo. Já em muitos países da África somente o leite em pó é comercializado, não existindo consumo de leite pasteurizado ou longa vida ou tratado termicamente e pronto para beber. Na Europa é incomum o consumo de leite em pó para consumo direto, havendo um equilíbrio entre o consumo de leite pasteurizado e longa vida (De Martino, 2001).

No segmento lácteo, o leite processado pelo sistema a ultra alta temperatura (UHT) tornou-se um produto de destaque e fácil comercialização. Para o setor industrial, proporcionou a comercialização de produtos a longas distâncias, prescindindo de refrigeração, o que antes era impossibilitado por fatores climáticos e de extensão territorial. Os fatores relacionados ao aumento da demanda seriam a preferência do consumidor, a grande concorrência entre os laticínios, a instalação de novas indústrias no país e crescimento do *marketing* das indústrias de equipamentos (Bizari et al, 2003).

Os problemas relacionados à produção de leite longa vida decorrem, principalmente, da interpretação errônea de que o processo corrigiria todos os defeitos anteriores da matéria-prima, principalmente os de ordem microbiológica, uma vez que promoveria a “esterilização” do produto. Todavia, os consumidores



têm se deparado com embalagens estufadas ou leite gelificado, dentro do prazo de validade. Isso se deve à baixa qualidade do leite cru, pois o processo UHT, quando aplicado à matéria-prima adequada, apresenta elevada eficiência (Prata, 1997 apud Bizari et al, 2003).

No decorrer dos anos, o leite tem passado não só por processos diferentes com o intuito de prolongar sua vida útil, mas também tem mudado de sistemas de embalagem. O sistema de acondicionamento asséptico em garrafas plásticas vem se destacando pelas amplas vantagens que apresenta em relação aos outros. Nesse segmento, a tecnologia de áreas limpas, bastante presente na indústria farmacêutica e setor hospitalar, começa a ganhar notoriedade nas indústrias alimentícias do país, revelando-se uma importante aliada ao processamento e acondicionamento asséptico de alimentos. Neste sistema, as medidas de higiene são muito mais exigentes do que em outros processos de envase.

O acondicionamento asséptico de alimentos pré-esterilizados tem alcançado um elevado nível de tecnologia e está ganhando cada vez mais importância, tornando-se tema de grande interesse entre os distribuidores e fabricantes de alimentos e bebidas. Tal fato é consequência do aumento da vida útil sem a necessidade do uso de refrigeração ou adição de conservadores químicos ao produto, da redução de perdas e custos de distribuição e estocagem além de uma maior conveniência no uso final (Reuter, 1993).

O sistema asséptico, no entanto, não é uma tecnologia atual ou moderna. Estudos sobre este tema vêm sendo realizados desde o início do século XX, com os mais variados tipos de alimentos. Embora o tratamento térmico para esterilização de leite em garrafas tivesse sido realizado por Louis Pasteur, foi por volta de 1960, quando as tecnologias de processamento e acondicionamento asséptico tornaram-se comercialmente disponíveis, que a aplicação do processo UHT iniciou-se (Cordier, 1990).

O sistema de acondicionamento asséptico de alimentos pressupõe a utilização de máquinas fechadas e/ou utilização de áreas limpas, para impedir a introdução, geração e retenção de partículas no ambiente e consequente contaminação do produto. A climatização e o tratamento do ar em indústrias alimentícias são 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 nesse setor em indústrias alimentícias têm sido crescentes (Climatização..., 2000). Devido à preocupação com a contaminação, processos e manipulação de ingredientes e alimentos estão cada vez mais sendo realizados em áreas limpas ou ambientes controlados. A tecnologia de sala limpa permite atender padrões rigorosamente definidos de pureza e esterilidade do ar, sendo possível diminuir custos e melhorar a qualidade e segurança do alimento (Salas limpas..., 1999).

A vantagem do ponto de vista de marketing, do uso de embalagens plásticas em sistemas assépticos, está na variedade de formas que esses materiais podem assumir na embalagem final. Os plásticos têm importante função na contenção e proteção de alimentos e bebidas e são amplamente adotados pelas vantagens que apresentam em relação a outros materiais (Brown, 1992).

A expansão do consumo de bebidas fez intensificar as pesquisas de desenvolvimento na busca de opções de novas embalagens, como as garrafas plásticas. Comparado aos laminados cartonados (embalagens tipo longa vida), a garrafa plástica se destaca por apresentar importantes vantagens como: maior facilidade na reciclagem, causando menor impacto ambiental, “empatia” que o consumidor demonstra por este tipo de embalagem, mais variedades de fechamento, podendo a embalagem ser novamente fechada após sua abertura, facilidade de uso e possibilidade de eliminação de agentes químicos esterilizantes (no processo de sopro/enchimento/fechamento) (Romano et al, 1998).

Tendo em vista o sólido e crescente mercado consumidor de leite longa vida, demonstrado pelos sistemas que utilizam embalagens cartonadas e garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD), assim como o amplo potencial de desenvolvimento de sistemas de envase asséptico em garrafas plásticas, utilizando a tecnologia de áreas limpas para acondicionamento de alimentos; esta pesquisa visou a adaptação e avaliação de um sistema asséptico projetado para leite e produtos diferenciados de menor volume de produção como leites especiais, leite de cabra, leite de soja e similares.

Os sistemas comercialmente disponíveis envolvem investimentos de grande capital, por serem projetados para processos em grande escala. O sistema avaliado nesta pesquisa foi adaptado para atender pequenas escalas de

produção, tendo sido, inicialmente, desenvolvido para sucos e outros produtos similares, por pesquisas financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

## 2 *objetivos*

Os objetivos centrais desta pesquisa foram:

- Adaptar um sistema asséptico em escala piloto para leite fluido acondicionado em garrafa plástica;
- Avaliar o desempenho do sistema através da identificação e monitoração sistemática de pontos de controle do processo e testes de esterilidade comercial do produto;
- Determinar a vida útil do leite à temperatura ambiente, através de testes de aceitação sensorial;
- Avaliar a adequação do sistema de embalagem com relação à vida útil do produto.

### 3 *revisão bibliográfica*

#### 3.1 sistemas assépticos

Os processos modernos de acondicionamento visam o aumento do tempo de vida útil do produto, a redução do uso de conservadores químicos e da necessidade de refrigeração. Neste contexto, as técnicas de assepsia, que são básicas para a indústria farmacêutica, vêm sendo cada vez mais empregadas no setor alimentício.

A embalagem asséptica de alimentos não é um conceito dos tempos modernos. Na Dinamarca, antes de 1913, Nielsen, aplicando um processo de embalagem asséptica de leite estéril ultra-aquecido, obteve a sua patente, denominado processo de conservação asséptico. Em 1917, nos EUA, Dunkley patenteou o processo de esterilização de latas e tampas com vapor saturado e subsequente enchimento de um produto pré-esterilizado. Em 1923, o leite acondicionado assepticamente em uma planta na África do Sul chegou ao mercado de Londres em perfeita condição (Reuter, 1989). Nas últimas décadas, um grande desenvolvimento tem ocorrido nesse campo e atualmente muitos setores da indústria de alimentos consideram a embalagem asséptica como parte comum da tecnologia industrial.

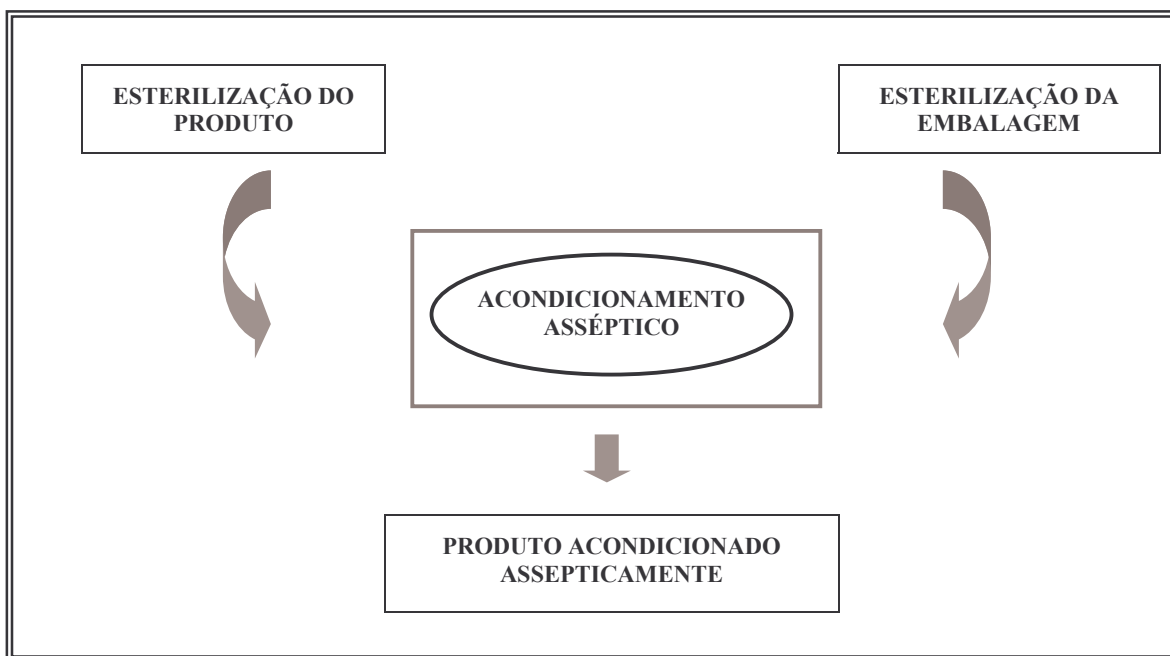
No passado, a implementação de processos de embalagem asséptica foi motivada pelo desejo de se utilizar materiais termoplásticos. Atualmente, a aplicação de processos assépticos com o objetivo de melhorar a qualidade do produto conquistou um grau de importância similar (Bischoff, 1988)

O acondicionamento asséptico exige medidas de higiene muito mais rigorosas do que em outros processos de embalagem. 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.

O acondicionamento asséptico pressupõe um produto livre de contaminantes, uma embalagem estéril e um processo com um baixo risco de contaminação. O envase asséptico em garrafas plásticas pode ser considerado uma inovação e oferece as seguintes vantagens em relação às outras alternativas (Roland, 1996):

- Redução no custo do material de embalagem;
- Melhor retenção das características sensoriais e nutricionais, resultante de um tratamento térmico menos drástico ao produto;
- Extensa vida útil prescindindo de uma cadeia de frio para distribuição.

A Figura 2 representa um esquema simplificado do sistema asséptico.



**Figura 2** - Diagrama simplificado de um sistema asséptico.

### 3.1.1 Caracterização dos sistemas assépticos

Os sistemas assépticos, conforme citados por Carlson (1971), Rees (1991) e Reuter (1989), podem ser divididos em três etapas distintas:

#### 3.1.1.1 Esterilização comercial do produto

Visa a destruição ou inativação de enzimas e microrganismos, incluindo seus esporos, que podem causar alterações indesejáveis ao produto, podendo incluir desde modificações no aroma e sabor até a produção de toxinas. A esterilização térmica, ultrafiltração, irradiação e utilização de altas pressões figuram entre as principais tecnologias aplicadas para atingir tal condição.

### 3.1.1.2 Esterilização da embalagem

Objetiva eliminar ou inativar microrganismos ou quaisquer matérias estranhas ao sistema que possam contaminar o produto e promover alterações indesejáveis, sob as condições de distribuição e estocagem.

Uma superfície que entra em contato com um alimento deve ser tão limpa e sanitária quanto o equipamento utilizado no processamento. Isso pode ser justificado pelo fato de que a contaminação da embalagem pode representar contaminação pós-processo; isto é, não há operação terminal para destruição ou remoção de microrganismos que podem estar presentes no alimento, como resultado de uma esterilização inadequada da embalagem. No caso de alimentos que são processados na embalagem, como os enlatados, normalmente isso não é um problema. Os materiais de embalagem devem ter uma contagem microbiana de superfície baixa quando são fabricados e devem ser esterilizáveis, de modo que a 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 com propósitos específicos (Troller, 1993).

O material destinado às embalagens assépticas deve ser resistente aos agentes e processos de esterilização, permitir o enchimento asséptico e garantir a integridade do fechamento durante as etapas de comercialização do produto. Entre os requisitos que determinam a eficiência de um sistema de esterilização de material de embalagens, incluem-se: apresentação de um bom efeito esporicida em um tempo viável, possibilidade de esterilização em processo contínuo com velocidade adequada ao volume de produção, compatibilidade com o material embalagem, facilidade de remoção do agente esterilizante da superfície da embalagem, evitando possíveis resíduos, exclusão de perigos à saúde do consumidor, não redução da qualidade do produto final, mesmo quando seu residual for superior ao valor permitido pela legislação e, finalmente, isento de perigos à saúde dos operadores (Robertson, 1983, Bertrand, 1984 e Anon, 1971).

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 e Faria, 1999). Pesquisas têm comprovado que o grau de esterilização obtido na embalagem depende do nível

de contaminação inicial, da área da embalagem e da eficiência do processo de esterilização. Exemplos destes processos incluem os listados na Tabela 1, classificados em físicos e químicos. A combinação entre os diferentes métodos resulta, freqüentemente, em uma maior eficiência.



**Tabela 1** - Métodos aplicados na assepsia de materiais de embalagem.

MÉTODOS FÍSICOS	MÉTODOS QUÍMICOS
<i>Processos Mecânicos</i>	‣ tratamento com $H_2O_2$ (solução a 15 - 35%)
‣ enxágüe com água	‣ $H_2O_2$ + ultravioleta
‣ jato de ar	‣ tratamento com ácido peracético (0,1 - 1%)
‣ ultra som	‣ ácido peracético + álcool
<i>Processos Térmicos</i>	‣ ácido peracético + $H_2O_2$
‣ vapor saturado	‣ álcoois
‣ vapor superaquecido	‣ óxido de etileno
‣ ar quente	‣ ozônio
‣ misturas de ar quente e vapor	‣ cloro
‣ aquecimento por extrusão	
‣ gases aquecidos ( $N_2$ , He, $O_2$ , $CO_2$ )	
<i>Processos por Irradiação</i>	
▪ radiação ionizante	
‣ raios gama	
‣ raios X	
▪ radiação ultravioleta	
▪ radiação infravermelho	

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

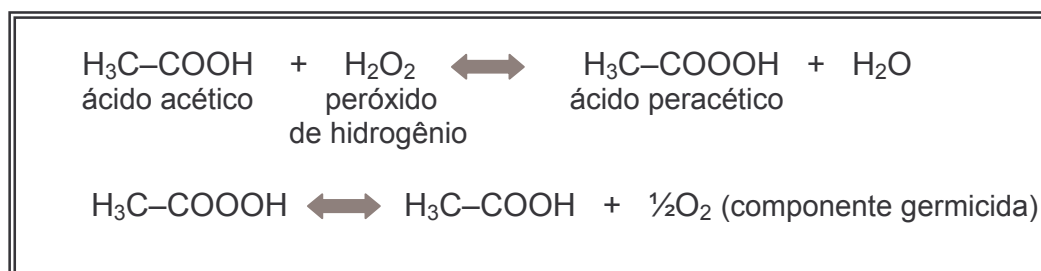
Os métodos químicos, particularmente aqueles que utilizam ácido peracético ( $C_2H_4O_3$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como ingredientes ativos na solução esterilizante, foram os de maior interesse para o desenvolvimento desta pesquisa, baseado em testes realizados por Faria (1999), Petrus et al (2000) e Abreu (2001).

### 3.1.1.2.1 Ácido peracético

O ácido peracético é o princípio ativo de diversos produtos comercialmente disponíveis para sanificação e esterilização de equipamentos industriais. De acordo com Leitão<sup>1</sup>, a solução esterilizante é constituída por uma mistura estabilizada de ácido peracético, ácido acético e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como mostra a Figura 3.

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 seja também proveniente da ação coadjuvante do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, normalmente existente nas formulações comerciais.

As soluções diluídas deste esterilizante, nas concentrações normalmente sugeridas (0,05 - 0,1%) para a indústria de alimentos, são aprovadas nos testes de diluição de uso e de suspensão. Estes testes são amplamente aceitos na avaliação da eficiência microbiológica de sanificantes (Andrade e Macêdo, 1994).



**Figura 3** - Mistura estabilizada de ácido acético, peracético e peróxido de hidrogênio.

Segundo Leitão<sup>1</sup>, o ácido peracético é um agente oxidante muito potente que reúne vantagens importantes como: amplo espectro de ação sobre microrganismos, sendo eficiente contra esporos, tolerância relativa à matéria orgânica, aprovado pelos Ministérios da Saúde e Agricultura, não polui o meio ambiente, eficiente a baixas temperaturas, não mancha e não produz espuma, compatível com aço inoxidável, alumínio e polímeros, concentração facilmente determinada e relativa facilidade de manuseio da solução de uso, já que esta é pouco irritante e pouco corrosiva, a concentrações inferiores a 0,1%. As suas principais limitações são a baixa estabilidade da solução de uso a temperatura

<sup>1</sup> Anotações de aula. Campinas, Unicamp/FEA, 1998.

ambiente e o odor residual acético deixado na superfície sanificada ou esterilizada, tornando-se necessário, algumas vezes, o enxágüe da mesma com água.

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. Além disso, o ácido acético, produto de sua decomposição, não é tóxico. 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).

#### 3.1.1.2.2 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 e Nelson, 1993). A eficiência do  $H_2O_2$  pode ser consideravelmente potencializada se combinado com calor, radiação ultravioleta ou infravermelho (Shapton e Shapton, 1991). Para produtos cujo pH é inferior a 4,5, procedimentos menos severos podem ser empregados na esterilização da embalagem (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 e Nelson, 1993), não sendo nocivo ao meio ambiente (Block, 1992).

O  $H_2O_2$  foi regulamentado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1981, mas já era utilizado na Europa anteriormente. As normas da FDA determinam que a concentração máxima de 35% de  $H_2O_2$  pode ser utilizada para as superfícies em contato com o alimento. As exigências para resíduos estabelecem que, não mais do que 0,5mg/L de  $H_2O_2$  pode estar presente nos testes feitos com água destilada envasada sob as condições de produção. Estas normas aplicam-se também aos produtos regulados pelo *United States Department of Agriculture* (USDA), de acordo com o *Food Processors Institute* (1989).

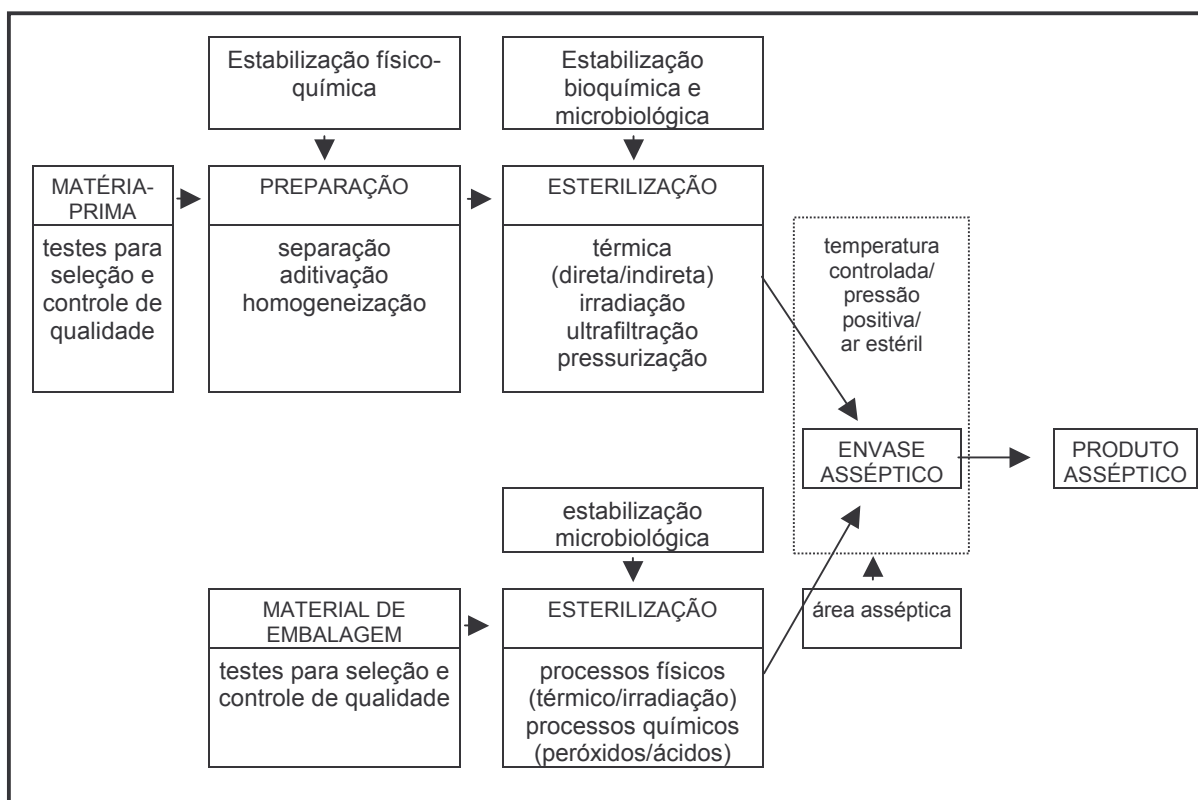
### 3.1.1.3 Acondicionamento asséptico

Tem a finalidade de evitar que o produto e o material de embalagem sofram recontaminação durante a etapa de enchimento e fechamento da embalagem.

Para que o acondicionamento do produto seja realizado em um ambiente asséptico, os equipamentos de envase, esterilização do material de embalagem e esterilização do produto devem apresentar as seguintes características: estar devidamente conectados, ser de grau sanitário, possibilitar sua esterilização antes da produção, ser capaz de manter sua condição estéril durante a produção e ser viável do ponto de vista econômico e energético (Marcy e Nagy, 1986).

A sala de envase deve sofrer limpezas e sanificações freqüentes, bem como ser condicionada a baixa temperatura e com pressão positiva, alimentada com ar estéril (Agenew, 1973). Estabelecidas as condições adequadas à produção, a zona asséptica passará a ser rigorosamente controlada, de modo a detectar e indicar qualquer falha no processo.

A Figura 4 detalha as etapas e os componentes dos sistemas assépticos, conforme (Romano et al, 1998).



**Figura 4** - Detalhes operacionais dos sistemas assépticos.

Verifica-se, além das vantagens já mencionadas, uma redução no consumo de energia durante as diferentes etapas do processo produtivo, tais como: na esterilização do produto, na produção e esterilização da embalagem, no transporte e armazenamento, já que os produtos processados assepticamente são estáveis à temperatura ambiente (Reuter, 1989).

Quando comparadas às embalagens como as latas e os vidros, as cartonadas ou as plásticas apresentam uma estabilidade mecânica inferior, estando, portanto, mais vulneráveis durante o transporte e comercialização.

Como limitações, os sistemas assépticos exigem investimentos elevados, com custos operacionais superiores aos sistemas tradicionais. Os equipamentos incorporam um maior número de fontes potenciais de contaminação, no qual o envase asséptico apresenta-se como a etapa mais crítica, necessitando-se de mão-de-obra técnica especializada (Romano et al, 1998).

### 3.1.2 Embalagens plásticas para sistemas assépticos

O desenvolvimento de novos métodos para a esterilização do material de embalagem, principalmente aqueles que poderiam ser realizados à baixa

temperatura, bem como o aprimoramento das máquinas de envase asséptico, colaboraram definitivamente para a introdução de novos materiais de embalagem no mercado de assépticos (Anon, 1971). É importante ressaltar que a tecnologia asséptica permitiu que materiais de embalagens de baixa resistência térmica fossem utilizados em processos que tradicionalmente utilizavam o enchimento à quente, e agora poderiam fazê-lo a frio, como ocorreu, há alguns anos, com as embalagens de PET (Rice, 1993).

De acordo com Romano et al (1998), Nicolas (1995) e Drennan (1983), entre as principais vantagens oferecidas pela utilização de garrafas plásticas em sistemas assépticos, quando comparadas às embalagens cartonadas, incluem-se:

*Variedade de volumes e formatos*

Vantagem que possibilita a fabricação de embalagens personalizadas, diferentemente do que ocorre com as embalagens cartonadas que apresentam um formato único, diferenciando-se apenas pela capacidade volumétrica e impressão gráfica;

*Possibilidade de produzir embalagem própria*

Fato inerente a todas as embalagens plásticas que podem ser produzidas pelo próprio usuário, cuja disponibilidade de fornecedores é superior, quando comparadas às cartonadas;

*Facilidade de reciclagem*

Quando utilizados polímeros mais nobres como PET, tem-se a possibilidade de reciclar o material de embalagem sem maiores dificuldades e sem prejuízo ao ambiente, em contraste aos cartonados laminados com folha de alumínio, cuja reciclagem é mais complexa;

*Embalagens transparentes*

Permite que o consumidor visualize o produto, quando requisitado, a despeito de favorecer reações fotooxidativas;

*Possibilidade de eliminação de agentes químicos esterilizantes*

O sistema tipo *blow/fill/seal* (sopra/enche/sela) elimina a necessidade de utilização de agentes esterilizantes, como o peróxido de hidrogênio, cujo resíduo no produto muitas vezes não é devidamente controlado;

*Facilidade de manuseio e fechamento*

As embalagens plásticas possibilitam maiores variedades de fechamento, diferentemente das embalagens cartonadas, cujos dispositivos podem representar custos significativos em relação ao preço final do produto, o que muitas vezes inviabiliza a sua aplicação. Pode-se incorporar também alças ou dispositivos que facilitem o manuseio de embalagens de volumes maiores, como de 1,5L.

### 3.1.3 Origem de problemas microbianos em sistemas assépticos

As três principais causas da contaminação microbiana em plantas de leite UHT são a redução da temperatura de esterilização, ineficiência e descuido na utilização do equipamento de esterilização e falha nos procedimentos de assepsia durante o envase (Mehta, 1980).

Numa produção asséptica, a presença de unidades não comercialmente estéreis pode ser atribuída a uma ou mais das seguintes causas (Von Bockelmann, 1988):

- Construção inadequada de equipamentos;
- Instalação incorreta da linha de produção;
- Falhas na manutenção preventiva da planta;
- Falhas operacionais;
- Qualidade deficiente da matéria-prima;
- Manuseio e distribuição inadequados do produto final.

Segundo Cerny (1993), existem três pontos principais onde problemas microbianos podem surgir no decurso do processamento e embalagem asséptica, a saber:

- Durante a esterilização do produto, este pode ser insuficientemente aquecido no trocador de calor, caracterizando um subprocessamento;
- Após a esterilização e durante o enchimento o produto pode ser recontaminado após o processamento térmico, através de tubulações e tanques sem a adequada assepsia. Durante a operação de enchimento, a contaminação de origem aérea no local de embalagem também pode ocorrer;
- Após a embalagem o produto pode ser recontaminado com microrganismos presentes no material de embalagem se essa não tiver sido adequadamente esterilizada. Embalagens seladas não hermeticamente também podem levar o produto à deterioração se contaminadas por microrganismos de origem aérea.

### 3.2 CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A ênfase na prevenção e controle de contaminação tem crescido rapidamente na indústria alimentícia nos últimos anos. Uma razão para isso é o crescimento no número de relatórios documentando a ocorrência das doenças de origem alimentar (Friis, 2000).

A exigência pela qualidade e segurança na produção de alimentos é crescente e a importância do ar como vetor de contaminantes microbianos no processamento 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 e Luchese, 1999). Como informação geral, a Tabela 2 relaciona o tipo de contaminante com sua respectiva fonte mais relevante.



**Tabela 2** - Exemplos de tipos de contaminantes e suas respectivas fontes.

TIPO DE CONTAMINANTE	EXEMPLO	FONTE
Não-viável (partículas)	‣ Partículas de metal	‣ Equipamentos
	‣ Fibra de tecido	‣ Vestimentas
		‣ Ar externo
		‣ Ar interno
		‣ Suprimento de água
Viável (microrganismos)	‣ Bactérias	‣ Pessoal
	‣ Fungos	‣ Água
	‣ Vírus	‣ Ar externo
	‣ Protozoários	‣ Ar interno
		‣ Ferramentas
Gases	‣ Ozônio	‣ Ar interno
	‣ Compostos orgânicos voláteis	

Fonte: Moia (2001) e Bearg (1993).

### 3.2.1 Fontes de contaminantes do ar

Uma potencial fonte de contaminantes é o sistema de ar condicionado ou ventilação do ambiente em questão. Existe uma relação dinâmica entre a quantidade de ventilação necessária e os contaminantes presentes no ar: Quanto mais contaminantes presentes, maior a carga de ventilação necessária para atingir um certo nível de qualidade do ar. Os operadores também representam uma importante fonte de contaminantes para o ambiente, que podem ser agrupados em duas categorias: bioefluentes e microrganismos. O termo bioefluentes relaciona-se aos componentes químicos emitidos pelas pessoas, incluindo odores do corpo e perfumes exalados. O CO<sub>2</sub> expirado é também considerado um bioefluente (Bearg, 1993).

### 3.2.1.1 Microrganismos no ar

O ar é, sem dúvida, um grande veículo de microrganismos, especialmente esporos de bolores. 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 na 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).

Os microrganismos presentes no ambiente representam um obstáculo aos sistemas de acondicionamento porque o ar, normalmente, contém um grande número deles, principalmente bolores. Devido ao potencial de recontaminação do produto após o processamento, o resultado final seria sua deterioração (Grimm, 1998). Outro aspecto a considerar é que a contaminação não pode ser visualmente detectada por causa do tamanho microscópico das partículas suspensas no ar (Roland, 1996).

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

Existem várias formas para remover os microrganismos do ar. Uma delas é utilizar sistemas de filtros com fluxo unidirecional ou laminar (Al-Dagal e Fung, 1990). Filtros de ar particulados 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/m<sup>3</sup> 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/m<sup>3</sup> em plantas de embalagem de leite. Geralmente, as contagens de microrganismos no ar atingem valores de  $10^3$ UFC/m<sup>3</sup> durante um período normal de processamento.

### 3.3 TECNOLOGIA DE SALAS LIMPAS

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

A tecnologia de salas limpas tem encontrado aplicação ampla e diversificada, expandindo-se muito nas últimas décadas e variando seu *design* de acordo com a função desejada (Whyte, 1991). Muitas empresas estão utilizando salas limpas pela primeira vez, assim como diversas indústrias estão desenvolvendo seus produtos dentro de um rigoroso programa de controle de contaminação.

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

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

### 3.3.1 Evolução tecnológica

As primeiras salas limpas surgiram em hospitais, visto que já era reconhecido que a eliminação de bactérias nesses ambientes, especialmente em salas cirúrgicas, poderia prevenir a incidência de infecções hospitalares. O desenvolvimento de salas limpas no setor industrial iniciou-se durante a Segunda Guerra Mundial nos EUA e Reino Unido, principalmente, na tentativa de aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade da instrumentação utilizada em armas, tanques e aviões. As salas com grandes volumes de ar filtrado, insuflado através de difusores no teto passaram a ser construídas a partir de 1955 (Whyte, 1991).

Segundo Pelczar et al (1981), a miniaturização e as complexidades dos modernos equipamentos eletrônicos e a precisão dos instrumentos derivados da indústria aeroespacial resultaram no desenvolvimento das salas limpas, capazes de reduzir a possibilidade de partículas virem a contaminar os elementos funcionais.

Um marco na história das salas limpas foi o surgimento, em 1961, do conceito de fluxo de ventilação laminar ou unidirecional. Esse conceito foi rapidamente incluído em projetos de áreas limpas que exigem maior qualidade do sistema. Em 1963 foi elaborado o primeiro *Federal Standard 209* nos EUA, que teve grande influência no segmento, tendo servido, durante décadas, como base para a maioria dos padrões mundiais estabelecidos (Whyte, 1991).

Com a publicação da norma internacional ISO 14644, algumas empresas começaram a classificar suas salas limpas pelo sistema internacional de unidades, em função do número de partículas por metro cúbico de ar. A parte 1 da referida ISO (ISO 14644-1), publicada em 1999, trata da classificação da limpeza do ar de áreas limpas e ambientes controlados. A parte 2 (ISO 14644-2), publicada em 2000, apresenta especificações para ensaio e monitoramento para provar a contínua conformidade com a ISO 14644-1. Em 2001, o *Institute of Environmental Science and Technology* (IEST) anunciou o cancelamento oficial do *United States Federal Standard* (USFS 209E), e sua imediata substituição pelas partes 1 e 2 da ISO 14644 (Bennett, 2002).

### 3.3.2 Conceito de sala limpa

A tecnologia de salas limpas é uma alternativa moderna, embora os seus conceitos já estejam disseminados há muitas décadas. Uma sala limpa é definida

como aquela na qual a concentração de partículas no ar é controlada dentro de limites específicos, construída e utilizada de forma a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas no ambiente, onde a temperatura, umidade e pressão devem ser controladas, quando necessário (Whyte, 1991). Evita-se, neste caso, que materiais particulados ou microrganismos entrem em contato com o produto, podendo interferir na sua qualidade e até mesmo acarretar problemas de saúde para o consumidor final (Salas limpas...,1999).

### 3.3.3 Aplicações na indústria de alimentos

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

Na indústria de laticínios a utilização de salas limpas assume importante função no acondicionamento de leite de vida útil estendida, que pode atingir até 90 dias mantido sob refrigeração (Food and Dairy Expo, 1983). Na indústria de panificação, o processamento e embalagem de pães e bolos com maior tempo de vida útil, prescindindo da adição de conservadores, ocorre em salas limpas; importante também na fabricação de embutidos perecíveis e produtos cárneos como presunto cozido e lingüiça que podem ser fatiados e embalados em filmes plásticos, uma vez que não há nenhum tratamento adicional após a embalagem. Na indústria de bebidas, salas limpas são utilizadas durante o envase a temperatura ambiente de sucos de frutas livres de microrganismos e, portanto, de alta qualidade, tais como nos sistemas de embalagens assépticas. Na própria fabricação de embalagens para alimentos sensíveis (*baby food*, nutrientes) e fármacos são requeridos detalhes da tecnologia de salas limpas no processo de bobinas, frascos e demais recipientes. Portanto, essa é uma tecnologia cada vez mais presente no segmento de embalagens, incluindo frascos para remédios, filmes especiais e envase asséptico (Petrus e Faria, 2003).

### 3.3.4 Classificação de salas limpas

A classe de limpeza exigida em uma sala limpa é dependente da atividade nela desenvolvida. Em 1967 foi gerada a definição de ar limpo pelo *Federal Standard 209* (FS 209), oficialmente cancelado em 2001 e substituído pela ISO

14644. A essência daquela norma foi classificar o grau de limpeza do ar, tomando como base as partículas com tamanho de  $0,5\mu\text{m}$ . Assim sendo, quando uma determinada sala era Classe 10 000, a quantidade de partículas  $\geq 0,5\mu\text{m}$  por pé cúbico de ar era igual ou inferior a 10.000. Visando um melhor esclarecimento a Tabela 3 apresenta as classificações comparativas propostas pela ISO 14644-1 e pelo FS 209E.

**Tabela 3** - Classificação comparativa para salas limpas e ambientes controlados.

CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE PARTÍCULAS EM SUSPENSÃO NO AR							
ISO 14644-1			FEDERAL STANDARD 209E				
Classe de limpeza	$\geq 0,5\mu\text{m}$ /m <sup>3</sup>	$\geq 5,0\mu\text{m}$ /m <sup>3</sup>	Classe de limpeza	$\geq 0,5\mu\text{m}$ /m <sup>3</sup>	$\geq 5,0\mu\text{m}$ /m <sup>3</sup>	$\geq 0,5\mu\text{m}$ /pé <sup>3</sup>	$\geq 5,0\mu\text{m}$ /pé <sup>3</sup>
ISO classe 1	-	-	-	-	-	-	-
ISO classe 2	4	-	-	-	-	-	-
ISO classe 3	35	-	Classe 1	35	-	1	-
ISO classe 4	352	-	Classe 10	353	-	10	-
ISO classe 5	3 520	29	Classe 100	3 530	-	100	-
ISO classe 6	35 200	293	Classe 1 000	35 300	247	1 000	7
ISO classe 7	352 000	2 930	Classe 10 000	353 000	2 470	10 000	70
ISO classe 8	3 520 000	29 300	Classe 100 000	3 530 000	24 700	100 000	700
ISO classe 9	35 200 000	293 000	-	-	-	-	-

Fonte: adaptado de Bennett (2002).

A *Tabela 3* mostra que uma sala limpa antes denominada Classe 10 000 pela FS 209E recebe atualmente a designação ISO classe 7. Para as classes ISO 1, ISO 2 e ISO 9 não havia correspondentes na FS 209E. Observa-se ainda que o número máximo de partículas  $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$  permitido pela classe de limpeza da norma ISO é menor que o estabelecido pela classe equivalente 209E. Já para partículas  $\geq 5,0\mu\text{m}/\text{m}^3$ , o limite da classe estabelecida pelo ISO é maior que o limite da classe equivalente 209E.

De acordo com uma classificação proposta pela NASA, salas limpas e ambientes microbiologicamente controlados ISO classe 5, classe 7 e classe 8, devem apresentar no máximo 3,5; 17,7 e 88,3 microrganismos por metro cúbico de ar, respectivamente (Sveum et al, 1992).

As indústrias alimentícias que operam em sistemas assépticos e ultra-limpos, normalmente, utilizam ambientes ISO classe 7 e classe 8 (Faria, 1993). Existem ainda configurações onde a sala de acondicionamento é ISO 7 e o ponto de enchimento ou manipulação asséptica recebe a classificação ISO 5,

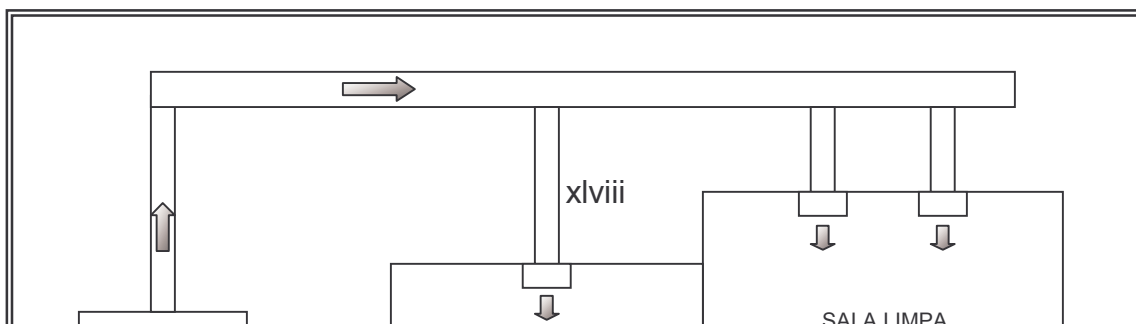
configuração também denominada “ilha”, proporcionando flexibilidade de *lay out*, custos de investimentos e operacionais relativamente baixos (Moia, 2001).

### 3.3.5 Características de salas limpas

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

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

Para garantir que o ar sujo das áreas adjacentes não acesse a sala limpa, esta é positivamente pressurizada, contribuindo para a manutenção de sua limpeza. Normalmente, pressões em salas limpas são positivas relativamente às áreas vizinhas, recomendando-se uma pressão de 12Pa ou 1,2 milímetros de coluna d'água (mmca) para o espaço limpo em relação às áreas não classificadas (Schneider, 2002). As salas limpas devem possuir um sistema de regulação de ar que garanta o ajuste das pressões ambientais entre as salas; ou seja, uma sala mais limpa que a outra deverá ter uma pressão de ar superior a de menor limpeza de no mínimo 1,2mmca. Esse sistema é conhecido e chamado de efeito “cascata”, onde uma sala mais limpa classificada despeja seu ar, através da pressão, para a sala de classe menos limpa, como ilustra a Figura 5 (ABS, snt).





**Figura 5** - Efeito “cascata” de pressões em salas limpas.

Como mostra a Figura 5, o sistema de ar condicionado gera uma situação de recirculação de ar pelas salas limpas do mesmo sistema, mantendo as classes de limpeza. Tem-se então a sala ISO classe 7 (mais limpa) com uma pressão de 2,4mmca em relação ao meio externo e a sala classe 8 (menos limpa) com uma pressão de 1,2mmca em relação ao meio externo e 1,2 mmca de pressão inferior à sala classe 7 (Petrus e Faria, 2003).

### 3.3.6 Operadores em salas limpas

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

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

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

### 3.3.7 Certificação de salas limpas

Com relação à certificação de uma sala limpa, esta é definida como o conjunto de testes realizados para a caracterização do desempenho deste ambiente, atestando sua conformidade com as especificações requeridas (Bennett, 1997).

Com base na Recomendação Normativa para Testes em Áreas Limpas, proposta pela Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC-RN-005-97), baseada no documento americano *IES-RP-CC-006.2, Testing Cleanrooms, Institute of Environmental Sciences*, são recomendados testes de desempenho em três estados ocupacionais, os quais avaliam e caracterizam o desempenho total do sistema. Esta recomendação não indica os limites de aceitação, porém fornece embasamento para a especificação de limites significativos. Os limites específicos de aceitação para cada teste devem estar sempre definidos no contrato.

Quanto ao regime de fluxo de ar, são indicados três tipos distintos de salas limpas, os quais afetam a metodologia de alguns testes, conforme a norma ISO 14644:

➤ Sala limpa com fluxo unidirecional (laminar)

Sala limpa onde o ar filtrado, em uma única passagem, atravessa a área de trabalho em fluxo paralelo pré-determinado, contando com um mínimo de áreas de fluxo turbulento. Deve ter um mínimo de 80% de área de insuflamento, seja no forro (fluxo vertical) ou em uma parede (fluxo horizontal), criando um deslocamento de ar filtrado com filtros absolutos, uniforme e paralelo. Nos filtros do sistema unidirecional, o ar se move com velocidade uniforme, ao longo de linhas de fluxo paralelo.

➤ Sala limpa com fluxo não-unidirecional (turbulento)

Sala limpa onde o ar filtrado entra no ambiente com velocidade não uniforme ou em fluxo turbulento.

‣ Sala limpa com fluxo misto

Sala limpa híbrida, consistindo na combinação das salas com fluxos unidirecional e não-unidirecional. Essas salas apresentam um padrão de fluxo de ar não uniforme ou aleatório, através do recinto.

Os estados ocupacionais mencionados são:

‣ Sala limpa como construída

Sala limpa completa e pronta para operar com todas as utilidades instaladas, porém sem pessoal e equipamentos de produção.

‣ Sala limpa em repouso

Sala limpa completa com todas as utilidades instaladas, incluindo equipamentos de produção montados e funcionando de forma previamente acordada entre usuário e fornecedor, porém, sem pessoal na sala.

‣ Sala limpa em operação

Sala limpa completa com todas as utilidades instaladas, com equipamentos de produção montados com pessoal presente na sala desenvolvendo suas funções normais.

### 3.4 FUNDAMENTOS Da higiene industrial

A higienização ou sanitização na indústria de alimentos visa basicamente a preservação da pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica dos alimentos; ou seja, obtenção de um produto que tenha uma boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo riscos à saúde do consumidor. Uma das conseqüências mais graves da má higienização nas indústrias é a contaminação dos alimentos, com a ocorrência de doenças de origem alimentar (Andrade e Macedo, 1996).

#### 3.4.1 Princípios básicos da higienização

A higienização divide-se em 2 etapas muito bem definidas: a limpeza e a sanificação. Nas etapas referentes à limpeza, o objetivo primordial é a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderentes às superfícies, sendo os principais resíduos as proteínas, as gorduras e os sais minerais. A etapa de sanificação objetiva eliminar microrganismos patogênicos e reduzir os deterioradores até níveis seguros ou estabelecidos pela legislação vigente. A limpeza, sem dúvida,

reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios. Por isso, a sanificação é indispensável. A limpeza deve ser sempre realizada ao final do processamento e a sanificação imediatamente antes do processamento seguinte (Andrade e Macedo, 1996).

De acordo com Grabhoff (1997), a limpeza deve ser feita, preferencialmente, com a linha montada (limpeza CIP), utilizando técnicas para controle e monitoração de todo o processo. O processo de limpeza é uma complexa reação de troca entre os componentes individuais da solução de limpeza e substâncias que se ligam, por forças de adesão, às superfícies metálicas dos equipamentos a distâncias inferiores a 5nm. Exemplificando, antes de sua remoção, os depósitos de resíduos de leite formados durante o tratamento térmico devem ser quimicamente transformados de forma que as interações da solução de limpeza com os depósitos tornem-se mais intensas do que aquelas dos depósitos com a superfície metálica.

Uma eficiente higienização é o resultado de um conjunto de fatores, onde se destacam as energias química, mecânica e térmica, além do tempo de contato usado no procedimento; sendo, ainda, fundamental a escolha correta dos agentes de limpeza e sanificação. Nesta seleção, deve-se analisar o tipo e grau dos resíduos aderentes às superfícies, a qualidade da água utilizada, a natureza da superfície a ser higienizada, os métodos de higienização aplicados e os tipos e níveis de contaminação microbiana (Andrade e Macedo, 1996).

### 3.4.2 Agentes de limpeza

Conforme descrito em SENAI/SEBRAE (1999), os principais agentes utilizados em limpeza são:

#### *Água*

A água é um solvente universal. Entretanto, não é, por si só, um agente de limpeza eficiente porque não possui a propriedade de umidecer bem as superfícies, pela tendência que tem a se aglomerar. A qualidade microbiológica e físico-química da água tem grande importância no resultado da limpeza.

#### *Detergente*

O detergente atua durante a limpeza removendo as sujidades, podendo conter vários componentes adicionados para exercer funções específicas, como:

- › Tensoativos

Têm por finalidade melhorar a qualidade umectante de penetração do produto, pela redução da tensão superficial;

- Agentes alcalinos

Favorecem a ação dissolvente sobre os alimentos sólidos e fornecem boa capacidade emulsificante, sendo utilizados na remoção de resíduos orgânicos;

- Ácidos

Atuam na remoção de resíduos minerais;

- Fosfatos

Sua ação principal é peptizar e dispersar resíduos protéicos, além de reduzir a precipitação de sais;

- Sequestrantes

São usados para evitar o depósito ou aglomeração de sais na superfície.

Segundo Grabhoff (1997), existem diferentes pontos de vista relativos à seqüência de limpeza ácida e alcalina. O procedimento mais usual inicia-se com a fase alcalina, removendo uma grande quantidade de resíduos que podem ser completamente desintegrados e removidos durante a fase de limpeza ácida. Na limpeza de trocadores de calor a placas, no entanto, Gilbert (1979), Perlat (1986) e Grabhoff (1993) obtiveram melhores resultados iniciando a limpeza com a fase ácida.

### 3.4.3 Agentes de sanificação

Após a limpeza, os sanificantes devem ser aplicados à superfície limpa visando a destruição de microrganismos. Os métodos de sanificação mais freqüentemente aplicados em plantas de laticínios utilizam vapor, água quente e agentes químicos (perácidos, peróxidos, compostos clorados, etc). A sanificação com vapor é um método com utilidade limitada, devido à dificuldade em se manter a temperatura constante na linha e aos custos de energia excessivos. Além disso, a aplicação de vapor pode ser mais perigosa que outros métodos de sanificação. A utilização de água quente é uma técnica que também resulta em gastos elevados com energia (Andrade e Macedo, 1996).

### 3.4.4 Avaliação microbiológica dos procedimentos de higienização

De acordo com Andrade e Macêdo (1996), as técnicas para avaliação microbiológica dos procedimentos de higienização podem ser implantadas com relativa facilidade. Entretanto, deve-se definir muito bem os padrões

microbiológicos para ambientes, manipuladores, utensílios e equipamentos. Este controle se insere dentro do contexto da gestão da qualidade total na indústria de alimentos, contribuindo para obtenção de um produto final de melhor qualidade.

Os testes em uso baseiam-se na remoção e recuperação dos microrganismos sobreviventes das superfícies sanificadas. A remoção dos microrganismos pode ser feita por atrito, como no método do *swab*, por contato, utilizando placas de RODAC, ou ainda por meio da lavagem da superfície com água destilada ou soluções apropriadas. A recuperação se faz conforme processos usuais de contagem usando neutralizantes adequados para o sanificante sob avaliação.

Estes testes também apresentam problemas, sendo que a verdadeira população microbiana de uma superfície, na maioria dos métodos, não é recuperada com exatidão. Por exemplo, a pressão exercida sobre a superfície quando se removem os microrganismos sobreviventes com o *swab*, pode influir nos resultados. As placas de contato devem ser utilizadas em superfícies levemente contaminadas, no máximo 10UFC/cm<sup>2</sup>, pois nesse método não ocorre diluição, já que é o próprio meio de cultura contido na placa que faz a remoção dos microrganismos. Pesquisas indicam ser o método de placa de contato melhor do que o *swab* para superfícies planas e regulares e o método do *swab* mais indicado para superfícies irregulares e com elevado número de microrganismos (Andrade e Macedo, 1996).

Além do procedimento de higienização em superfícies, é importante a avaliação das condições microbiológicas do ambiente, como a amostragem do ar.

A Tabela 4 apresenta as características das técnicas de contato e lavagem na amostragem de superfícies.

**Tabela 4** - Características das técnicas de amostragem de superfícies.

CARACTERÍSTICA	TÉCNICA DE CONTATO		TÉCNICA DE ELUIÇÃO OU LAVAGEM
	<i>Placas</i>	<i>Swab</i>	
<i>Aplicação</i>	uso geral	uso geral	restrito a tubulações, utensílios
<i>Recuperação</i>	baixa	moderado (50 a 80%)	moderado (70%)

		(52 a 90%)	(70%)
<i>Precisão</i>	boa a excelente	baixa	razoável a boa
<i>Erro</i>	mínimo (com várias amostras)	grande	reduzido
<i>Tipo de superfície</i>	plana, seca, lisa	variável	fechadas
<i>Execução</i>	rápido	rápido	rápido
<i>Complexidade</i>	simples	simples	simples
<i>Endosso oficial</i>	APHA (1972)	APHA (1975)	APHA (1972)

Fonte: Sveum et al (1992).

### 3.5 leite longa vida

#### 3.5.1 Uso de altas temperaturas

O objetivo do tratamento térmico no processo asséptico é inativar microrganismos, especialmente esporos mesofílicos (Ahvenainen, 1988).

O leite foi, primordialmente, aquecido para aumentar sua vida útil, sendo o calor posteriormente aplicado visando a prevenção de doenças. O interesse pelo leite esterilizado para estocagem e distribuição não refrigerada residiu na potencial redução de custos no transporte e economia de energia (Westhoff, 1978).

O sistema *ultra high temperature* (UHT) para leite foi introduzido comercialmente na indústria de laticínios no início da década de 60. Inicialmente os sistemas operavam com injeção direta de vapor a 145°C/3-6s, seguido pelo resfriamento a vácuo. Nessa época a questão do consumo de energia ainda não era devidamente considerada. Durante a década de 70 passou-se a focalizar a economia de energia e os sistemas UHT indiretos atingindo 90% de recuperação de calor, baseado em trocadores a placas, foram introduzidos. Assim, a temperatura de esterilização foi reduzida a 137-140°C/3-4s (Jensen, 1996).

O leite como produto comercialmente estéril tem muitos aspectos atrativos, destacando-se a sua vida útil extensa sob distribuição e estocagem não refrigerada, em virtude do tratamento térmico empregado no processamento. Os métodos comuns de esterilização dos alimentos não se demonstram satisfatórios para o leite por causa do desenvolvimento de um sabor “cozido” e de certa

deterioração da qualidade nutricional (Pelczar, 1981). Portanto, a qualidade do leite UHT é superior àquela comparada ao leite esterilizado na embalagem, já que o produto é exposto a elevadas temperaturas durante poucos segundos.

No processamento UHT, o leite é aquecido a temperaturas entre 135 e 150°C durante 1 a 10 segundos seguido de um rápido resfriamento, permitindo que a esterilidade comercial seja atingida com o mínimo de alteração química ao produto. A esterilidade comercial do leite UHT é necessária para prevenir, efetivamente, a sobrevivência de microrganismos alteradores e patogênicos. Os processos de esterilização são delineados para assegurar a destruição de esporos de *Clostridium botulinum*, bactéria patogênica anaeróbia capaz de se desenvolver nas condições de pH do leite, próximo a 6,7 (Komorowski e Early, 1992).

Na legislação brasileira de alimentos, segundo a Portaria nº 307, de 04/09/97, do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAA), o leite UHT é definido como “o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos a uma temperatura entre 130 e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas” (Brasil, 1997).

Dois métodos de tratamento térmico podem ser utilizados no processamento do leite UHT: aquecimento indireto, com água ou vapor, e aquecimento direto, através da injeção de vapor no produto ou infusão do produto em uma câmara de vapor. Os sistemas de aquecimento indireto empregam trocadores de calor a placas ou tubulares, sendo de menor custo e complexidade, comparados aos sistemas de aquecimento direto. Em ambos os métodos, o processo é, essencialmente, o mesmo, com o tratamento térmico seguido pelo envase asséptico do produto (Komorowski e Early, 1992).

Uma comparação da eficiência esporicida de cada sistema indica que o aquecimento direto deve ser 3-4°C acima do aquecimento indireto para produzir o mesmo efeito esporicida. As diferenças relativas ao valor nutricional do leite processado por um sistema direto e indireto são praticamente desprezíveis (Westhoff, 1978).



Segundo uma pesquisa realizada por Zacarchenco (2000), as condições de processamento de leite UHT, estabilidade, tipo de trocador de calor empregado por diferentes laticínios do Brasil, são resumidos a seguir:

- Condições de processo: variam entre 137 a 150°C por 3 a 4 segundos;
- Tipo de trocador de calor: aquecimento direto e indireto (placa e tubular);
- Estabilidade: 3 a 4 meses.

O leite é um produto muito complexo e altamente perecível, constituindo-se num sistema em sutil equilíbrio que pode ser rompido em inúmeras situações, tanto decorrente da inadequação da matéria-prima quanto dos processos tecnológicos, tornando os problemas relacionados ao leite UHT bastante complexos. Uma elevada carga microbiana degrada constituintes ou produz substâncias capazes de alterar propriedades físico-químicas importantes na manutenção do equilíbrio mencionado. Grande parte das proteínas solúveis é representada pelas albuminas e globulinas, de conhecida sensibilidade térmica. Matérias-primas de algum modo sensibilizadas experimentarão, durante o processamento UHT ou na subsequente armazenagem e comercialização, alterações irreversíveis, modificando e comprometendo a qualidade do produto (Prata, 1998).

O leite UHT pode ser produzido a partir da mesma matéria-prima utilizada para a produção do leite pasteurizado tipo C, porém a legislação atual praticamente isenta a matéria-prima do leite C de quaisquer exigências sanitárias e de qualidade relevantes antes, durante e após a ordenha, em relação as instalações, equipamentos, projeto e registro do estabelecimento, resfriamento imediato, higiene e controle da produção e saúde do rebanho (Guimarães, 2002).

No Brasil, o leite utilizado na obtenção de produtos UHT tem sido o tipo C. Infelizmente esse tipo sequer possui um padrão microbiológico quantitativo, importante indicador para controle de qualidade da matéria-prima. Com algumas exceções, é obtido, estocado e transportado em precárias condições, com prejuízo sensível e deterioração irreversível de sua qualidade como matéria-prima e alimento (Prata, 1998).

As propriedades do leite UHT são progressivamente modificadas com o tempo e temperatura de estocagem. Algumas das reações que causam alterações ocorrem durante o processamento, outras reações ocorrem devido à presença de

enzimas termorresistentes ao processo UHT ou ao oxigênio no espaço livre da embalagem. A barreira ao oxigênio das embalagens deve ser aumentada para prevenir reações oxidativas (Holdsworth, 1992).

### 3.5.1.1 Efeito de esterilização do tratamento térmico

No processo de esterilização de alimentos o fenômeno mais importante é a destruição dos microrganismos, independente do mecanismo específico que causa tal destruição (Quast, 1976). Os microrganismos são destruídos pelo calor quando ocorre coagulação de proteínas microbianas e enzimas necessárias ao seu metabolismo são inativadas (Mehta, 1980). Uma grandeza muito utilizada na representação do efeito do tratamento térmico sobre alimentos é o valor F. Esse denota a intensidade de um tratamento qualquer, em minutos a uma temperatura de referência. Para a destruição de esporos de microrganismos a temperatura de referência geralmente é 121,1°C. Colocam-se, freqüentemente, dois índices junto ao valor F. Exemplificando,  $F^{10}_{121,1}$  significa que a temperatura de referência é 121,1°C e o valor z é 10°C (Quast, 1976).

Segundo Eguchi e Massaguer (1995), um valor  $F^{10}_{121,1}$  é conhecido como  $F_0$ , o qual é definido como o tempo em minutos a 121,1°C requeridos para destruir um certo número de microrganismos com um valor z de 10°C. Matematicamente, tem-se:

$$F_0 = 10^{(T-T_{ref})/z} \cdot t \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

$F_0$  - intensidade do tratamento térmico;

T - temperatura a qual o produto foi submetido;

$T_{ref}$  - temperatura de referência (121,1°C);

t - tempo de retenção do produto à temperatura T;

z - intervalo na temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição do microrganismo considerado.

Uma vez calculado o valor F de um determinado processo, pode-se calcular a redução no número de microrganismos que tal processo pode ocasionar, desde que se conheça o valor D à mesma temperatura de referência e desde que o valor

F tenha sido calculado com o valor z do microrganismo que está sendo considerado (Quast, 1976):

$$\log (N_0/N) = F/D \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

$N_0$  - concentração inicial de microrganismos;

N - concentração final de microrganismos ou número de sobreviventes;

F/D - número de ciclos logarítmicos em que é reduzida a concentração de microrganismos.

Conforme Massaguer (1998), existem microrganismos mais resistentes que o *Clostridium botulinum*, mas não são patogênicos. No entanto, causam deterioração nos produtos termoprocessados se sobreviverem. Alguns desses microrganismos mais resistentes podem ser divididos em 2 grupos: mesofílicos e termofílicos.

Para os mesofílicos,  $D_{121^\circ\text{C}}$  varia de 0,5 a 1,5min.

Para os termofílicos,  $D_{121^\circ\text{C}}$  varia de 1,0 a 5,0min.

Exemplos desses microrganismos incluem *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium sporogenes*.

### 3.5.2 Microbiologia de leite

O leite é um meio ideal para desenvolvimento de bactérias, sendo sua flora natural, constituída por cerca de  $10^2$  a  $10^4$  UFC/mL, proveniente dos canais de leite da vaca, do úbere, dos equipamentos de ordenha utilizados durante a produção, etc. Essa flora inclui *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter-Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e coliformes. A deterioração do leite é consequência, sobretudo, do desenvolvimento de microrganismos psicrótrófos, que produzem lipases e proteases termoestáveis que não são inativadas durante o tratamento térmico. As pseudomonas, flavobactérias e *Alcaligenes* spp. são produtoras de lipases, as quais produzem cadeias médias e curtas de ácidos graxos a partir dos triglicerídios do leite. Esses ácidos graxos conferem ao leite sabor e aroma rançoso. As proteases são produzidas pelas *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* e *Bacillus* spp. Essas enzimas hidrolisam as proteínas do leite, produzindo peptídios que o deterioram.

Por esta razão, altas contagens microbianas antes do tratamento térmico são indesejáveis, já que a ação residual das enzimas durante a estocagem resulta na redução da estabilidade do leite (Forsythe, 2002).

Os microrganismos no leite podem ser classificados, com base na resistência ao calor, em três classes (Teuber e Busse, 1981):

#### *Classe I*

Engloba os microrganismos destruídos pela pasteurização convencional ou pelo processo *high temperature short time* (HTST), com binômio característico de 72°C/15s. Este tratamento elimina os microrganismos patogênicos, a maioria das células bacterianas vegetativas, leveduras e bolores.

#### *Classe II*

Compreende os microrganismos resistentes ao tratamento HTST, mas que são sensíveis ao tratamento UHT.

#### *Classe III*

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

De acordo com Mostert et al. (1979), a manutenção da qualidade do leite UHT é geralmente determinada pela sobrevivência de esporos termo-resistentes, os quais podem germinar e deteriorar o leite ou por microrganismos que são introduzidos no produto após o tratamento térmico em virtude de falhas nas etapas de enchimento, fechamento ou por defeitos na embalagem. A deterioração de leite UHT devido à recontaminação pós-processo é mais freqüente que a sobrevivência de esporos termo-resistentes.

De acordo com Von Bockelmann (1988), a microbiologia do leite segue três situações:

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

A possibilidade de desenvolvimento de microrganismos no leite UHT e suas conseqüências, com relação à falta de esterilidade comercial, são as seguintes (Von Bockelmann, 1988):

- Formação de gases – 85%
- Coagulação sem formação de gases – 10%
- Alteração no sabor sem formação de gás – 5%

De acordo com Zacarchenco (2000), o microrganismo *Bacillus sporothermodurans* vem sendo isolado a partir de leite processado pelo sistema UHT. As amostras contaminadas apresentaram contagens em torno de  $10^5$  UFC/mL sem evidências maiores de alterações sensoriais. Outras espécies do gênero *Bacillus*, como *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* entre outras também têm sido isoladas de leite UHT.

### 3.5.3 Alterações que ocorrem no leite acondicionado

O leite, quando oxidado, é dotado de sabor e aroma anormais. Tais aromas, em geral desagradáveis, são oriundos de compostos voláteis, provenientes da degradação de hidroperóxidos. Dependendo do componente oxidado, um odor típico é então formado, a exemplo da oxidação de proteínas e de aminoácidos, que resultam em odor de queimado. Por outro lado, a oxidação de componentes lipídicos resulta em odor de ranço (Faria, 1985).

Os compostos voláteis, em geral degradáveis, são oriundos dos hidroperóxidos formados pela oxidação dos lipídios. Os hidroperóxidos por si não afetam as propriedades sensoriais do leite, porém os seus produtos de degradação são voláteis e detectáveis, mesmo em baixíssimas concentrações (da ordem de  $\mu\text{g/L}$ ). A luz não só acelera a oxidação como também afeta a degradação dos peróxidos, originando compostos voláteis tais como os aldeídos, as cetonas e os álcoois. A degradação da proteína do leite por ação fotoquímica da luz pode resultar em sabor desagradável, a exemplo da metionina que dá origem ao metional (Faria, 1985).

Tanto a radiação solar quanto a artificial produzem efeitos negativos na qualidade do leite, provocando *off flavor* e reduzindo o teor de vitaminas. Os nutrientes no leite são mais sensíveis à radiação na região azul-violeta do espectro visível, na faixa de comprimento de onda de 400-500nm, enquanto a radiação ultravioleta e visível acima de 500nm têm efeito relativamente reduzido

sobre as vitaminas e outros nutrientes. A intensidade da fotoxidação depende da intensidade da energia radiante que atinge o leite e o tempo de exposição. O leite é uma das melhores fontes de vitamina B<sub>2</sub> e uma boa fonte de vitamina A, ambas sensíveis à luz, que além de reduzir o teor de vitaminas, produz *off flavors* (Fredsted et al, 1996).

Para reduzir o efeito da luz é necessário que a embalagem ofereça uma proteção ao leite, permitindo-se uma transmissão de luz através do material de no máximo 8% a 500nm e 2% a 400nm. As embalagens transparentes, como vidro ou plástico, oferecem uma proteção mínima contra o efeito nocivo da luz, enquanto que os cartonados proporcionam uma proteção muito boa. A melhor proteção é oferecida pelo cartonado laminado com folha de alumínio, composição que atinge 0% de transmissão à luz (Fredsted et al, 1996)

#### 3.5.3.1 Alterações no sabor

A aceitação de produtos lácteos pelos consumidores é geralmente determinada pelas características sensoriais do produto. Essas características são influenciadas por vários fatores intrínsecos e extrínsecos ao produto, por exemplo, reações de oxidação e/ou flora microbiana natural. Muitos dos fatores alteram-se durante a estocagem, mudando as características sensoriais. Essas alterações são importantes, especialmente na determinação da vida útil do produto. Frequentemente as características sensoriais de um produto são alteradas, tornando o mesmo inaceitável (Watson e McEwan, 1995).

O sabor é a propriedade que mais limita a aceitabilidade do leite UHT. A característica dominante do leite UHT recém-processado é o sabor cozido. Durante a estocagem, a intensidade desse sabor é reduzida, e outras características tornam-se evidentes. Após uma estocagem prolongada, o sabor de “velho” e “rançoso”, limita a aceitação do produto, que, tipicamente, aumenta durante as primeiras semanas de estocagem quando a intensidade do sabor “cozido” é reduzida; a seguir a aceitação decresce com o aumento do sabor de “velho”. As taxas de alteração do sabor são influenciadas por muitas variáveis, incluindo as propriedades do leite, intensidade do tratamento térmico, tipo de equipamento utilizado no processamento, embalagem, concentração de oxigênio, tempo e temperatura de estocagem (Dunkley e Stevenson, 1987).

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

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

Um interessante efeito colateral do aquecimento é a formação de lactulose, cuja quantidade é diretamente proporcional à intensidade do tratamento térmico. A aceitabilidade do sabor do leite processado está correlacionada inversamente com a quantidade de lactulose produzida (Holdsworth, 1992).

A origem dos sabores de ranço e amargo durante a estocagem do leite UHT está relacionada à presença de enzimas termo-resistentes como proteases e lipases (Dunkley e Stevenson, 1987).

Alguns sabores indesejáveis (*off-flavors*) no leite são desenvolvidos a partir da auto-oxidação de lipídios insaturados e pela oxidação, induzida pela radiação, da metionina formando o aldeído metional. A oxidação de lipídios insaturados produz uma diversidade de aldeídos e cetonas que contribuem para a produção de *off-flavors*. Tanto os lipídios saturados quanto os insaturados podem ser oxidados na presença de oxigênio. Sob condições normais de processamento na indústria de laticínios, os lipídios saturados são considerados estáveis. A oxidação de lipídios insaturados ocorre, no entanto, facilmente. Os lipídios podem ser oxidados como ácidos graxos livres ou como triglicerídeos. O primeiro passo nesse processo oxidativo é a formação de hidroperóxidos, que são inodoros e

insípidos, mas são muito instáveis, decompondo-se rapidamente para formar radicais livres e compostos carbonílicos e carboxílicos como aldeídos, cetonas e ácidos, podendo também ser formados alguns álcoois. Esses compostos têm um limiar de detecção muito baixo dando origem ao sabor oxidado (Rysstad et al, 1998).

Segundo o mesmo autor, um mecanismo de fotoxidação bem conhecido é a oxidação de metionina em metional, onde a riboflavina atua como um foto-sensitizador, sendo ativada por luz de comprimentos de onda na faixa de 400-500nm. A formação de metional é a principal causa de *off-flavor* no leite induzido pela luz. O metional tem um limiar de detecção de odor muito baixo, originando um forte sabor desagradável. O efeito do *off flavor* induzido pela radiação é mais pronunciado do que o efeito da oxidação de lipídios insaturados não induzida pela radiação.

#### 3.5.3.2 Alterações nas proteínas

Os constituintes do leite que sofrem a maior alteração durante o processamento UHT e na estocagem são as proteínas. As alterações nas proteínas estão relacionadas a muitos problemas tecnológicos com produtos UHT, tais como *off-flavor*, gelatinização, formação de sedimento, incrustação da superfície de transferência de calor, perda de valor nutricional e escurecimento. O principal efeito do tratamento UHT nas caseínas é uma mudança na distribuição dos tamanhos das micelas, que, em geral, aumentam de tamanho. Quando as proteínas do soro são desnaturadas, formam complexos entre si, com caseínas e com glóbulos de gordura (Dunkley e Stevenson, 1987).

Proteínas participam das reações de *Maillard* durante a estocagem ocasionando o subsequente escurecimento do leite (Holdsworth, 1992).

#### 3.5.3.3 Alterações nutricionais

O processamento UHT do leite causa pouca redução de sua qualidade nutricional, mas durante a estocagem, após o envase asséptico, as perdas de vários nutrientes podem ser significativas. A temperatura de estocagem, concentração inicial de oxigênio no leite e a barreira do material de embalagem são de elevada importância. A qualidade nutricional é melhor conservada pela



embalagem hermética do leite desaerado em materiais opacos, estocado, preferencialmente, sob refrigeração (Dunkley e Stevenson, 1987).

As vitaminas lipossolúveis são pouco afetadas pelo calor, sendo as hidrossolúveis as mais sensíveis. A pasteurização destrói em torno de 5% de tiamina e 10% de vitamina C ao passo que o processamento UHT destrói 10% das vitaminas B, 15% de ácido fólico e 25% de vitamina C. Entretanto, o processo UHT tem pouco efeito no valor nutricional das proteínas, gorduras e minerais (Holdsworth, 1992).

As vitaminas hidrossolúveis como a vitamina C, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>, são também perdidas durante a estocagem, especialmente na presença de luz e oxigênio. A desaeração auxilia na retenção de vitaminas hidrossolúveis; no entanto, sem a desaeração os ácidos fólico e ascórbico são perdidos dentro de duas semanas de estocagem (Holdsworth, 1992).

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

#### 3.5.3.4 Aparência

A cor do leite UHT é influenciada por muitos fatores tais como a composição do leite, mudanças nas distribuições de tamanhos de partículas, resultantes da homogeneização e tratamento térmico e reações de Maillard. A aparência mais branca do leite UHT em relação ao leite *in natura* é devido à desnaturação das proteínas do soro e subsequente agregação com a caseína. A

cor não é considerada um defeito que limita a aceitabilidade do leite, mas é de importância para produtos que contêm açúcares redutores (Holdsworth, 1992).

#### 3.5.3.5 Gelificação e formação de sedimentos

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

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

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

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

Um dos mecanismos da gelificação do leite UHT é a degradação proteolítica da caseína, que torna as micelas sensíveis à agregação. O armazenamento refrigerado do leite cru agrava o problema, pelo desenvolvimento de psicotróficos (Bizari et al, 2003).

#### 3.5.4 Aspectos legais

Conforme resolução da ANVISA (2001), o padrão microbiológico para leite UHT em embalagens herméticas determina que após 7 dias de incubação a 35-37°C de embalagem fechada não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.

### 3.5.5 Defeitos na produção de leite UHT

A Tabela 5 relaciona, resumidamente, algumas causas potenciais de defeitos na produção de leite UHT.

**Tabela 5** - Causas potenciais de falhas na produção de leite UHT.

	PROCESSO MECÂNICO	PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO
UHT	‣ Áreas de vazamentos (tubos, juntas, válvulas, tanques, etc.)	‣ Condições de tempo e temperatura durante a pré-esterilização da planta UHT ou do tanque asséptico
ENCHIMENTO ASSÉPTICO	‣ Material de embalagem incapaz de garantir uma selagem boa e durável	‣ Condições de tempo e temperatura durante a pré-esterilização da máquina de enchimento asséptico
	‣ Sistemas de selagem	‣ Temperatura ou concentração da solução esterilizante
	‣ Pressão do ar na sala de envase	
	‣ etc	‣ Furos nos filtros de ar
		‣ etc

Fonte: adaptado de Cerf (1988).

### 3.6 Embalagens para leite longa vida

O leite longa vida, acondicionado assepticamente, requer uma embalagem compatível com o sistema de enchimento/fechamento, resistente ao meio de esterilização do material e que permite um fechamento hermético de forma a evitar a recontaminação microbiológica do produto. No Brasil, as embalagens utilizadas para leite longa vida são, predominantemente, as cartonadas, as garrafas co-extrusadas de polietileno de alta densidade (PEAD) e as flexíveis multicamadas.

Com relação à proteção a luz, mesmo sendo translúcida a garrafa de PEAD não é adequada, devendo ser pigmentada ou co-extrusada com material barreira à luz. Quanto ao oxigênio, para garantir a vida útil estipulada, sem desenvolvimento de sabor oxidado, poderia ser utilizada uma garrafa com material de barreira ao

oxigênio. É essencial para proteção do leite UHT que a embalagem seja barreira a esses indutores oxidativos para garantir a vida útil desejada.

Uma embalagem plástica com elevado brilho e transparência constitui-se numa ferramenta valiosa para o setor de *marketing*, que busca sempre uma boa apresentação visual do produto. Por outro lado, muitas vezes a proteção contra a incidência de luz se faz necessária, por se tratar do acondicionamento de produtos sensíveis às reações de deterioração catalisadas pela luz (Alves et al, 1998).

Portanto, as alternativas de embalagens para leite longa vida são múltiplas, a considerar:

- Garrafa de PEAD monocamada pigmentada com dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>);
- Garrafa de PEAD multicamada coextrusada contendo uma camada intermediária escura (*carbon black*);
- Laminado cartonado (PEBD/papel/PEBD/cartão/PEBD/AL/PEBD);
- Laminado flexível coextrusado de alta barreira (PE/EVOH/PE);
- Garrafa de poliéster (PET);
- Garrafa de vidro;
- Lata de folha-de-flandres;
- Sistema composto (*Bag in box*).

### 3.6.1 Embalagens plásticas

O segmento de plásticos no mercado de embalagens tem crescido de forma notável, substituindo, parcialmente o papel, vidro e metal. Devido à sua única combinação de propriedades, os plásticos expandiram a indústria de embalagens em níveis sofisticados. As embalagens plásticas são leves, resistentes à quebra, transparentes, flexíveis, compressíveis, moldáveis em formas complexas, facilmente coloridas e impressas, autoclaváveis, esterilizáveis, reutilizáveis e recicláveis. Na sua versatilidade, os plásticos possuem facilidade de processamento, boas propriedades mecânicas, ampla faixa de temperaturas de processamento e a menor densidade entre os materiais de embalagem. Além disso, os plásticos são economicamente competitivos com o papel, vidro, aço e alumínio (Hernandez, 1997).

### 3.6.1.1 Polietileno de alta densidade

Como as garrafas utilizadas na pesquisa foram de PEAD, maior ênfase será dada a esse tipo de material. Sendo as ramificações na cadeia polimérica do PEAD menor, comparado ao polietileno de baixa densidade (PEBD), este possui regiões cristalinas mais densas, apresentando um aspecto leitoso. O PEAD possui boa barreira ao vapor de água, resistência química e opacidade. Sua densidade varia de 0,940 a 0,965g/cm<sup>3</sup>, sendo um polímero versátil e, junto com o PEBD, é um dos plásticos mais comuns na indústria de embalagens. Pode-se considerar que o aumento da densidade do polietileno resulta em uma redução na sua permeabilidade aos gases e ao vapor de água. O PEAD pode ser utilizado em embalagens para leite, suco, água, detergente, alvejante, etc (Hernandez, 1997). O PEAD é opaco ou translúcido, dependendo de sua espessura, e dispersa luz melhor do que transmite. O fenômeno da dispersão é devido à presença de cristalitos no PEAD (Signore, 1968).

A transmissão da radiação ultravioleta e visível através do vidro e de plásticos translúcidos ou transparentes é uma determinação importante para obter uma avaliação da proteção conferida aos produtos acondicionados contra comprimentos de onda prejudiciais ao alimento. Por isso, esses materiais devem ser pigmentados para obter o bloqueio dessas radiações. A adição do pigmento TiO<sub>2</sub> ao polietileno resulta em uma excelente barreira à luz, visto que as alterações que ocorrem no alimento podem ser freqüentemente atribuídas aos efeitos da energia radiante ultravioleta e/ou visível (Signore, 1968).

A estrutura linear e as ramificações menores favorecem o alinhamento e a aproximação entre as cadeias, o que aumenta o grau de cristalinidade, a densidade e a interação entre as cadeias do polímero. Ramificações volumosas, por sua vez, afastam as cadeias, reduzindo a densidade e o grau de cristalinidade de polímeros cristalinos (Sarantópoulos, 2000).

### 3.6.2 Acondicionamento e fechamento

Nas etapas de enchimento e fechamento, dois cuidados são determinantes para o bom desempenho da embalagem: prevenir a contaminação da área de selagem e minimizar o ar residual (espaço livre) no interior da embalagem. Para dosagem, existem enchedeiras especialmente desenvolvidas para diversas

classes de produto (líquidos, sólidos, pastosos), de modo a minimizar problemas como formação de espuma, respingos, distribuição de sólidos, etc. Esta etapa exige um cuidado especial, pois a contaminação da área de fechamento pode comprometer a hermeticidade da embalagem. Uma técnica para evitar essa contaminação é o enchimento da embalagem com dosadoras, onde o bico de enchimento se movimenta partindo da base até o topo da embalagem, à medida em que deposita o produto. Esse procedimento evita respingos de produto na área de fechamento (CETEA, 1988).

Sistemas de embalagem segundo os quais o enchimento se dá abaixo da superfície do produto evitarão, em grande parte, a formação de espuma, que às vezes interfere com a selagem das embalagens. Todavia, tanto a quantidade como a estabilidade da espuma aumentam com o decréscimo da temperatura do leite. Sistemas onde o enchimento se dá abaixo do nível do produto, portanto, permitirão temperaturas inferiores de enchimento (Von Bockelmann, 1976)

### 3.7 Esterilidade comercial de alimentos termoprocessados

Segundo Silva et al (1997), a esterilidade comercial de alimentos processados termicamente significa a condição atingida por:

1. Aplicação de calor suficiente para tornar o alimento isento de microrganismos capazes de se reproduzir no produto, em condições de estocagem e distribuição não-refrigerada, e microrganismos patogênicos viáveis, inclusive esporos;
2. Aplicação combinada de calor e redução do pH ou atividade de água, suficientes para tornar o alimento isento de microrganismos capazes de se desenvolver no produto, sob estocagem não-refrigerada.

Um alimento comercialmente estéril pode, com base na definição acima, conter microrganismos sobreviventes, desde que sua multiplicação seja impedida por outros fatores de preservação, particularmente a estocagem em temperaturas não superiores a 40°C, a redução do pH ou da atividade de água.

Tratando-se de leite fluido comercialmente estéril, os microrganismos cuja presença é considerada normal são esporos de bactérias termófilas estritas, altamente resistentes ao calor, capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos mais severos aplicados ao produto. Como não se desenvolvem a temperatura ambiente, sua presença é aceitável se a temperatura de estocagem do produto

não ultrapassar 40°C. A deterioração microbiana de alimentos comercialmente estéreis acondicionados em embalagens herméticas acontece, geralmente, em decorrência de falhas na correta execução do processamento. As principais causas são (Silva et al, 1997):

#### *Subprocessamento*

Resultante da aplicação de calor em intensidade insuficiente para atingir a esterilidade comercial. Em alimentos de baixa acidez, como o leite, o subprocessamento é caracterizado pela sobrevivência de esporos de bacilos e clostrídios mesofílicos, evidenciados pela presença de bastonetes Gram positivos. A deterioração anaeróbia por clostrídios putrefativos é mais comum, caracterizada por odor pútrido. Esse tipo de deterioração tem sérias implicações, do ponto de vista de saúde pública, devido ao risco de presença de *Clostridium botulinum* e suas toxinas.

#### *Vazamento*

Nos alimentos produzidos pelo processo asséptico, a recontaminação do produto pode ocorrer depois do tratamento térmico, no resfriamento feito antes do acondicionamento, na área de enchimento e fechamento ou no enchimento de uma embalagem não estéril. A deterioração por vazamento é caracterizada pela presença de microbiota mista, que pode conter tanto bactérias esporogênicas, bolores, leveduras e bactérias não esporogênicas (bastonetes, cocos, cocobacilos). Dependendo da microbiota predominante, pode haver ou não produção de gás, resultando no estufamento da embalagem.

#### *Deterioração por termófilos*

Ocorre quando o produto permanece por tempo prolongado a temperaturas elevadas, permitindo a germinação de esporos de termófilos que sobreviveram ao processamento, podendo ser causada por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas superiores a 40°C. Porém, para caracterizar esse tipo de deterioração é necessário verificar se os esporos sobreviventes são de termófilos estritos ou facultativos.

### 3.8 estabilidade de leite processado assepticamente

A estabilidade de um alimento está diretamente relacionada com a sua aceitação pelo consumidor e, portanto, torna-se imprescindível incluir a avaliação sensorial nos testes de determinação de vida útil. Na maioria das vezes o que

define a estabilidade de um produto é o seu aspecto sensorial, que só pode ser avaliado pelo uso dos sentidos humanos (Almeida e Faria, 1997).

Watson e McEwan (1995) também citam que a análise sensorial é uma ferramenta de medida analítica que pode ser utilizada na determinação da estabilidade do produto.

Faria (1993) apresenta uma extensa revisão abordando a estabilidade de alimentos processados assepticamente, com destaque para os aspectos descritos a seguir.

Existem várias definições e conceitos sobre a estabilidade de um alimento; todavia, é importante considerar o tema como parte de um conjunto intimamente relacionado, envolvendo o produto, o sistema de embalagem e o ambiente de comercialização. Por definição, estabilidade de um alimento é o tempo em que este pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc.; sofrendo pequenas mas bem estabelecidas alterações que são, até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente. Outras expressões, como *vida-de-prateleira*, *vida útil* e *shelf life* são também utilizadas no lugar de estabilidade.

Conforme Muir (1996), a estabilidade de leite longa vida é largamente determinada pela degradação enzimática ou deterioração química.

Devido à correlação direta entre a estabilidade do alimento e as propriedades de barreira do material, considerações sobre a permeabilidade dos sistemas de embalagens, em especial ao oxigênio, serão enfatizadas devido ao seu efeito sobre as perdas de qualidade do produto por via oxidativa (Faria, 1993).

### 3.8.1 Efeito da barreira e do formato da embalagem

A continuação do processo oxidativo, após consumido o oxigênio disponível, irá depender da sua reposição pelas paredes e pelo sistema de fechamento da embalagem. Essa reposição será tanto mais rápida quanto menor for a barreira do material à passagem de oxigênio do ambiente externo para o interior da embalagem. Por esta razão os materiais de embalagem devem apresentar boa barreira ao oxigênio. Como alternativa, existem os laminados contendo folha de alumínio ou os co-extrudados com etileno-vinil-álcool (EVOH) ou policloreto de vinilideno (PVdC) (Faria, 1993).



O tamanho e formato da embalagem também interferem na estabilidade. À medida que o tamanho aumenta, a relação área/volume diminui e, portanto, mais protetora torna-se a embalagem. Com base neste princípio, a vida útil de um produto em uma embalagem de 1000mL será maior do que numa de 250mL. 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 e fechamento da embalagem afetam intensamente a taxa de permeabilidade da embalagem final. O maior efeito de perda de barreira está relacionado com as regiões de fechamento, como nas termosseladas e nos sistemas de vedação das tampas (Faria, 1993).

### 3.8.2 Disponibilidade de oxigênio

A principal perda de qualidade de alimentos assépticos é por via oxidativa, apresentando como consequência a alteração do sabor e aroma característicos. Geralmente, formam-se compostos voláteis indesejáveis, provenientes do processo autoxidativo. Porém, a oxidação só ocorrerá se houver oxigênio disponível dentro da embalagem. A disponibilidade de oxigênio dependerá do sistema de embalagem e do processo de industrialização. Conseqüentemente, o oxigênio dentro da embalagem será a somatória do que se encontra dissolvido no alimento mais o existente no espaço vazio (*headspace*). Portanto, as embalagens sem espaço vazio apresentarão maior proteção, em relação às demais (Faria, 1993).

No tocante às reações oxidativas, o residual de oxigênio no produto (espaço vazio + dissolvido) e a permeabilidade da embalagem são os principais fatores que determinam a vida útil. A remoção do oxigênio dissolvido no produto é mais difícil nos sistemas assépticos do que nos termoprocessados em latas e vidros. Isso ocorre devido à menor temperatura de processo e à dificuldade de se fazer a desaeração mecânica nos sistemas assépticos (Faria, 1993).

### 3.8.3 Efeito da temperatura

Uma grande vantagem dos sistemas assépticos é permitir a comercialização do produto à temperatura ambiente. Caso contrário, seria anti-econômico ter que utilizar distribuição e/ou estocagem refrigerada para alimentos desse tipo. Mesmo assim, é importante considerar o efeito exponencial da

temperatura sobre as transformações no alimento, bem como sua influência no aumento da permeabilidade da embalagem.

Apesar dos alimentos obtidos pelos sistemas assépticos serem microbiologicamente estáveis à temperatura ambiente, deixá-los em ambientes frescos, fora da exposição solar, ou mesmo refrigerados, torna-se uma boa opção para ampliar sua vida útil (Faria, 1993).

O leite que possui uma concentração elevada de proteases termorresistentes se deteriorará mais rapidamente a temperaturas superiores. Sugere-se, portanto, que 18°C seja considerado como a temperatura máxima permitida durante a estocagem de leite UHT. No entanto, o produto comercializado, especialmente em países de clima tropical, atinge facilmente temperaturas bem superiores ao valor mencionado (Shew, 1981).

A temperatura é o fator ambiental 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  $10^{\circ}\text{C}$ . O efeito da temperatura sobre a estabilidade dos alimentos é baseado na teoria de Arrhenius, descrita pela Equação 3 (Faria, 1993).

$$K = K_0 e^{-E_a/RT} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$K$  = constante da reação

$K_0$  = constante exponencial da reação

$E_a$  = energia de ativação

$R$  = constante universal dos gases

$T$  = temperatura média do ambiente

### 3.8.4 Transformações físicas e químicas

As transformações físico-químicas em leite iniciam-se no processamento térmico, devido ao efeito da temperatura de esterilização. As principais transformações ocorrem nas proteínas, cujas conseqüências são as alterações no sabor. Quando aquecidas, as proteínas liberam o gosto característico do leite fervido ou cozido. Paralelamente, reações de oxidação e reações de Maillard também ocorrem durante o processo térmico. A minimização do efeito da temperatura tem sido conseguida pelo uso de injeção de vapor, seguida do resfriamento instantâneo ou *flash*. Deste modo, o tempo em que o produto permanece em alta temperatura é menor, reduzindo a produção de voláteis indesejáveis.

Durante a estocagem e comercialização de leite processado pelo sistema UHT, as transformações no sabor e aroma continuam devido às reações oxidativas, cuja intensidade depende da disponibilidade de oxigênio residual e da barreira da embalagem (Faria, 1993).

A estabilidade de leite UHT, no Brasil, varia de 3 a 5 meses, podendo ser maior ou menor, dependendo da embalagem utilizada e temperatura de comercialização.

Existem situações nas quais muitos compostos voláteis diminuem durante a estocagem e comercialização do produto. Este fenômeno é denominado de absorção do sabor pelo material de embalagem. O filme de polietileno da parte interna das embalagens cartonadas absorve parte dos compostos voláteis do leite. Todavia, pode ocorrer também a interação dos aldeídos com os aminoácidos ou peptídeos das proteínas do leite. Outras transformações típicas em produtos lácteos incluem: sedimentação, aumento da viscosidade, separação de gordura, etc. Essas alterações são intensificadas quando se aumentam a temperatura e o tempo de comercialização. Sabe-se também que o ajuste do pH, o balanço do teor de sais, a adição de estabilizantes e a diminuição da agitação durante o transporte podem minimizar essas transformações (Faria, 1993).

Problemas relacionados com a estabilidade durante o armazenamento são comuns na indústria de alimentos. Estudos de armazenamento para prever a estabilidade são parte essencial dos programas de desenvolvimento e manutenção da qualidade de produtos (Almeida e Faria, 1997).



## 4 MATERIAL e MÉTODOS

### 4.1 Material e equipamentos

Os principais materiais e equipamentos utilizados na pesquisa estão relacionados a seguir:

#### *Matéria-prima*

Leite fluido integral homogeneizado e pasteurizado tipo B, fornecido pela Cooperativa de Leite Campinas - Campinas - SP.

#### *Embalagem*

Garrafa de polietileno de alta densidade (PEAD) de 500mL, pigmentada com dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), fornecida pela Plastirrico Indústria e Comércio Ltda, São Paulo – SP, com lacre de vedação contendo alumínio (AL)/polietileno de baixa densidade (PEBD) e tampa de rosca de polietileno de alta densidade (PEAD), fornecidos pela Plásticos Pirituba Indústria e Comércio Ltda, São Paulo - SP.

#### *Sanificante químico*

Proxitane 1512<sup>®</sup> – mistura estabilizada contendo 15% (p/v) de ácido peracético e 23% (p/v) de peróxido de hidrogênio, fornecido pela Tech Desinfecção, São Paulo - SP.

#### *Esterilizador de garrafas*

Equipamento desenvolvido por Faria (1999), dividido em 2 seções: esterilização e enxágüe das embalagens por aspersão.

#### *Trocador de calor UHT*

Trocador de calor a placas fabricado com aço inoxidável AISI 316, com vazão nominal de 300L/h, construído pela Sumá Indústria e Comércio Ltda, Campinas/SP.

#### *Sala limpa ISO classe 7 (Classe 10 000)*

Construída pela Isotherm Ar Condicionado Ltda, Campinas/SP.

#### *Tanques e tubulações*

Os tanques e tubulações foram fabricados com aço inoxidável AISI 304, pela Osmec, Campinas/SP.

### 4.2 Descrição da planta piloto utilizada

A planta piloto, utilizada no processamento e envase asséptico de leite, ocupou uma área de 41,4m<sup>2</sup>, incluindo a área limpa, linha de processamento e

esterilização das embalagens. A área limpa se dividiu em vestiário (3,0m<sup>2</sup>), ante-sala (3,0m<sup>2</sup>) e sala de envase (16,8m<sup>2</sup>); ocupando a linha de processamento e esterilização das embalagens uma área de 18,6m<sup>2</sup>. O *lay out* da planta piloto construída pode ser observado nos Anexos 1 e 2.

O *lay out* da linha de processamento foi constituído por um tanque de recepção de matéria-prima com capacidade para 220L, conectado através de uma tubulação e de uma válvula a um tanque de equilíbrio de 76L, permitindo que o trocador de calor fosse continuamente alimentado com o leite. Uma bomba centrífuga, instalada logo após o tanque de equilíbrio, transportou o leite para o trocador de calor a placas com uma vazão nominal de 300L/h, sendo bombeado em seguida para o contentor asséptico instalado na sala de envase, a partir do qual o produto foi conduzido pela ação da gravidade ao ponto de envase, constituído por uma válvula de enchimento manual, apoiada sobre uma mesa de aço inoxidável.

O trocador de calor a placas foi constituído pelas seguintes seções:

1. Regeneração;
2. Aquecimento do produto;
3. Aquecimento de água (meio de aquecimento do produto);
4. Retenção;
5. Resfriamento do produto final;
6. Resfriamento do produto retornado.

A linha de esterilização das embalagens foi constituída por um tanque de preparo de solução esterilizante com capacidade para 90L, um sistema de filtragem para água de enxágüe das embalagens formado por elementos de 1 e 0,22µm, e um equipamento de esterilização de garrafas por aspersão, dividido em 2 seções: esterilização e enxágüe das garrafas.

As fotos da planta piloto utilizada podem ser observadas no Anexo 3.

#### 4.3 DESCRIÇÃO DA ÁREA LIMPA

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

##### *Climatização*

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

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

O sistema de filtragem de ar apresentou a seguinte configuração:

- 4 filtros absolutos A3 (457x457x78mm) com eficiência de 99,97% para partículas de 0,3µm, instalados na sala de envase;
- 2 filtros absolutos A3 (305x305x78mm) com eficiência de 99,97% para partículas de 0,3µm, instalados na ante-sala e vestiário;
- 1 pré filtro tipo bolsa F3 (595x295x600mm) com 4 bolsas;
- 1 pré filtro tipo encartonado G3 (595x295x50mm).

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

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

*Vazão de ar insuflado*

2.400m<sup>3</sup>/h

*Taxa de ar externo*

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

### *Classificação da sala de envase*

ISO classe 7, conforme normas ISO 14644-1

### *Classificação da ante-sala e vestiário*

ISO classe 8

### *Trocas de ar nominais*

Sala de envase: 45 trocas de ar por hora

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

### *Sobre-pressões nominais*

Sala de envase: + 2,0mmca

Ante-sala e vestiário: + 1,0mmca

### *Divisórias e forro*

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

### *Visores*

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

### *Piso*

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

### *Cantos vivos*

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

## 4.4 CERTIFICAÇÃO DA ÁREA LIMPA

A certificação da área limpa foi realizada antes do início dos processos por duas empresas especializadas, abrangendo os seguintes testes:

- Verificação do *lay out* da área quanto às condições de construção civil, materiais empregados, cantos de paredes, piso e teto, luminárias, portas, visores e caixa de passagem (*pass through*);
- Velocidade e vazão do ar nos filtros absolutos terminais;



- Número de movimentações (trocas) de ar na área limpa;
- Gradiente diferencial das pressões entre salas;
- Estanqueidade dos filtros terminais;
- Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão.

A primeira certificação foi feita após a construção da área, antecedendo os testes e processos iniciais e a segunda, 2 meses antes do início dos processamentos de leite programados para esta pesquisa.

#### 4.5 Descrição do processo

##### 4.5.1 Matéria-prima

A matéria-prima foi recebida em 4 latões de polietileno de alta densidade (PEAD) de 50L no período da manhã, a uma temperatura aproximada de 10°C, tendo sido mantida sob refrigeração a 8°C antes do início do processamento. O leite foi analisado para caracterização e avaliação de sua qualidade, através de testes físico-químicos e microbiológicos. As amostras retiradas dos latões foram misturadas e submetidas às análises.

As análises físico-químicas incluíram a determinação de acidez titulável, pH, temperatura, teste do álcool para se determinar a susceptibilidade do leite a coagulação durante o tratamento térmico, gordura, densidade e sólidos totais, de acordo com a AOAC INTERNATIONAL (1995).

Na avaliação microbiológica foram feitas contagem padrão em placas, em PCA e contagem de esporos de mesófilos aeróbios em Ágar Triptona Glucose Extrato de Carne (TGE), após um choque térmico a 80°C/30min, com incubação das placas a 35°C/48h, conforme descrito por Silva et al (1997).

##### 4.5.2 Processamento térmico

Após a recepção e análise, o leite foi filtrado e transferido para o tanque de recepção onde foi adicionado 0,1% de citrato de sódio, concentração usual aprovada pelo Ministério da Saúde, visando o aumento da estabilidade das proteínas do leite durante o tratamento térmico.

O leite foi conduzido a um tanque de equilíbrio a partir do tanque de recepção e bombeado para o trocador de calor a placas. Imediatamente após o aquecimento, o leite foi resfriado a uma temperatura próxima a 25°C e bombeado para um contentor asséptico, onde foi armazenado durante 2 horas,

aproximadamente, sendo, finalmente acondicionado em garrafas de PEAD de 500mL na sala limpa.

A Tabela 6 indica os binômios empregados no tratamento térmico dos lotes 1, 2, 3 e 4, localizados na faixa de trabalho para processo UHT (135°C/10s a 150°C/1s), segundo Kessler (1981).

**Tabela 6** - Binômios utilizados no tratamento térmico do leite em trocador de calor a placas.

PROCESSO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE RETENÇÃO (s)
1 (Lote 1)	136,5 ± 1,5	10
2 (Lote 2)	141,0	10
3 (Lote 3)	143,0 ± 1,0	10
4 (Lote 4)	138 ± 3,0	10

#### 4.5.3 Assepsia das embalagens

A esterilização das garrafas plásticas foi feita com uma mistura estabilizada contendo peróxido de hidrogênio e ácido peracético aspergida no interior das embalagens. A seguir, as garrafas foram enxaguadas por aspersão de água filtrada em filtro biológico durante 7s, tempo suficiente para assegurar a remoção de resíduos da solução da embalagem evitando alterações sensoriais no produto, conforme verificado por Abreu (2001). Os lacres de vedação de AL/PEBD aderidos às tampas foram imersos na mesma solução. O trinômio tempo/temperatura/concentração de ácido peracético (APA), utilizado na assepsia das garrafas foi delineado a partir de um modelo matemático específico para este procedimento de esterilização de garrafas, obtido por Abreu (2001):

$$\gamma = -11,5621 + 0,2587 \cdot T + 19,8417 \cdot APA - 4,3377 \cdot (APA)^2 - 0,1167 \cdot t \cdot APA - 0,2176 \cdot T \cdot APA + 0,3641 \cdot t - 0,008 \cdot t^2$$

Onde:  $\gamma$  = número de reduções decimais de esporos de *Bacillus subtilis globigii*;

t = tempo de contato da solução esterilizante com a garrafa, em segundos;

T = temperatura em °C;

APA = concentração de ácido peracético.

Através do modelo apresentado, foi definido o trinômio APA/T/t utilizado na esterilização das embalagens para se obter 4 reduções decimais na população de esporos de *Bacillus subtilis globigii*, conforme recomendado pela *US FDA* para embalagens destinadas ao acondicionamento asséptico de alimentos de baixa acidez, como o leite (Buchner, 1993). Portanto, o trinômio empregado na esterilização das embalagens foi 0,5%APA/30°C/10s.

De acordo com Reuter (1993), o ácido peracético é comercialmente aplicado em processos de esterilização de embalagens com sua concentração variando de 0,1 a 1%.

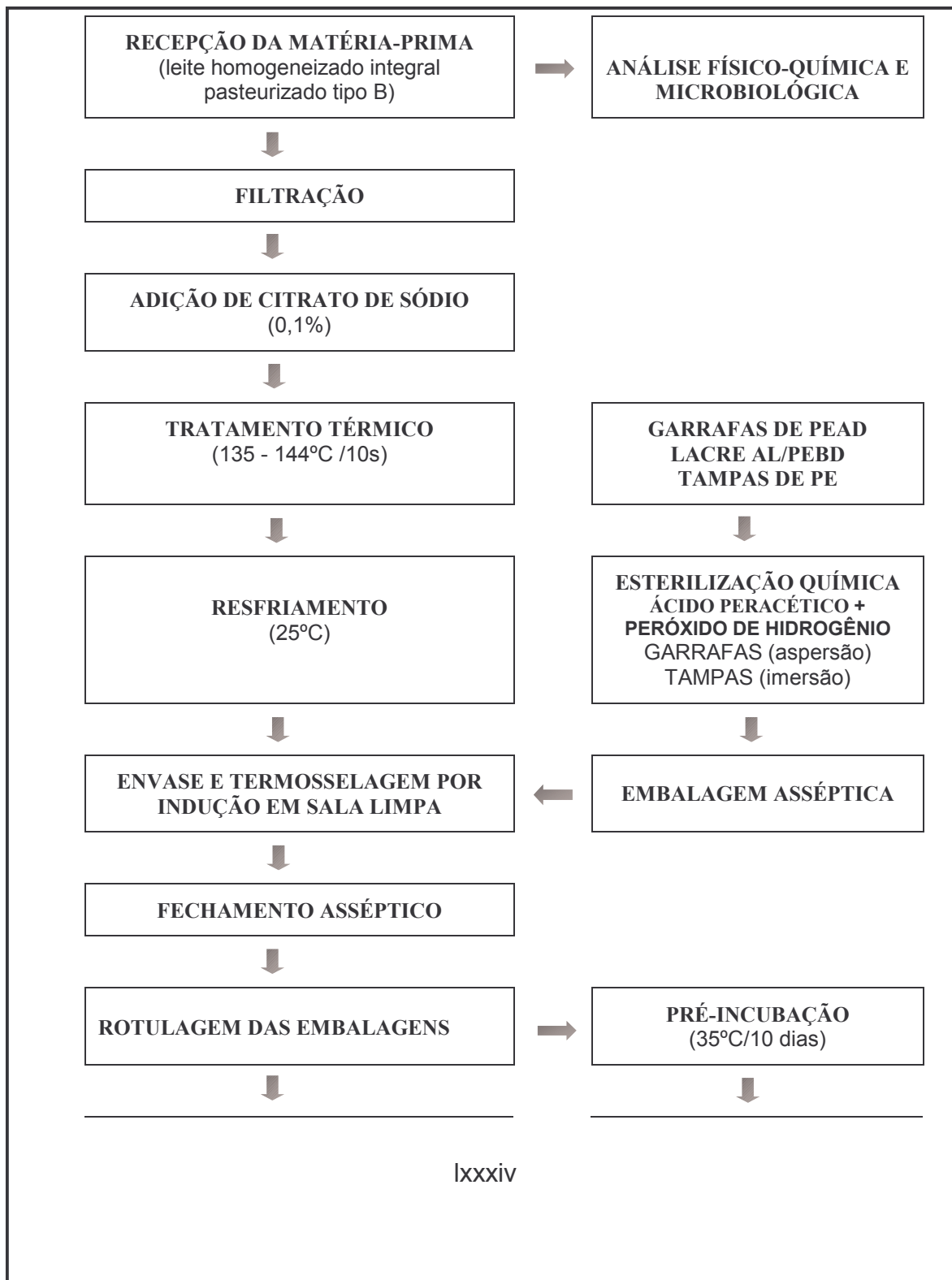
A concentração residual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas embalagens foi controlada através de fitas indicadoras MERCK<sup>®</sup>, para que não excedesse o limite de 0,5mg/L, determinado pela FDA.

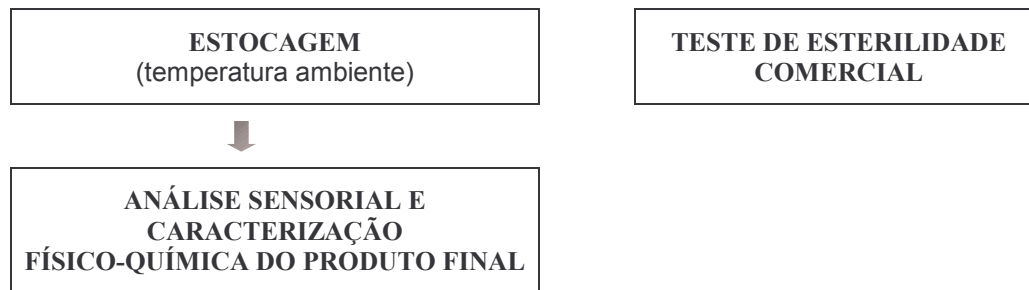
#### 4.5.4 Acondicionamento asséptico

O acondicionamento asséptico do produto foi realizado por dois operadores paramentados na sala limpa, com monitoração simultânea de partículas totais e microrganismos em suspensão no ar. Uma válvula dosadora foi acionada, manualmente, para promover o enchimento deixando um espaço livre de aproximadamente 50mL. Após o envase, as embalagens foram termosseladas por indução, fechadas com tampa de rosca dentro da sala limpa e rotuladas para identificação do lote e data de fabricação do produto.

#### 4.5.5 Diagrama do processo

A Figura 6 apresenta o diagrama dos processos de leite realizados, diferenciando-se apenas quanto às temperaturas empregadas, citadas anteriormente.





**Figura 6** - Diagrama do processamento e envase asséptico utilizado no experimento.

Em cada processamento realizado ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e  $P_4$ ) foram produzidas 300 garrafas de 500mL, totalizando 150L de leite acondicionados. Imediatamente ao final de cada processo, 3 embalagens foram retiradas para leitura de pH. 60 unidades produzidas no início, meio e fim do processo foram coletadas e incubadas a 35°C/10 dias, destinando-se ao teste de esterilidade comercial. O restante do lote foi estocado à temperatura ambiente, no Laboratório de Embalagens do DTA/FEA/UNICAMP. Após o período de incubação, as 60 unidades de cada lote tiveram seu pH determinado tolerando-se uma variação inferior a 0,2 em relação às leituras feitas imediatamente ao final dos processos, conforme citado por Cerf (1988).

Das 60 unidades incubadas de cada lote, 3 foram submetidas a um procedimento microbiológico para eventual detecção do contaminante, descrito posteriormente.

#### 4.6 sanitização e esterilização dos equipamentos

Os procedimentos adotados e descritos a seguir foram baseados em Andrade e Macedo (1996).

##### 4.6.1 Limpeza CIP da linha de processamento

###### 4.6.1.1 Pré-lavagem

Imediatamente após o processamento do leite, a linha foi enxaguada durante 10 minutos com água a 40°C a uma vazão de 900L/h e, aproximadamente, visando a redução da quantidade de resíduos nas superfícies dos equipamentos. Essa temperatura evitou a solidificação da gordura e, ao mesmo tempo, a desnaturação de resíduos de proteínas do leite, aumentando a eficiência da limpeza.

#### 4.6.1.2 Limpeza ácida

A limpeza ácida foi empregada na remoção de resíduos minerais das superfícies dos equipamentos, evitando a formação de incrustações. O detergente ácido apresentou como princípio ativo o ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), composto de inibidor de corrosão, substâncias emulsionantes e dispersantes.

O detergente ácido, na concentração de 2% de  $\text{HNO}_3$ , foi recirculado por toda a linha a uma vazão de 900L/h, sendo preparado no tanque de alimentação, passando em seguida pelo tanque de equilíbrio, trocador de calor a placas, contentor asséptico e válvula de envase, entre 60 e 63°C durante 20 minutos, conforme recomendação do fabricante Sandet Química Ltda, impressa no rótulo da embalagem do detergente.

#### 4.6.1.3 Enxágüe

Após a limpeza ácida foi feito um enxágüe a uma vazão de 900L/h com duração de 5 minutos para retirar os resíduos suspensos e traços dos componentes de limpeza. A remoção completa do detergente foi garantida tomando-se uma amostra da água de enxágüe e verificando seu pH, através de fitas indicadoras, caracterizando um pH próximo à neutralidade.

#### 4.6.1.4 Limpeza alcalina

A limpeza alcalina foi feita com um detergente a base de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), contendo substâncias com alto poder emulsificante, dispersante e complexante com a finalidade de remover resíduos orgânicos (protéicos e gordurosos) das superfícies. A solução alcalina, contendo 1% de  $\text{NaOH}$ , foi recirculada a uma vazão de 900L/h na linha durante 20 minutos a 75°C, de acordo com a recomendação do fabricante Sandet Química Ltda, impressa no rótulo da embalagem do detergente.

#### 4.6.1.5 Enxágüe final

Após a limpeza alcalina foi feito um enxágüe a uma vazão de 900L/h com duração de 5 minutos. A remoção do detergente foi avaliada utilizando-se fitas indicadoras de pH.

#### 4.6.2 Limpeza do tanque asséptico e válvula de envase

Após a execução dos procedimentos de limpeza CIP (*clean in place*), o tanque de produto final, denominado tanque asséptico, e a válvula de envase, instalados na sala limpa, foram desconectados para limpeza manual complementar com detergente neutro, com auxílio de escova e esponja.

#### 4.6.3 Sanificação da sala limpa

As paredes, caixa de passagem, portas e teto da sala limpa foram sanificadas manualmente com solução de ácido peracético 0,01%, utilizando-se um pano específico para este fim. O piso foi desinfetado com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,04% (400ppm) de cloro residual livre. O sistema de insuflamento e climatização do ar na área limpa foi acionado, aproximadamente, 12 horas antes de iniciar o processamento e envase do leite, para que entrasse em regime, assegurando a classe de limpeza adequada na sala de envase.

#### 4.6.4 Esterilização da linha de processamento e envase

Imediatamente antes do início do processamento foi recirculada uma solução de ácido peracético (APA) 0,1% (p/v) a 45°C durante 30 minutos na linha inteiramente montada, operação denominada *sterilization in place* (SIP). O trinômio concentração/temperatura/tempo foi estabelecido com base em testes preliminares nos quais observou-se uma boa eficiência do APA. O contentor asséptico foi totalmente preenchido com a solução de APA, permanecendo em contato com a superfície por 30 minutos. Ao final da esterilização química, a linha foi enxaguada com água processada à mesma temperatura a qual foi submetida o produto, para remoção de resíduos do esterilizante. O contentor asséptico foi completamente enchido com água processada, tendo sido o enxágüe realizado em 40min, aproximadamente.

#### 4.6.5 Limpeza e sanificação do equipamento de esterilização de garrafas

O equipamento de esterilização de garrafas foi lavado manualmente com detergente neutro. A mangueira que ligou a seção de enxágüe das embalagens ao filtro biológico foi desconectada para recirculação de solução de ácido peracético (APA) 0,05% durante 10 minutos. A seguir foi reconectada e deixada em contato

com APA durante 30 minutos. O bico aspersor foi imerso em APA 0,05% por 30 minutos à temperatura ambiente.

#### 4.6.6 Esterilização dos filtros de água da linha de enxágüe das embalagens

Os filtros de água foram esterilizados quimicamente através de recirculação de solução de APA 0,05% por 30 minutos. Após esse período, o bico aspersor do equipamento de esterilização de garrafas foi recolocado e água estéril foi recirculada por toda a linha de enxágüe das embalagens durante 10 minutos. O bico foi coberto com garrafas esterilizadas e assim mantido até o início da operação de esterilização das embalagens.

### 4.7 aVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO SISTEMA ASSÉPTICO

Os testes descritos a seguir visaram a avaliação do desempenho do sistema asséptico piloto desenvolvido para leite em garrafa plástica, incluindo os procedimentos de higienização da planta piloto. Tais testes foram realizados antes e simultaneamente aos processamentos, tendo sido fundamentados em técnicas para avaliação da adequação microbiológica de equipamentos e ambiente, compreendendo a amostragem e análise de equipamentos, coleta de amostras ao longo do processamento, análise de amostras do ambiente e avaliação da carga microbiana no leite processado ao término da operação.

#### 4.7.1 Testes que antecederam aos processamentos

##### 4.7.1.1 Conformidade das condições operacionais da área limpa

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

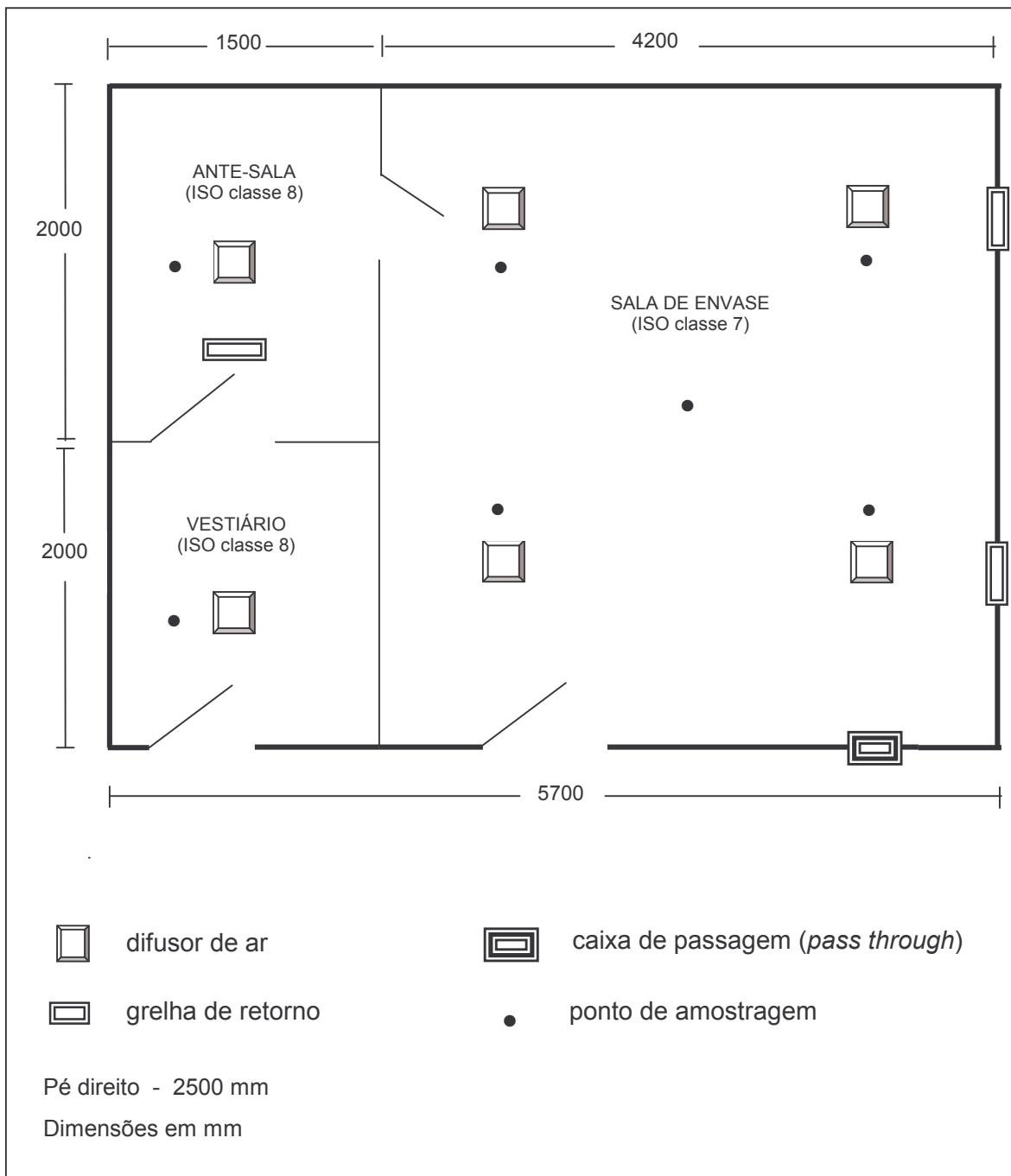
A verificação das especificações funcionais e expectativas de desempenho da sala limpa foi realizada através da monitoração da pressão no interior do ambiente, que deve ser constantemente positiva, taxa de movimentação de ar, avaliação de limpeza e sanificação de superfícies, contagem de partículas totais e microrganismos em suspensão no ar. A temperatura da área limpa foi ajustada em



torno de 23°C, de modo a proporcionar conforto térmico aos operadores. Alguns testes foram selecionados e repetidos como parte da rotina de monitoramento da instalação, cobrindo os três estados ocupacionais (área limpa *como construída*, *em repouso* e *em operação*).

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

Um desenho da área limpa indicando os pontos onde foram efetuados os testes é apresentado na Figura 7.



**Figura 7** - Desenho da área limpa utilizada no acondicionamento asséptico do leite.

A área e volume de cada ambiente da área limpa estão indicados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Área e volume da área limpa monitorada.

AMBIENTE	ÁREA (m <sup>2</sup> )	VOLUME (m <sup>3</sup> )
sala de envase	16,8	42,0
ante-sala	3,0	7,5
vestiário	3,0	7,5
TOTAL	22,8	57,0

#### 4.7.1.1.1 Pressurização da sala de envase

O objetivo deste controle foi verificar a capacidade do sistema de insuflamento e climatização de ar em manter o diferencial de pressão especificado entre a sala limpa e áreas adjacentes. O equipamento utilizado na monitoração contínua da pressurização da sala de envase foi do tipo manômetro mecânico da marca ASTA.

Com todas as portas fechadas, aberturas e passagens em condições normais de operação, sistemas de movimentação de ar em funcionamento, o diferencial de pressão entre a sala de envase e o ambiente externo foi medido através do manômetro instalado no painel frontal da sala de envase.

#### 4.7.1.1.2 Velocidade, vazão e taxa de movimentação de ar

A velocidade do ar nos filtros terminais foi determinada com um anemômetro de fio quente TRI-SENSE<sup>®</sup> Cole Parmer, modelo N 37000-00. A partir da velocidade foi calculada a vazão de ar insuflado, útil na determinação do número de movimentações de ar na sala.

Quatro leituras de velocidade foram tomadas em cada caixa terminal posicionando o sensor do anemômetro perpendicularmente à direção do fluxo de ar a uma distância aproximada de 20cm do elemento filtrante. A partir das velocidades foram calculadas as vazões médias de ar em cada difusor e em cada ambiente (sala de envase, ante-sala e vestiário). Através da vazão de ar e volume

do ambiente foi determinado o número de movimentações de ar por hora, de acordo com as Equações 4 e 5:

$$\text{Vazão (m}^3/\text{s)} = \text{velocidade (m/s)} \times \text{área do difusor (m}^2\text{)} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Movimentações de ar/hora} = [\text{Vazão (m}^3/\text{s)} / \text{volume do ambiente (m}^3\text{)}] \times 3600 \quad (\text{Equação 5})$$

#### 4.7.1.1.3 Contagem eletrônica de partículas totais em suspensão

Este teste foi realizado para certificar que a instalação, nos estados ocupacionais *como construída, em repouso e em operação*, pudesse atender às classes de limpeza do ar especificadas para o acondicionamento asséptico.

Este tipo de teste foi realizado por um equipamento que succiona o ar e o passa por um feixe de laser, podendo assim medir o número de partículas de vários tamanhos presentes em um determinado volume de ar. Entretanto, o equipamento não diferencia entre uma partícula viável e uma não viável (Baroni, 2001).

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

As contagens de partículas de 0,5 e 5,0µm foram feitas nos três ambientes da área limpa: sala de envase, ante-sala e vestiário. Na sala de envase cinco pontos foram monitorados, como indicado na Figura 7. Na ante-sala e vestiário apenas o ponto central de cada ambiente foi monitorado.

#### 4.7.1.1.4 Monitoração ativa de microrganismos no ar

Este tipo de amostragem é realizado normalmente por equipamentos de impactação de vários modelos. Estes funcionam succionando um volume pré-determinado de ar e impactando o mesmo sobre um meio de cultura, o qual é posteriormente incubado e depois analisado para verificar se houve desenvolvimento microbiano (Baroni, 2001).

A monitoração de microrganismos foi realizada através do amostrador de ar MAS-100 da MERCK®, um tipo de compactador baseado no princípio de aspiração de ar através de uma placa perfurada. A corrente de ar resultante, que continha partículas, foi dirigida à superfície de uma placa de Petri padrão com diâmetro de

90mm. Terminada a aspiração de ar a placa foi incubada, as colônias foram contadas e expressas em UFC/m<sup>3</sup> de ar. O sistema operou com um dispositivo de sucção de alto desempenho com monitoramento contínuo de ar a 100L/min.

Da mesma forma adotada na contagem de partículas totais, a monitoração de microrganismos no ar foi realizada em 5 pontos na sala de envase.

As contagens de partículas totais e de microrganismos foram realizadas simultaneamente com os equipamentos posicionados a 1m acima do nível do piso, próximo a altura de trabalho, com uma duração de 5 minutos para cada amostragem. Os pontos monitorados na sala de envase foram 5, a citar: embaixo dos 4 difusores de ar, sendo um deles alinhado com o ponto de envase, e no centro da sala limpa. A contagem de microrganismos foi feita em placas de Petri com PCA (Ágar Padrão para Contagem) incubadas a 35°C/48h e PDA-cloranfenicol (Ágar Batata Dextrose) com incubação a 25°C/3-5dias, para bolores e leveduras.

Posteriormente, foram feitas três simulações de envase asséptico, monitorando-se a concentração de partículas totais e microrganismos no início, meio e fim da operação de envase, que se estendeu por aproximadamente 3 horas.

#### 4.7.1.1.5 Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies

A limpeza das paredes, teto, mesa e caixa de passagem (*pass through*) da sala limpa foi avaliada através da técnica de contato, utilizando-se placas de RODAC. Seis placas com PCA foram aplicadas em cada superfície citada após a sua limpeza e sanificação, amostrando-se 42 áreas de 25,5cm<sup>2</sup> (área de contato da placa de RODAC). A amostragem foi feita pressionando-se levemente a placa com ágar contra a superfície a ser avaliada durante 30 segundos. A seguir, as placas foram incubadas a 35°C/48h.

#### 4.7.1.2 Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase

A avaliação do desempenho dos procedimentos de limpeza, sanificação e esterilização química da linha de processamento e envase foi realizada utilizando-se a técnica de eluição ou lavagem, através da coleta da água de enxágüe no ponto de envase após percorrer toda a linha. As coletas foram feitas em intervalos

de descarte de 15L de água de enxágüe circulando 150L na linha, tendo sido iniciadas após a transferência total deste volume para o contentor asséptico na sala limpa, para simular a operação de envase. Portanto, foram tomadas 10 amostras de 450mL, tendo sido plaqueados 30mL de cada amostra em PCA seguido de incubação a 35°C/48h.

#### 4.7.2 Controles simultâneos aos processamentos preliminares

Os controles feitos simultaneamente a 2 processamentos preliminares de leite, visando a avaliação do desempenho do sistema asséptico, são descritos a seguir.

##### 4.7.2.1 Conformidade das condições operacionais da área limpa

###### 4.7.2.1.1 Pressurização

O diferencial de pressão especificado entre a sala limpa e áreas adjacentes foi monitorado durante o processamento e acondicionamento de leite, como descrito anteriormente.

###### 4.7.2.1.2 Contagem de partículas totais e microrganismos no ar

As contagens de partículas totais e microrganismos foram feitas simultaneamente à operação de envase. O contador de partículas e o amostrador de ar foram posicionados sobre a mesa a 20cm do ponto de envase, na altura de trabalho. As amostragens foram realizadas no início, meio e fim do envase, que se estendeu por aproximadamente 2 horas.

###### 4.7.2.1.3 Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies

A limpeza e sanificação da mesa, onde foram colocadas as embalagens antes do envase, e caixa de passagem da sala limpa foram avaliadas utilizando-se placas de RODAC. Seis placas de contato foram aplicadas em cada superfície aproximadamente 2 horas antes do início do envase.

#### 4.7.2.2 Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase

A avaliação do desempenho dos procedimentos de limpeza, sanificação e esterilização química da linha foi realizada imediatamente antes do envase, através de 3 coletas de 450mL de água de enxágüe da linha, tendo sido plaqueados 30mL de cada amostra em PCA seguido de incubação a 35°C/48h.

#### 4.7.3 Controles simultâneos aos processamentos finais

##### 4.7.3.1 Condições operacionais da área limpa

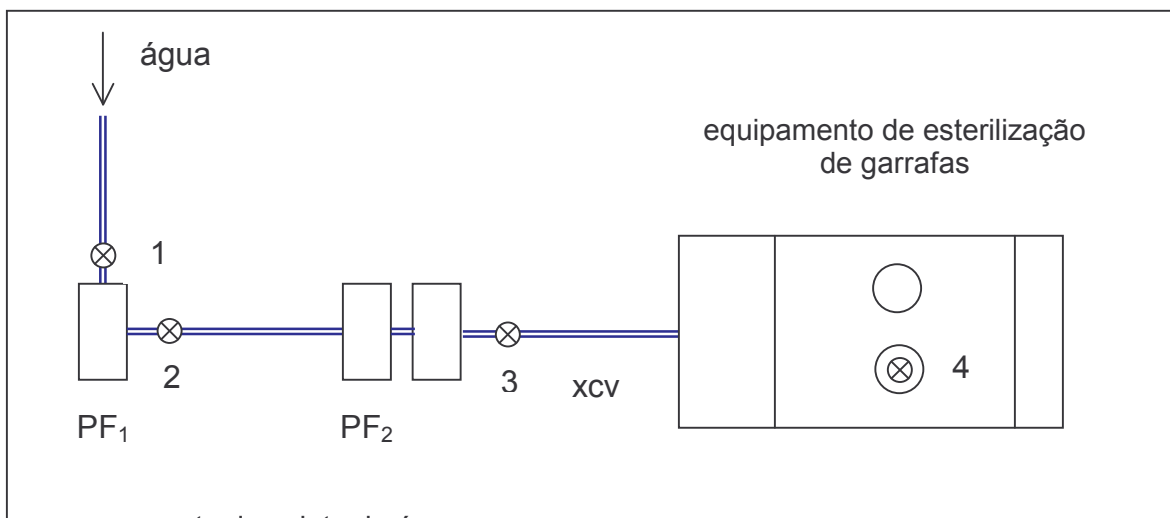
A conformidade das condições operacionais da área limpa foi verificada através dos testes de pressurização, contagem de partículas totais e microrganismos no ar e avaliação de limpeza e sanificação de superfícies, conforme descritos anteriormente.

##### 4.7.3.2 Análise da água de enxágüe da linha

A avaliação do desempenho dos procedimentos de limpeza, sanificação e esterilização da linha foi realizada imediatamente antes do acondicionamento de cada lote, através de coletas da água de enxágüe da linha.

##### 4.7.3.3 Análise da água de enxágüe das embalagens

Amostras da água utilizada no enxágüe das embalagens foram coletadas para análise microbiológica, sendo feitas 3 coletas diretamente na torneira, 3 após o primeiro pré-filtro, 3 imediatamente após o filtro biológico e 3 coletas no bico aspersor do equipamento de esterilização de embalagens. 30mL de cada amostra foram plaqueados em PCA, incubado a 35°C/48h. O esquema da linha de água para enxágüe das embalagens é ilustrado pela Figura 8.



FB

PF<sub>1</sub> e PF<sub>2</sub> – pré-filtros (1µm)

FB – filtro biológico (0,22µm)

1 torneira (água de caixa)

2 saída do PF<sub>1</sub>

3 saída do FB

4 bico aspersor de água

**Figura 8** - Pontos monitorados na linha de filtração de água para enxágüe das garrafas.

Os pré-filtros PF<sub>1</sub>, PF<sub>2</sub> e filtro biológico (FB) representam elementos filtrantes bobinado, de polipropileno expandido e plissado, respectivamente.

#### 4.7.3.4 Análise microbiológica das embalagens

Três garrafas foram analisadas antes da operação de esterilização, para quantificação de sua contaminação inicial, 3 após a esterilização e 3 embalagens coletadas no interior da sala de envase, visando identificar uma eventual recontaminação na transferência das embalagens da área de esterilização para a sala limpa. Este controle foi realizado para avaliar o desempenho da operação de esterilização das embalagens destinadas ao envase asséptico. Uma solução contendo 0,5% de APA foi aspergida a 30°C durante 10s no interior das embalagens, enxaguadas por aspersão, logo a seguir, durante 7s com água filtrada em filtro biológico (0,22µm).

A análise microbiológica das embalagens foi baseada no método da solução de enxágüe, conforme descrito por Petrus (2000). As garrafas de 500mL foram enxaguadas com 15mL de solução de enxágüe (água peptonada 0,1% com neutralizante tiosulfato de sódio 0,5%). Todo o volume da solução de enxágüe foi plaqueado em PCA e incubado a 35°C/48h para posterior contagem.

#### 4.7.3.5 Controle de residual de peróxido de hidrogênio nas embalagens

Para atender à legislação vigente quanto a concentração residual de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nas embalagens foram utilizadas fitas indicadoras Merck, para que o limite de 0,5mg/L não fosse excedido. Após a esterilização e



enxágüe por aspersão, 5 garrafas foram enchidas com água destilada e deionizada. Após agitação, as fitas indicadoras foram imersas durante 5s para determinação do residual, através de comparação com uma escala colorimétrica de 0 a 25mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.8 avaliação do leite processado

Na realidade da pesquisa desenvolvida, pretendeu-se controlar bem as diversas etapas do processamento. De acordo com Ahvenainen (1988), o controle do produto final, simplesmente, não proporciona a necessária segurança microbiológica. Outras medidas de controle devem ser utilizadas como complemento.

##### 4.8.1 Teste de esterilidade comercial do leite

###### 4.8.1.1 Incubação das amostras

Ao final do processamento, 60 garrafas de cada um dos 4 lotes de leite foram incubadas a 35°C/10 dias, conforme indicado por Dryer e Deibel (1992) e Von Bockelmann (1988b), separando 20 embalagens produzidas no início, 20 no meio e 20 ao final do processo.

###### 4.8.1.2 Inspeção visual dos lotes

Durante o período de incubação foi realizada uma inspeção visual dos lotes produzidos, investigando alterações aparentes como estufamento da embalagem. Modificações na cor, odor, viscosidade e textura foram investigadas após a abertura das garrafas, imediatamente antes da leitura de pH.

###### 4.8.1.3 Determinação do pH

O pH das amostras do leite processado foi determinado a 25°C, utilizando-se o pHmetro DIGIMED DM-20, com precisão de duas casas decimais. As leituras foram feitas imediatamente após o fim de cada processamento e ao final do período de 10 dias de incubação a 35°C.

##### 4.8.2 Procedimento microbiológico para detecção de contaminantes

O procedimento microbiológico para detecção de contaminantes foi executado conforme proposto por Denny e Corlett (1992) e Silva, Junqueira e

Silveira (1997), iniciando-se com a limpeza das garrafas com detergente. A região da embalagem perfurada para remoção da amostra de leite foi desinfetada com álcool iodado durante 20 minutos, já que a embalagem não deveria ser aberta de forma convencional, para garantir a integridade do sistema de abertura.

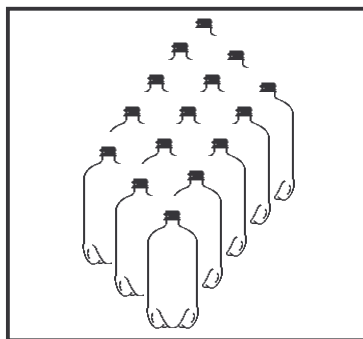
Após a homogeneização do conteúdo da embalagem, foi retirada uma alíquota de 2mL e transferida para tubos com tampas rosqueáveis, contendo caldo dextrose púrpura de bromocresol, utilizado para teste em aerobiose, e meio de carne cozida, selado posteriormente com vaspar (vaselina/parafina), incubado em anaerobiose. Para retirar a alíquota de leite inoculada nos tubos foi utilizada uma seringa graduada com agulha estéril para perfurar a garrafa plástica.

Após a incubação, todos os tubos inoculados foram observados quanto à ocorrência de desenvolvimento microbiano, através da turvação do meio, formação de película superficial e/ou produção de gás. Os tubos de caldo dextrose púrpura de bromocresol foram também observados quanto à produção de ácido, evidenciada pela alteração da cor do meio para amarelo.

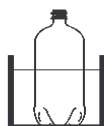
Constatando-se a ausência de alteração em todos os tubos inoculados, o produto seria considerado comercialmente estéril. A ocorrência de crescimento e/ou alteração em qualquer dos tubos é indicativa de ausência de esterilidade comercial ou de uma eventual contaminação da amostra no laboratório.

Devido ao aspecto turvo do leite, a dificuldade de observação de desenvolvimento microbiano nos tubos de cultura resultou na necessidade de confirmação de desenvolvimento através da transferência da amostra dos tubos para placas na forma de estrias. As placas, contendo meios específicos, indicados a seguir, foram incubadas a mesma temperatura do tubo original. Após o período de incubação, a observação de desenvolvimento nas placas estriadas confirmou a ocorrência de desenvolvimento no tubo original.

O esquema a seguir, dividido em fases 1 e 2, complementa e auxilia a compreensão dos testes descritos, empregados na avaliação dos lotes de leite acondicionado assepticamente em garrafa plástica, de acordo com as Figuras 9, 10 e 11.



PRÉ-INCUBAÇÃO DE 60 GARRAFAS  
(35-37°C/10dias)



DESINFECÇÃO DAS EMBALAGENS  
(imersão parcial em álcool iodado por 20min)

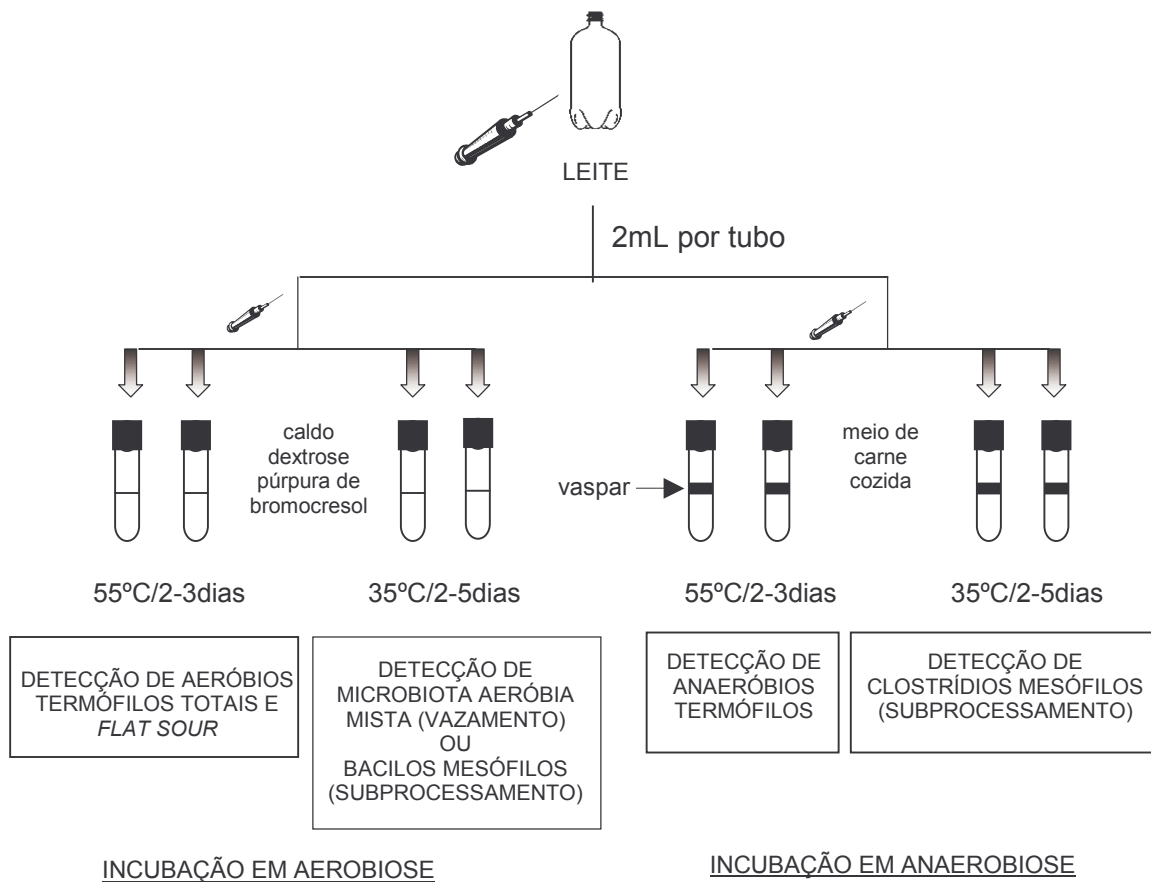


FASE 1



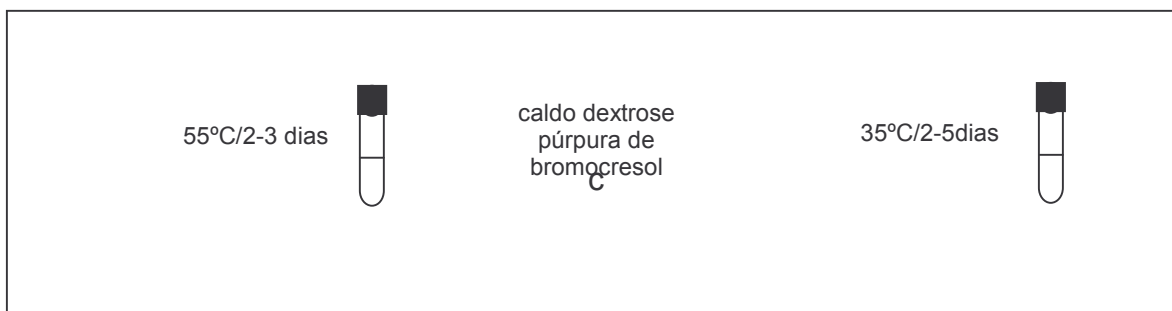
FASE 2

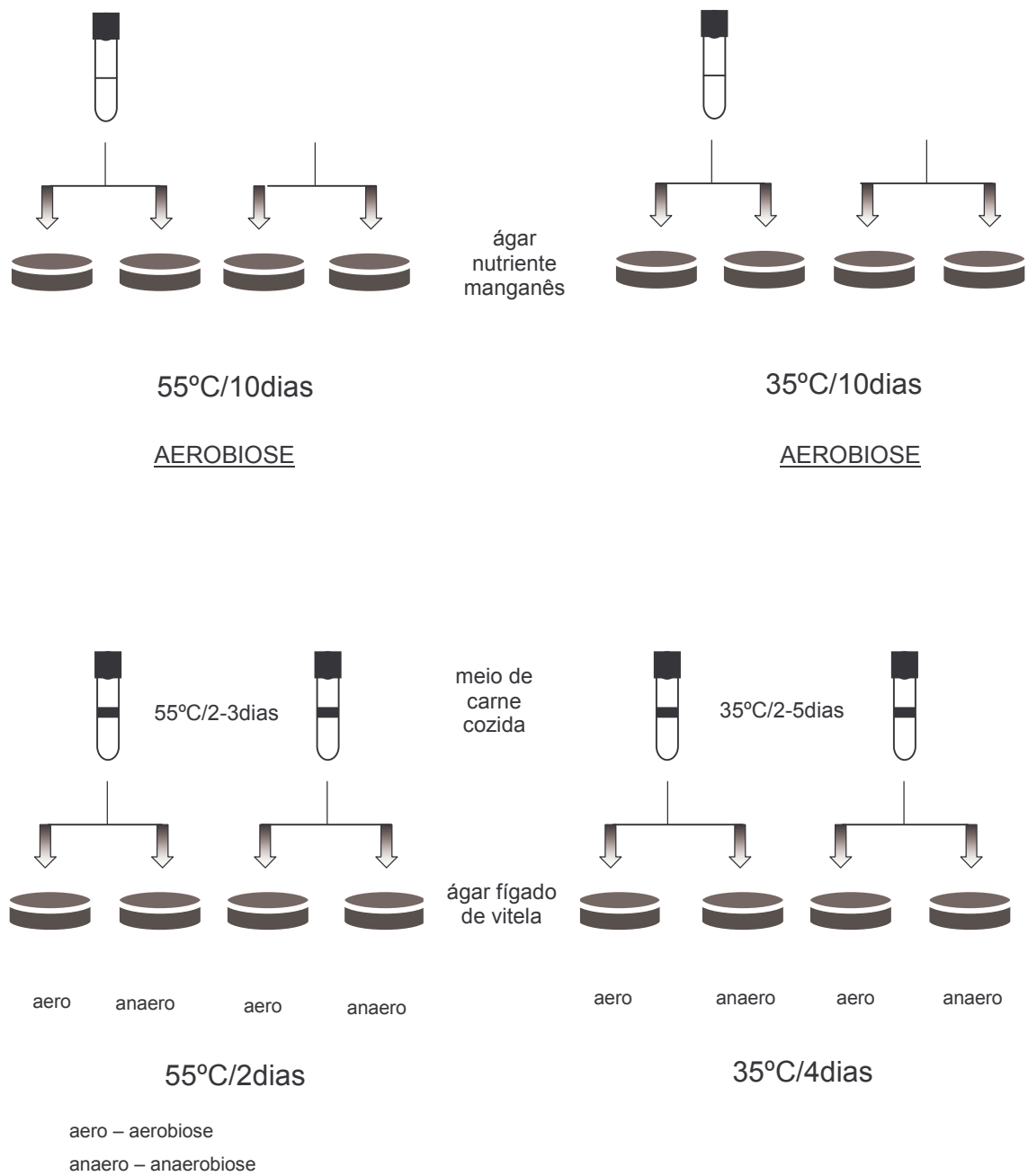
**Figura 9** - Esquema da metodologia do teste de esterilidade comercial de leite.



vaspar – vaselina sólida/parafina (1:1)

**Figura 10** - Esquema da fase 1 do procedimento para detecção do contaminante.





**Figura 11** - Esquema da fase 2 do procedimento para detecção do contaminante.

#### 4.8.3 Caracterização físico-química

Três amostras de cada lote foram analisadas em triplicata após o teste de esterilidade comercial, tendo sido determinados o pH, acidez titulável, proteína, gordura, lactose, crioscopia, sólidos totais, densidade, extrato seco desengordurado e cinzas, conforme metodologia proposta pela AOAC INTERNATIONAL (1995).

#### 4.8.3 Avaliação sensorial para estimativa da vida útil do leite

Os 4 lotes de leite processados no sistema asséptico desenvolvido, denominados lote 1, lote 2, lote 3 e lote 4, tiveram sua estabilidade sensorial avaliada por uma equipe de 30 provadores, consumidores habituais de leite longa vida, através de testes de aceitação, utilizando uma escala hedônica estruturada mista de 9 pontos. As amostras foram apresentadas monadicamente (individualmente) aos provadores em copos plásticos de 50mL a uma temperatura próxima a 12°C. Os testes foram realizados em cabines individuais iluminadas com luz branca. O número máximo de amostras avaliadas por sessão foi 5. A ficha de avaliação utilizada pelos provadores é apresentada no Anexo 4.

Conforme proposto pela American Society for Testing and Materials (1993) (ASTM E 18.06.07), as avaliações foram realizadas em diferentes fases do período de estocagem não refrigerada. Os atributos avaliados, seqüencialmente, foram: aparência, aroma, sabor e impressão global. A primeira sessão de análise sensorial foi feita após o teste de esterilidade comercial dos lotes produzidos (incubação a 35°C/10 dias). As análises foram feitas a partir de 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11 e 13 semanas da data de produção, visando uma estimativa do tempo de vida útil do produto, adotando-se o seguinte critério: quando as médias das notas foram inferiores a 6, correspondente a “gostei ligeiramente” na escala hedônica, para qualquer dos atributos avaliados, considerou-se o fim da vida útil do lote em questão.

Na primeira sessão realizada foram introduzidas 4 marcas comerciais de leite longa vida adquiridas no mercado local, a saber: 3 marcas de leite em embalagem laminada cartonada, composta por alumínio, cartão e polietileno, e uma marca em garrafa plástica de polietileno de alta densidade (PEAD), com barreira à luz.

As amostras comerciais foram comparadas entre si no tempo “0”, selecionando-se aquela de melhor aceitação, utilizada como amostra controle nos testes subseqüentes. O controle era adquirido na véspera da cada sessão realizada com a data de produção mais recente encontrada no mercado. No dia anterior às análises, as amostras foram condicionadas a 4°C.

Os lotes produzidos e as marcas comerciais tiveram suas datas de fabricação próximas entre si, para minimizar o efeito de diferenças resultantes de alterações sensoriais produzidas durante a estocagem.

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM

Os testes realizados na caracterização da embalagem, conforme descrito em Alves et al (1998), seguindo as normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), foram:

- Avaliação dimensional;
- Distribuição de espessura;
- Peso da garrafa;
- Capacidade volumétrica;
- Torque de fechamento e abertura;
- Integridade de fechamento;
- Taxa de permeabilidade ao oxigênio;
- Opacidade.

##### 4.9.1 Avaliação dimensional

As dimensões da embalagem determinadas foram altura total, diâmetro do corpo e diâmetro externo da terminação, utilizando-se uma régua e um paquímetro.

##### 4.9.2 Distribuição de espessura

A distribuição de espessura das garrafas e tampas foi verificada com o medidor de espessura MAGNA-MIKE<sup>®</sup> model 8000; dos lacres de AL/PEBD, com o medidor eletrônico MITUTOYO ABSOLUTE.

##### 4.9.3 Peso da embalagem

As garrafas tiveram seu peso medido em uma balança semi-analítica (com 2 casas decimais) QUIMIS BG 2000.

#### 4.9.4 Capacidade volumétrica

Os volumes total e útil das embalagens foram determinados utilizando-se água e uma proveta.

#### 4.9.5 Torque de fechamento e abertura

O torque de fechamento e abertura das embalagens foi verificado em torquímetro REGMED modelo TT-170/A com escala de 0 a 3N.m.

#### 4.9.6 Integridade do fechamento através de termosselagem por indução

Uma forma de detectar e localizar vazamentos do sistema de fechamento de embalagens rígidas é através do ensaio de emissão de bolhas, cujo princípio consiste na criação de uma pressão diferencial entre o interior e o exterior da embalagem e, caso haja vazamento, observa-se a formação de bolhas no líquido externo (lado de baixa pressão) (Alves *et al*, 1998).

A integridade do fechamento das embalagens foi verificada anteriormente ao envase do leite através do referido ensaio. A selagem das garrafas, com lacre de alumínio, foi feita em uma termosseladora de tampas por indução COMPAK™ JR. ML0038-02 da Enercon Industries Corporation, com potência alta durante 2s.

#### 4.9.7 Taxa de permeabilidade ao oxigênio

A Taxa de permeabilidade ao O<sub>2</sub> (TPO<sub>2</sub>) das embalagens foi determinada pelo método coulométrico em aparelho de transmissão de oxigênio, do tipo OX-TRAN 2/20 da MOCON/Modern Controls, INC; com acessório para fixação da embalagem no aparelho e sensor coulométrico sensível ao oxigênio, operando com eficiência constante para monitorar a quantidade de oxigênio que permeava a embalagem.

#### 4.9.8 Medida da opacidade

A determinação da opacidade das garrafas plásticas foi realizada em espectrofotômetro para cor HUNTER LAB modelo COLORQUEST II, adotando o modo de calibração RSIN (reflectância especular incluída) iluminante D65, com ângulo de observação de 10° em sistema de cor CIELab.

Através deste método foi determinada a opacidade (em %) das garrafas de PEAD utilizadas na pesquisa. Comparativamente, mediu-se a opacidade de embalagens comercialmente utilizadas para leite longa vida.



#### 4.10 Análise estatística dos resultados

Os resultados da avaliação sensorial foram processados através de análise de variância (ANOVA), teste de Tukey para comparação de médias entre as amostras para cada tempo de estocagem, histograma de frequência de notas e análise de regressão entre os tempos de estocagem para estimativa da vida útil.

Os dados referentes à análise sensorial do produto foram tratados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) para verificar a existência ou não de diferença significativa entre os diferentes lotes produzidos, para os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global. A diferença estatística entre as médias, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), foi determinada pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas em microcomputador, utilizando-se o programa STATISTICA® versão 6.0 e SAS, versão 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

### 5 resultados e discussão

#### 5.1 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO SISTEMA ASSÉPTICO

No processo produtivo ocorrem inúmeras interferências, agregando-se ao produto em elaboração características que serão expressas quando acabado e em sua embalagem final. Essas interferências podem ser especificadas como fases do processo de fabricação, na ótica produtiva. Mas do ponto de vista microbiológico, cada etapa do processo agrega uma determinada carga microbiana. Seguindo esta lógica, conclui-se que todas as etapas de produção, bem como tudo que está diretamente ligado a esta, deverá sofrer controle microbiológico (Amaral, 2004).

##### 5.1.1 Certificação de conformidade da área limpa

Os resultados das certificações da área limpa estão apresentados no Anexo 5, tendo esta sido aprovada para desempenhar sua função como componente do sistema asséptico avaliado.

##### 5.1.2 Testes preliminares que antecederam aos processamentos

###### 5.1.2.1 Conformidade das condições operacionais da área limpa

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos a partir de testes preliminares visando conhecer e estabelecer os parâmetros de controle e

verificação de conformidade das condições operacionais da área limpa, para seu posterior uso.

#### 5.1.2.1.1 Pressurização da sala de envase

A Tabela 8 apresenta as medições de pressão diferencial verificadas entre a sala de envase nos três estados ocupacionais e a planta adjacente. Observou-se que a pressão se manteve constante, sendo, aproximadamente, o dobro daquela estabelecida como mínima para assegurar o grau de limpeza da sala de envase, em todas as medições realizadas. O estado ocupacional *em operação* foi simulado para realização do teste.

**Tabela 8** - Pressão diferencial entre a sala de envase e planta adjacente.

ESTADO OCUPACIONAL DA SALA MONITORADA	DIFERENCIAL DE PRESSÃO ENTRE A SALA DE ENVASE E PLANTA PILOTO ADJACENTE
	Diferencial registrado (mmca)
<i>como construída</i>	2,5
<i>em repouso</i>	2,5
<i>em operação</i>	2,5

Diferencial mínimo recomendado de acordo com o guia da FDA e normas *US Federal Standard 209E*, IES-PP-CC 006-2, NBR 13413 e NBR 13700: 1,2mmca ( $\simeq$ 12Pa).

mmca - milímetros de coluna d'água.

Um modo para manter constante a pressão da sala limpa durante a entrada de material, equipamento e pessoal é prevendo uma antecâmara entre a sala limpa e o resto da instalação (neste caso o vestiário), com duas portas que não se abrem simultaneamente.

Como comentado na revisão bibliográfica, medidas de pressão abaixo de 1,2mmca não garantem a manutenção da limpeza de um ambiente. Da mesma forma, uma pressão muito alta dentro de um ambiente classificado, poderá gerar uma situação de turbulência de ar e assim fazer com que haja uma geração muito grande de partículas em suspensão, dificultando sua retirada pelo sistema de ar.

### 5.1.2.1.2 Verificação da velocidade, vazão e taxa de movimentação de ar

A Tabela 9 mostra as velocidades do ar insuflado verificadas nos três estados ocupacionais da área limpa para o cálculo de vazão e número de movimentações do ar. Em todos os três ambientes monitorados, esse número excedeu aos parâmetros estabelecidos, proporcionando uma qualidade adicional à limpeza do ar interno, devido ao elevado número de movimentações. O estado ocupacional *em operação* foi simulado para realização dos testes.

**Tabela 9** - Parâmetros de controle do ar insuflado na área limpa.

AMBIENTE MONITORADO	ESTADO OCUPACIONAL	VELOCIDADE DO AR INSUFLADO <sup>2</sup> (m/s)	VAZÃO MÉDIA (m <sup>3</sup> /s)	NÚMERO DE MOVIMENTAÇÕES /H	PARÂMETRO DE ACEITAÇÃO DE MOVIMENTAÇÕES <sup>3</sup>
<b>SALA DE ENVASE<sup>1</sup></b> (ISO classe 7)	<i>como construída</i>	1,44	0,30	109	> 35
	<i>em repouso</i>	1,44	0,30	109	
	<b><i>em operação</i></b>	<b>1,49</b>	<b>0,31</b>	<b>113</b>	
<b>ANTE-SALA</b> (ISO classe 8)	<i>como construída</i>	1,41	0,10	48	> 15
	<i>em repouso</i>	1,51	0,14	51	
	<b><i>em operação</i></b>	<b>1,46</b>	<b>0,10</b>	<b>66</b>	
<b>VESTIÁRIO</b> (ISO classe 8)	<i>como construída</i>	1,45	0,10	49	> 15
	<i>em repouso</i>	1,48	0,13	50	
	<b><i>em operação</i></b>	<b>1,56</b>	<b>0,11</b>	<b>70</b>	

<sup>1</sup> média dos 4 difusores de ar.

<sup>2</sup> média de 4 leituras.

<sup>3</sup> de acordo com as normas IES-PP-CC 006-2, NBR 13413 e NBR 13700.

A literatura consultada não mencionou a relação entre os parâmetros de aceitação estabelecidos para taxa de movimentação de ar em áreas limpas e seu estado de ocupação monitorado.

Conforme Bennett (1997), os testes de desempenho especificados para as condições em repouso e em operação estão tipicamente fora do controle dos projetistas e instaladores.

### 5.1.2.1.3 Contagem de partículas totais em suspensão

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos na contagem eletrônica de partículas totais em suspensão na sala de envase, ante-sala e vestiário, para os três estados ocupacionais monitorados.

**Tabela 10** - Contagem de partículas totais em suspensão na área limpa.

AMBIENTE MONITORADO	ESTADO OCUPACIONAL	CONTAGEM DE PARTÍCULAS (/m <sup>3</sup> de ar)		PADRÃO ISO 14644-1 (partículas/m <sup>3</sup> de ar)	
		≥ 0,5µm	≥ 5,0µm	≥ 0,5µm	≥ 5,0µm
<b>SALA DE ENVASE</b> <sup>1</sup> (ISO classe 7)	<i>como construída</i>	5 371	106		
	<i>em repouso</i>	5 018	0	352 000	2 930
	<b><i>em operação</i></b>	<b>81 237</b>	<b>1 131</b>		
<b>ANTE-SALA</b> (ISO classe 8)	<i>como construída</i>	18 339	424		
	<i>em repouso</i>	27 420	1 060	3 520 000	29 300
	<b><i>em operação</i></b>	<b>76 608</b>	<b>1 837</b>		
<b>VESTIÁRIO</b> (ISO classe 8)	<i>como construída</i>	96 537	459		
	<i>em repouso</i>	116 078	353	3 520 000	29 300
	<b><i>em operação</i></b>	<b>1 406 678</b>	<b>92 509</b>		
<b>ÁREA EXTERNA</b> <sup>2</sup>	NA	2 357 032	7 208	NA	NA

<sup>1</sup>média de contagens em 5 pontos.

<sup>2</sup>planta piloto adjacente à área limpa.

NA – não aplicável.

Não foi verificado na literatura consultada nenhuma menção sobre uma eventual relação entre os padrões estabelecidos para classificação de áreas limpas e seu respectivo estado de ocupação. Entretanto, espera-se que os resultados dos testes de conformidade no estado em operação atendam plenamente aos padrões vigentes, já que tal estado representa a condição real do ambiente no qual ocorre a manipulação, processamento ou envase do produto.

A Tabela 10 indica uma tendência para o aumento da contagem na área limpa em operação, justificada pela movimentação do operador e de materiais no interior do ambiente, decorrente das condições do processo. Ou seja, essa movimentação gera e dispersa partículas no ambiente, resultando no aumento das contagens.

Os resultados da monitoração de partículas totais, em três operações simuladas, podem ser observados na Tabela 11. As contagens de partículas no ponto de envase feitas no início, meio e fim das três operações atenderam plenamente aos padrões internacionais estabelecidos pela ISO 14644-1 para sala limpa ISO classe 7, considerando as partículas de dimensões iguais ou superiores a  $0,5\mu\text{m}$  e  $5,0\mu\text{m}$ . Os resultados evidenciaram, portanto, a conformidade da sala limpa quanto à concentração de partículas totais em suspensão no ar.

**Tabela 11-** Contagem de partículas totais no ar no ponto de envase.

SIMULAÇÃO	CONTAGEM DE PARTÍCULAS TOTAIS NO ENVASE (partículas/m <sup>3</sup> )							
	INÍCIO		MEIO		FIM		MÉDIA	
	$\geq 0,5\mu\text{m}$	$\geq 5,0\mu\text{m}$	$\geq 0,5\mu\text{m}$	$\geq 5,0\mu\text{m}$	$\geq 0,5\mu\text{m}$	$\geq 5,0\mu\text{m}$	$\geq 0,5\mu\text{m}$	$\geq 5,0\mu\text{m}$
S <sub>1</sub>	21.000	< 1.000	43.000	< 1.000	28.000	< 1.000	30.667	< 1.000
S <sub>2</sub>	118.000	1.000	56.000	1.000	46.000	1.000	73.333	1.000
S <sub>3</sub>	112.000	1.000	74.000	1.000	31.000	< 1.000	72.333	< 1.000

Padrão ISO 14644-1 para contagem máxima de partículas totais em sala limpa ISO classe 7 (Classe 10 000):  
 352.000 partículas  $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$  de ar;  
 2.930 partículas  $\geq 5,0\mu\text{m}/\text{m}^3$  de ar.

#### 5.1.2.1.4 Monitoração ativa de microrganismos no ar

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos no monitoramento de microrganismos no ar da área limpa. De forma geral, nota-se que a contagem aumenta no estado em operação, fato explicado pela circulação de operadores no ambiente e conseqüente dispersão de partículas. Com exceção do vestiário no estado *em operação*, todas as outras contagens realizadas nos três estados de ocupação atenderam ao padrão NASA, conforme citado por Sveum et al (1992), indicando a adequação do ambiente quanto ao número de microrganismos no ar.

**Tabela 12** - Contagem de microrganismos em suspensão na área limpa.

AMBIENTE MONITORADO	ESTADO OCUPACIONAL	CONTAGEM DE MICRORGANISMOS (UFC/m <sup>3</sup> de ar)		PADRÃO NASA (UFC/m <sup>3</sup> de ar)
		Global	Bolores e leveduras	
<b>SALA DE ENVASE</b> <sup>1</sup> (ISO classe 7)	<i>como construída</i>	1,2	0	17,7
	<i>em repouso</i>	0,4	0	
	<b><i>em operação</i></b>	<b>15,2</b>	<b>2,4</b>	
<b>ANTE-SALA</b> (ISO classe 8)	<i>como construída</i>	10	0	88,3
	<i>em repouso</i>	0	12	
	<b><i>em operação</i></b>	<b>38</b>	<b>2</b>	
<b>VESTIÁRIO</b> (ISO classe 8)	<i>como construída</i>	8	0	88,3
	<i>em repouso</i>	0	12	
	<b><i>em operação</i></b>	<b>170</b>	<b>62</b>	
<b>ÁREA EXTERNA</b> <sup>2</sup>	NA	incontável	incontável	

<sup>1</sup>Média de contagens em 5 pontos.

<sup>2</sup>planta piloto adjacente à área limpa.

NA – não aplicável.

Segundo a ISO 14644, citada por Amaral (2004), os limites para contagem total de microrganismos aeróbios presentes em ambientes ISO classe 7 e ISO classe 8 são <20 e <100UFC/m<sup>3</sup> de ar, respectivamente.

A Tabela 13 apresenta os resultados da monitoração ativa de microrganismos no ar na sala de envase no estado ocupacional *em operação*, mostrando que as contagens obtidas em cada ponto monitorado, em duas avaliações independentes, também atenderam aos limites definidos pela NASA para área limpa ISO classe 7. As médias das contagens de microrganismos nas duas avaliações foram bem abaixo do padrão internacional estabelecido.

**Tabela 13** - Contagem de microrganismos no ar na sala de envase *em operação*.

PONTO MONITORADO	CONTAGEM GLOBAL (UFC/m <sup>3</sup> )	
	AVALIAÇÃO 1	AVALIAÇÃO 2
P <sub>1</sub>	2	16
P <sub>2</sub>	< 2	8
P <sub>3</sub>	2	8
P <sub>4</sub>	2	4
P <sub>5</sub>	4	6
média da sala limpa	< 2,4	6,6

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> - pontos abaixo dos difusores de ar.

P<sub>4</sub> - abaixo do difusor alinhado com o ponto de envase.

P<sub>5</sub> - ponto no centro da sala de envase.

Padrão NASA para sala limpa ISO classe 7:  $\leq 17,7 \text{ UFC/m}^3$ .

Os resultados das contagens de microrganismos no ponto de envase, feitas no início, meio e fim de três operações independentes e simuladas, são apresentados na Tabela 14. Novamente, as contagens foram inferiores ao padrão NASA, indicando a conformidade de desempenho da sala limpa em avaliação.

**Tabela 14** - Contagem de microrganismos em suspensão no ponto de envase.

SIMULAÇÃO	CONTAGEM GLOBAL NO ENVASE (UFC/m <sup>3</sup> )			
	INÍCIO	MEIO	FIM	MÉDIA
S <sub>1</sub>	< 2	4	2	< 2,7
S <sub>2</sub>	< 2	8	< 2	< 4,0
S <sub>3</sub>	10	4	2	5,3

Padrão NASA para sala limpa ISO classe 7:  $\leq 17,7 \text{ UFC/m}^3$ .

#### 5.1.2.1.5 Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies

A Tabela 15 apresenta os resultados de duas avaliações de superfícies na sala de envase, indicando seu elevado grau de limpeza, baseado nos padrões

estabelecidos pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) e *American Public Health Association* (APHA). Em placas de RODAC, onde não foi observado desenvolvimento microbiano após o contato com a superfície avaliada, os resultados foram expressos como  $< 0,04\text{UFC}/\text{cm}^2$ , resultado da divisão de  $< 1\text{UFC}/25,5\text{ cm}^2$ , área de contato da placa. De acordo com Snyder (1992), o grau de limpeza das superfícies na sala de envase foi classificado como excelente ( $< 1\text{UFC}/\text{cm}^2$ ), apesar do produto não contactar diretamente a superfície.

**Tabela 15** - Contagem global de microrganismos em superfícies na sala limpa.

PONTO MONITORADO	CONTAGEM GLOBAL <sup>1</sup> (UFC/cm <sup>2</sup> )	
	AVALIAÇÃO 1	AVALIAÇÃO 2
parede 1 (10,0m <sup>2</sup> )	0,07	0,01
parede 2 (10,5m <sup>2</sup> )	0,01	0,04
parede 3 (10,0m <sup>2</sup> )	0,09	$< 0,04$
parede 4 (10,5m <sup>2</sup> )	0,07	$< 0,04$
teto (16,8m <sup>2</sup> )	$< 0,04$	$< 0,04$
mesa (2,0m <sup>2</sup> )	0,05	$< 0,04$
caixa de passagem (0,12m <sup>2</sup> )	0,01	0,01

<sup>1</sup> - média de 6 pontos amostrados.

Padrões internacionais para contagens médias em superfícies sanitizadas

ICMSF:  $< 10\text{UFC}/\text{cm}^2$

APHA:  $< 2\text{UFC}/\text{cm}^2$

#### 5.1.2.2 Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase

Os resultados da avaliação dos procedimentos de esterilização química da linha de processamento e envase, através da coleta e análise microbiológica da água de enxágüe, estão evidenciados na Tabela 16. Em 8 das 10 amostras de 30mL de água analisadas, a contagem padrão em placas foi 0, tendo sido observado a presença de 1UFC em 2 das amostras analisadas. Os resultados apresentados apontam, portanto, uma relativa eficiência dos procedimentos



adotados na limpeza e esterilização da linha, sugerindo por outro lado, a necessidade de um monitoramento contínuo, realizado em todo processo produtivo.

**Tabela 16** - Contagem padrão em placas na água de enxágüe da linha de processamento e envase.

AMOSTRA DE ÁGUA DE ENXÁGÜE	CONTAGEM GLOBAL (UFC/30mL)
A <sub>0</sub>	0
A <sub>1</sub>	0
A <sub>2</sub>	1
A <sub>3</sub>	1
A <sub>4</sub>	0
A <sub>5</sub>	0
A <sub>6</sub>	0
A <sub>7</sub>	0
A <sub>8</sub>	0
A <sub>9</sub>	0
MÉDIA (UFC/mL)	0,01

### 5.1.3 Controles simultâneos aos processamentos preliminares

#### 5.1.3.1 Conformidade das condições operacionais da área limpa

##### 5.1.3.1.1 Pressurização da área limpa

A pressão diferencial verificada entre a sala de envase *em operação* e a planta adjacente manteve-se constante durante todo o processo, equivalente a 2,5mmca (25Pa), o dobro daquela estabelecida como mínima para assegurar o grau de limpeza do ambiente de envase, equivalente a 1,2mmca (12Pa), de

acordo com o guia da FDA e normas IES-PP-CC 006-2, NBR 13413 e NBR 13700.

#### 5.1.3.1.2 Contagem de partículas totais no ar

Os resultados da contagem de partículas totais, feita simultaneamente ao envase de 2 lotes de leite, podem ser observados na Tabela 17. As contagens de partículas feitas no início, meio e fim dos 2 envases satisfizeram aos padrões internacionais estabelecidos pela ISO 14644-1 para sala limpa ISO classe 7, considerando as partículas de dimensões iguais ou superiores a 0,5 e 5,0µm. Os resultados indicaram a conformidade da sala limpa quanto à concentração de partículas totais em suspensão no ar.

**Tabela 17** - Contagem de partículas totais no ar no ponto de envase da sala limpa em operação.

ENVASE	CONTAGEM DE PARTÍCULAS TOTAIS NO ENVASE (partículas/m <sup>3</sup> )							
	INÍCIO		MEIO		FIM		MÉDIA	
	≥0,5µm	≥5,0µm	≥0,5µm	≥5,0µm	≥0,5µm	≥5,0µm	≥0,5µm	≥5,0µm
Lote 1	44.000	1.000	49.000	< 1.000	61.000	< 1.000	51.333	< 1.000
Lote 2	68.000	< 1.000	33.000	< 1.000	28.000	1.000	43.000	< 1.000

Padrão ISO 14644-1 para contagem máxima de partículas totais em sala limpa ISO classe 7:  
 352.000 partículas ≥ 0,5µm/m<sup>3</sup> de ar;  
 2.930 partículas ≥ 5,0µm/m<sup>3</sup> de ar.

#### 5.1.3.1.3 Monitoração ativa de microrganismos no ar

A Tabela 18 apresenta os resultados da monitoração ativa de microrganismos no ar no ponto de envase, realizada no início, meio e fim da operação; mostrando que as contagens obtidas durante o acondicionamento do lote 1 e do lote 2 atenderam plenamente aos limites definidos pela NASA para área limpa ISO classe 7. A reduzida concentração de microrganismos em suspensão na sala de envase assegurou o alto grau de limpeza do ambiente, um dos componentes fundamentais para o bom desempenho do sistema asséptico desenvolvido.

**Tabela 18** - Contagem de microrganismos em suspensão no ponto de envase da sala limpa *em operação*.

ENVASE	CONTAGEM GLOBAL NO ENVASE (UFC/m <sup>3</sup> )			
	INÍCIO	MEIO	FIM	MÉDIA
Lote 1	< 2	4	6	< 4
Lote 2	< 2	2	< 2	< 2

Padrão NASA para sala limpa ISO classe 7:  $\leq 17,7 \text{ UFC/m}^3$ .

#### 5.1.3.1.4 Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies

A Tabela 19 mostra os resultados das avaliações de limpeza de superfícies na sala de envase. As amostragens foram feitas na mesa de aço inoxidável e na caixa de passagem, poucas horas antes do início do envase dos lotes 1 e 2, em dias consecutivos. A comparação dos resultados com os padrões estabelecidos pela ICMSF e APHA indicam o elevado grau de limpeza das superfícies avaliadas, adequado a ambientes assépticos. De acordo com Snyder (1992), o grau de limpeza das superfícies na sala de envase, avaliado pela técnica de contato com placas de RODAC, foi classificado como excelente ( $< 1 \text{ UFC/cm}^2$ ).

**Tabela 19** - Contagem global de microrganismos em superfícies na sala limpa.

PONTO MONITORADO	CONTAGEM GLOBAL <sup>1</sup> (UFC/cm <sup>2</sup> )	
	ENVASE DO LOTE 1	ENVASE DO LOTE 2
mesa (2m <sup>2</sup> )	< 0,04	0,03
caixa de passagem (0,12 m <sup>2</sup> )	0,02	0,01

<sup>1</sup> - média de 6 pontos amostrados.

Padrões internacionais para contagens médias em superfícies sanitizadas

ICMSF:  $< 10 \text{ UFC/cm}^2$

APHA:  $< 2 \text{ UFC/cm}^2$

#### 5.1.3.2 Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase

Os resultados da avaliação dos procedimentos de esterilização da linha de processamento e envase, através da coleta e análise microbiológica da água de

enxágüe, estão indicados na Tabela 20. Em apenas uma das amostras de água coletadas imediatamente antes do início do envase dos lotes 1 e 2, a contagem padrão em placas foi 1UFC. Os resultados apresentados apontam uma relativa eficiência dos procedimentos adotados na limpeza e esterilização da linha.

**Tabela 20** - Contagem padrão em placas na água de enxágüe da linha de processamento e envase.

ÁGUA DE ENXÁGÜE	CONTAGEM GLOBAL (UFC/30mL)	
	ENVASE DO LOTE 1	ENVASE DO LOTE 2
A <sub>1</sub>	0	1
A <sub>2</sub>	0	0
A <sub>3</sub>	0	0
Média (UFC/30mL)	0	0,33
Média (UFC/mL)	< 0,03	0,01

#### 5.1.4 Controles simultâneos aos processamentos finais

##### 5.1.4.1 Conformidade das condições operacionais da área limpa

###### 5.1.4.1.1 Pressurização

A pressão diferencial verificada entre a sala de envase *em operação* e a planta adjacente manteve-se constante durante todo o processo, equivalente a 2,8mmca (28Pa) sendo mais que o dobro daquela estabelecida como mínima para assegurar o grau de limpeza do ambiente de envase, equivalente a 1,2mmca (12Pa), de acordo com o guia da FDA e normas IES-PP-CC 006-2, NBR 13413 e NBR 13700.

###### 5.1.4.1.2 Contagem de partículas totais no ar

Os resultados da contagem de partículas totais, apresentados na Tabela 21, satisfizeram aos padrões estabelecidos pela ISO 14644-1 para sala limpa ISO

classe 7, evidenciando a conformidade do ambiente quanto a concentração de partículas totais no ar.

**Tabela 21** - Contagem de partículas totais no ar no ponto de envase da sala limpa *em operação*.

PROCESSO	CONTAGEM DE PARTÍCULAS TOTAIS NO PONTO DE ENVASE (partículas/m <sup>3</sup> de ar)							
	INÍCIO		MEIO		FIM		MÉDIA	
	≥0,5µm	≥5,0µm	≥0,5µm	≥5,0µm	≥0,5µm	≥5,0µm	≥0,5µm	≥5,0µm
P <sub>1</sub>	30.000	<1.000	24.000	<1.000	34.000	<1.000	29.333	<1.000
P <sub>2</sub>	49.000	<1.000	29.000	<1.000	66.000	1.500	48.000	<1.167
P <sub>3</sub>	21.000	<1.000	39.500	<1.000	21.500	<1.000	27.333	<1.000
P <sub>4</sub>	45.000	<1.000	24.000	<1.000	23.500	<1.000	30.833	<1.000

O padrão ISO 14644-1 para contagem máxima de partículas totais em sala limpa ISO classe 7 é 352.000 partículas ≥ 0,5µm/m<sup>3</sup> de ar e 2.930 partículas ≥ 5,0µm/m<sup>3</sup> de ar.

A média de 4 contagens realizadas na planta de processamento, adjacente à sala limpa, foi 12.103.000 partículas ≥ 0,5µm/m<sup>3</sup> de ar e 6.500 partículas ≥ 5,0µm/m<sup>3</sup> de ar. Estes resultados comparados aos da Tabela 21 evidenciaram a importância da aplicação da tecnologia de salas limpas no controle da contaminação ambiental.

#### 5.1.4.1.3 Monitoração ativa de microrganismos no ar

A Tabela 22 apresenta os resultados da monitoração ativa de microrganismos no ar no ponto de envase, simultaneamente à contagem de partículas totais, realizada no início, meio e fim da operação. As contagens obtidas durante o acondicionamento dos lotes 1, 2, 3 e 4 atenderam plenamente aos limites definidos pela NASA. A reduzida concentração de microrganismos em suspensão na sala de envase assegurou o alto grau de limpeza do ambiente.

**Tabela 22** - Contagem padrão em placas de microrganismos no ar no ponto de envase da sala limpa *em operação*.

PROCESSO	CONTAGEM GLOBAL NO PONTO DE ENVASE (UFC/m <sup>3</sup> de ar)			
	INÍCIO	MEIO	FIM	MÉDIA
P <sub>1</sub>	<2	<2	2	<2
P <sub>2</sub>	4	4	<2	<3,3
P <sub>3</sub>	2	4	<2	<2,7
P <sub>4</sub>	<2	<2	4	<2,7

Padrão NASA para sala limpa ISO classe 7:  $\leq 17,7 \text{ UFC/m}^3$  de ar.

Segundo a ISO 14644, citada por Amaral (2004), o limite máximo para contagem total de microrganismos aeróbios presentes em ambientes ISO classe 7 é  $<20 \text{ UFC/m}^3$  de ar.

De modo similar à contagem de mesófilos aeróbios totais, os resultados da Tabela 23 indicam um reduzido número de bolores em suspensão no ar da sala limpa, constatação desejável e essencial para o bom desempenho da operação de envase. Limites para contagens de bolores, associados à classe de limpeza do ambiente, não foram encontrados na literatura pesquisada.

**Tabela 23** - Contagem de bolores em PDA em suspensão no ponto de envase da sala limpa *em operação*.

PROCESSO	CONTAGEM DE BOLORES NO PONTO DE ENVASE (UFC/m <sup>3</sup> de ar)			
	INÍCIO	MEIO	FIM	MÉDIA
P <sub>1</sub>	<2	<2	<2	<2
P <sub>2</sub>	2	4	2	2,7
P <sub>3</sub>	2	<2	2	<2

P <sub>4</sub>	4	2	4	3,3
----------------	---	---	---	-----

### *Monitoração do ar na planta de processamento*

Para estabelecer uma comparação entre diferentes ambientes, relativa à concentração de microrganismos no ar, foram feitas 3 amostragens de ar em PCA e PDA/cloranfenicol na planta de processamento. A Tabela 24 mostra o contraste entre o ambiente avaliado e a sala limpa.

**Tabela 24** - Monitoração ativa de microrganismos em suspensão no ar da planta de processamento.

Amostragem de ar	Contagem padrão em placas* (UFC/m <sup>3</sup> de ar)	Contagem de bolores e leveduras* (UFC/m <sup>3</sup> de ar)
1	178	84
2	86	58
3	86	94
Média	117	79

\* valores estimados devido ao espalhamento de colônias na superfície do meio.

As contagens de microrganismos no ar podem atingir até 10<sup>4</sup>UFC/m<sup>3</sup>, casos em que sua qualidade é considerada insatisfatória (Troller, 1993). Heldman (1974) verificou uma média de 2,8.10<sup>2</sup> UFC/m<sup>3</sup> em plantas de embalagem de leite. Geralmente, as contagens de microrganismos no ar atingem 10<sup>3</sup>UFC/m<sup>3</sup> durante um período normal de processamento.

Kang e Frank (1989) indicam padrões para contagem inferiores a 1,8x10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup> em áreas limpas para acondicionamento asséptico, valor muito superior àqueles determinados na sala limpa monitorada.

Radmore et al (1988) propõem limites para contaminação máxima/m<sup>3</sup> de ar em ambiente industrial, definidos em função do diâmetro do gargalo da embalagem utilizada e do tempo de exposição durante o envase. Para embalagens com 10cm<sup>2</sup> de abertura, próxima à área do gargalo da garrafa

utilizada nesta pesquisa, a contaminação máxima estabelecida é 38UFC/m<sup>3</sup> de ar, considerando um tempo médio de exposição no instante do envase de 10s.

#### 5.1.4.1.4 Avaliação de limpeza e sanificação de superfícies

A Tabela 25 mostra os resultados das avaliações de superfícies na sala de envase, indicando seu elevado grau de limpeza, baseado nos padrões estabelecidos pela ICMSF e APHA. De acordo com Snyder (1992), o grau de limpeza das superfícies na sala de envase, avaliado pela técnica de contato com placas de RODAC, foi classificado como excelente (<1UFC/cm<sup>2</sup>).

**Tabela 25** - Contagem microrganismos em superfícies na sala de envase em placa de RODAC.

PROCESSO	CONTAGEM EM PCA <sup>1</sup> (UFC/cm <sup>2</sup> )	
	Mesa (2m <sup>2</sup> )	Caixa de passagem (0,12m <sup>2</sup> )
P <sub>1</sub>	0	0
P <sub>2</sub>	0,02	0,02
P <sub>3</sub>	0	0,02
P <sub>4</sub>	0	0

<sup>1</sup> - média de 6 pontos amostrados.

Os padrões internacionais para contagens médias em superfícies sanitizadas, determinados pela ICMSF e APHA, são <10UFC/cm<sup>2</sup> e <2UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Segundo a ISO 14644, citada por Amaral (2004), o limite máximo para contagem total de microrganismos aeróbios presentes em ambientes ISO classe 7 é ≤0,2UFC/cm<sup>2</sup>.

#### 5.1.4.2 Análise da água de enxágüe da linha de processamento e envase

Os resultados da avaliação dos procedimentos de esterilização da linha de processamento e envase, através da coleta e análise microbiológica da água de enxágüe, estão indicados na Tabela 26.



Foram coletadas 3 amostras de 450mL da água de enxágüe no ponto de envase imediatamente antes do processamento e plaqueados 30mL em PCA, seguido de incubação a 35°C/48h.

**Tabela 26** - Contagem padrão em placas na água de enxágüe da linha de processamento e envase.

ÁGUA DE ENXÁGÜE	CONTAGEM GLOBAL (UFC/30mL)			
	PROCESSO 1	PROCESSO 2	PROCESSO 3	PROCESSO 4
A <sub>1</sub>	0	0	0	7
A <sub>2</sub>	0	1	0	0
A <sub>3</sub>	1	1	0	1
Média (UFC/mL)	0,01	0,02	<0,03	0,09

Os resultados indicam uma relativa eficiência dos procedimentos adotados na limpeza e esterilização da linha, sugerindo a necessidade de um monitoramento sistemático, realizado em todo processo produtivo.

Padrões para contagem de microrganismos em água de enxágüe de linha asséptica não foram encontrados na literatura pesquisada.

#### 5.1.4.3 Análise da água de enxágüe das embalagens

As 1.200 embalagens utilizadas nos 4 processos foram divididas e esterilizadas em 2 etapas. 3 amostras de água utilizada no enxágüe das garrafas foram tomadas em 4 pontos da linha de assepsia, conforme ilustrada em *Material e Métodos*. O volume de água plaqueado foi de 30mL por amostra coletada.

Os resultados apresentados na Tabela 27 indicam a contagem de mesófilos aeróbios totais em cada ponto amostrado. Apesar da baixa contagem microbiana detectada na água de enxágüe das embalagens, deve-se atentar para a necessidade da manutenção de uma limpeza e esterilização eficientes da linha imediatamente antes da operação de assepsia das embalagens, além de monitorações regulares, para assegurar a qualidade microbiológica da água utilizada no enxágüe das embalagens. A operação de enxágüe foi considerada um

ponto crítico de controle do processo, visto que representava uma potencial e importante fonte de recontaminação do produto acondicionado.

**Tabela 27** - Contagem padrão em placas na água de enxágüe das embalagens<sup>1</sup>.

PONTO DE COLETA	ETAPA 1	ETAPA 2
	UFC/mL	UFC/mL
torneira	29	7
pré-filtro 1 (1µm)	0,07	0,12
filtro biológico (0,22µm)	0,01	0,01
bico aspersor do equipamento de assepsia de garrafas	0,01	0,01

<sup>1</sup> - média de resultados de 3 coletas.

Os padrões de contaminação em água considerados foram baseados em referências do setor farmacêutico, que estabelece limites de contaminação bacteriana em água purificada e água para injetáveis e equivalentes similares <100UFC/mL e <10UFC/100mL, respectivamente, conforme citado por Jönck (2002).

Conforme Vieira (2003), a maioria dos problemas de contaminação biológica (bioincrustações) relaciona-se com bactérias e, como tais, elas são o indicador mais importante da qualidade da água do sistema. É importante considerar que a qualidade microbiológica da água não é definida somente pela quantidade de microrganismos, mas pelas diferentes espécies presentes.

Em sistemas de tratamento, a quantidade de bactérias detectáveis na água circulante representa uma fração mínima do total presente. A maior parte está aderida às superfícies do sistema, sendo que superfícies lisas e polidas retardam a sua adesão inicial (Vieira, 2003).

A fisiologia pouco comum dos microrganismos permite o seu desenvolvimento em águas que contêm apenas traços de nutrientes necessários. Algumas bactérias, quando isoladas do seu ambiente normal, requerem níveis de nutrientes extremamente reduzidos para sua sobrevivência. Os dois fatores mais

importantes que influenciam a proliferação bacteriana em sistemas de água são: a área superficial e a concentração de nutrientes (Vieira, 2003).

#### 5.1.4.4 Análise microbiológica das garrafas

A análise microbiológica das garrafas obedeceu ao seguinte procedimento: 3 unidades foram analisadas antes da operação de esterilização, 3 após a esterilização e 3 tomadas imediatamente antes do envase, no interior da sala limpa.

As 1.200 embalagens utilizadas nos 4 processos foram divididas e esterilizadas em 2 etapas, conforme resultados apresentados na Tabela 28, que indicaram a eficácia do procedimento.

**Tabela 28** - Contagem padrão em placas nas garrafas destinadas ao sistema asséptico.

GARRAFA PLÁSTICA	CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (UFC/GARRAFA)				
		G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	MÉDIA
ANTES DA ESTERILIZAÇÃO	Etapa 1	6	2	180	62,7
	Etapa 2	2	0	1	1
APÓS A ESTERILIZAÇÃO <sup>1</sup>	Etapa 1	0	0	0	0
	Etapa 2	0	0	0	0
	E <sub>1</sub>	0	0	0	0
	E <sub>2</sub>	0	0	0	0
ENVASE <sup>2</sup>	E <sub>3</sub>	0	0	0	0

<sup>1</sup> - aspersão de solução esterilizante contendo 0,5%APA/30°C/10s.

<sup>2</sup> - amostras tomadas no interior da sala limpa imediatamente antes do início do envase.

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. Considerando esse valor de referência, a contaminação inicial (antes da esterilização) de apenas uma das embalagens analisadas foi considerada elevada.

De acordo com Reuter (1993), a taxa de não-esterilidade ( $F_s$ ), definida como  $F_s = (N_0/R) \cdot A$ , é resultante de uma esterilização insuficiente do material de embalagem e depende do número inicial de microrganismos aderidos à sua superfície ( $N_0/m^2$ ), da redução absoluta de microrganismos atingida no processo de esterilização ( $R$ ) e da dimensão da superfície interna da embalagem ( $A$  em  $m^2$ ). Portanto, quanto maior o tamanho da embalagem maior será a taxa de não-esterilidade.

#### 5.1.4.5 Controle de residual de peróxido de hidrogênio nas embalagens

O residual de peróxido de hidrogênio nas embalagens foi controlado utilizando-se fitas indicadoras MERCKOQUANT, através da comparação da cor da fita imersa nas embalagens com água com uma escala colorimétrica de 0 a 25mg/L de  $H_2O_2$ , tendo sido inferior a 0,5mg/L, conforme determinado pela FDA.

### 5.2 Análise da matéria-prima

#### 5.2.1 Testes microbiológicos

##### 5.2.1.1 Contagem padrão em placas

Os resultados obtidos na contagem padrão em placas da matéria-prima (leite pasteurizado tipo B) são apresentados na Tabela 29. Conforme Normas de Lácteos, apresentada em MAA (2001), o padrão microbiológico é  $4,0 \cdot 10^4$ UFC/mL. Todos os resultados apresentados na Tabela 29 atenderam à referência mencionada.

**Tabela 29** - Contagem padrão em placas na matéria-prima.

MATÉRIA-PRIMA	CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (UFC/mL de leite)			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	média
MP <sub>1</sub>	1,9.10 <sup>2</sup>	1,7.10 <sup>2</sup>	2,7.10 <sup>2</sup>	2,1.10 <sup>2</sup>
MP <sub>2</sub>	3,1.10 <sup>2</sup>	4,5.10 <sup>2</sup>	4,3.10 <sup>2</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>
MP <sub>3</sub>	3,3.10 <sup>2</sup>	5,4.10 <sup>2</sup>	7,5.10 <sup>2</sup>	5,4.10 <sup>2</sup>
MP <sub>4</sub>	3,2.10 <sup>2</sup>	4,2.10 <sup>2</sup>	6,6.10 <sup>2</sup>	4,7.10 <sup>2</sup>

MP - matéria-prima (leite pasteurizado tipo B)

R<sub>1,2,3</sub> - repetições

Embora a qualidade microbiológica da matéria-prima seja um pré-requisito para o sucesso do sistema UHT, no Brasil ainda não existe um padrão microbiológico quantitativo para sua seleção (Bizari et al, 2003).

#### 5.2.2.2 Contagem de esporos de mesófilos aeróbios

A contagem de esporos foi feita em Ágar Triptona Glucose Extrato de Carne (TGE) após um choque térmico a 80°C/30min, com incubação a 35°C/48h. Os resultados apresentados na Tabela 30 indicam a contagem de esporos nas amostras de cada lote de leite utilizado nos processamentos.

**Tabela 30** - Contagem de esporos de mesófilos aeróbios na matéria-prima.

CONTAGEM DE ESPOROS DE MESÓFILOS AERÓBIOS (UFC/mL de leite)			
L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>
10	46	21	40

L – lotes referentes aos 4 processamentos.

Quanto menor o número de esporos na matéria-prima, tanto menor o número a ser destruído e, por conseguinte, menor o número de esporos capazes de resistir ao tratamento térmico. Conforme Shew (1981), na prática comercial, os esporos sobreviventes ao tratamento UHT são bastante improváveis de causar deterioração.

De acordo com Kosinski (1996), microrganismos esporulados (*Clostridium* e *Bacillus* spp.) são freqüentemente encontrados no leite, sendo o número tão maior quanto piores as práticas higiênicas na ordenha, tais como o uso de silagem de baixa qualidade e limpeza inadequada dos equipamentos.

Segundo Mostert et al (1979), a presença de esporos bacterianos no leite *in natura* parece ser fato comum e, levando em consideração a termo-resistência de muitos deles e a probabilidade de sua ativação a altas temperaturas, características do processo UHT, o risco de problemas potenciais com o leite UHT é bastante acentuado.

Vialta (1996) cita como limite de contagem para leite UHT a concentração de 100 esporos termo-resistentes por mililitro, afirmando ser esta uma das variáveis que determinam a proporção de sobrevivência no produto final. A presença de um elevado número de esporos na matéria-prima pode tornar o leite impróprio para o processamento, devido à alta acidez e conseqüente instabilidade física da suspensão. A utilização de leite *in natura* com elevados níveis de contaminação microbiana aumenta a probabilidade da presença de enzimas termo-estáveis produzidas pelos psicrotróficos, que podem permanecer em concentrações suficientes para ocasionar vários defeitos no produto final, tais como gelificação, coagulação das proteínas e desenvolvimento de sabor amargo.

Conforme Westhoff (1978), diversas pesquisas publicadas sobre a resistência térmica de esporos em leite sugerem que há um inibidor em leite UHT que previne o desenvolvimento de *Bacillus stearothermophilus*.

### 5.2.2 Testes físico-químicos

Amostras retiradas dos 4 latões de 50L de leite, após homogeneização, foram misturadas e submetidas à análise físico-química, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 31.

Segundo as Novas Normas de Produção de Lácteos, publicada em 2001, a temperatura do leite na recepção não deve exceder a 7°C, limite ultrapassado, provavelmente ocasionado pelo transporte do leite da Cooperativa de Leite Campinas até a planta piloto do DTA/FEA, em condições não isotérmicas.

A resolução MERCOSUL/GMC/RES.Nº 78/94, que define o regulamento técnico de identidade do leite processado em ultra alta temperatura (UAT),

estabelece que a acidez, expressa em g de ácido láctico/100mL de leite deve estar compreendida na faixa entre 0,14 a 0,18, valores equivalentes a 14 e 18°D, respectivamente. A acidez do leite dos lotes 1 e 2 excedeu 18°D, tendo sido considerado levemente ácido.

Com relação à estabilidade ao álcool, segundo a mesma resolução, o leite deve ser estável ao etanol 68% (v/v), requisito atendido, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 31.

Os valores de pH medidos também foram considerados normais para o leite. De acordo com Forsythe (2002), o pH do leite varia de 6,3 a 6,5. Entretanto, Silva (2000), cita que a faixa do pH do leite deve se localizar entre 6,8 e 7,0.

O teor de gordura atendeu ao limite mínimo estabelecido pela resolução citada que é de 3%.

**Tabela 31** - Análise físico-química da matéria-prima.

TESTE		LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4
Acidez titulável (°D) <sup>1</sup>		19,5	18,2	16,5	17,0
pH		6,75	6,67	6,71	6,69
	68% (v/v)	estável	estável	estável	estável
Estabilidade ao etanol	72% (v/v)	instável	estável	estável	estável
	74% (v/v)	instável	estável	estável	estável
	76% (v/v)	instável	estável	estável	estável
Temperatura na recepção (°C)		9,2	12,7	8,8	11,9
Gordura (%)		3,6	3,6	3,6	3,6
Densidade (kg/L)		1,0295	1,0299	1,0295	1,0300
Sólidos totais (%)		12,19	12,05	11,84	12,07

<sup>1</sup> - graus Dornic.

### 5.3 Cálculo do efeito de esterilização do tratamento térmico do leite

A temperatura empregada no tratamento térmico dos 4 lotes de leite variou de 135 a 144°C, com um tempo de retenção de 10s. Apesar dessa variação, a temperatura mínima de 135°C/10s foi atingida, garantindo a segurança do produto, conforme Komorowski e Early (1992). Ao atingir temperaturas inferiores a 135°C a válvula pneumática era automaticamente acionada, retornando o leite ao tanque de equilíbrio, reiniciando o processo UHT.

A definição de processamento UHT do leite, preconizada pela *International Dairy Federation* (IDF), envolve a aplicação de uma temperatura não inferior a 125°C, por não menos que 1s. Na prática, a faixa de temperatura utilizada varia de 135 a 150°C, sendo o tempo de retenção de vários segundos (Banks e Dalglish, 1990).

De acordo com Muir (1990), a designação UHT é atribuída a tratamentos a temperaturas não inferiores a 135°C por pelo menos 1s. Uma definição mais prática considera o UHT como um tratamento no qual o produto é aquecido a 135-150°C em fluxo contínuo em um trocador de calor por um tempo suficiente para produzir um nível satisfatório de esterilidade comercial com uma alteração aceitável no produto. Normalmente isso é atingido por um aquecimento a temperaturas entre 138 e 142°C entre 2 e 5s.

Segundo Grandison (1988), no processamento UHT, o leite é aquecido a 140°C durante 3s e resfriado, finalmente, a 12°C.

Conforme publicado por Aggarwal (1974), o leite é esterilizado a temperaturas entre 135 e 149°C por 2 a 8s.

Jensen (1996) cita que, inicialmente, o tratamento UHT era realizado com injeção direta de vapor a 145°C/3-6s. Com o surgimento do sistema indireto utilizando-se trocadores a placas o produto passou a ser processado a 137-140°C/3-4s.

De acordo com Cordier (1990), o tratamento UHT expõe o produto a temperaturas entre 130 e 150°C por poucos segundos, suficiente para destruir microrganismos patogênicos e deterioradores, particularmente esporos, sem alterar as características físico-químicas de forma a tornar o produto inaceitável pelo consumidor.



Conforme Mehta (1980) e Ahvenainen (1988), o processamento UHT do leite envolve temperaturas de 130 a 150°C e tempos de retenção iguais ou superiores a 1s, normalmente entre 2 a 8s.

Nicolas (1995) reportou que no processo UHT o leite é tratado a 142°C durante 3 a 4s e resfriado a 20°C.

Na legislação brasileira, o leite UHT é definido como o leite submetido a uma temperatura entre 130 e 150°C, durante 2 a 4 segundos e imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C (Brasil, 1997).

Observa-se, portanto, que a literatura consultada apresenta uma faixa ampla para tratamento UHT de leite, variando de 125 a 150°C durante 1 a 10 s.

A Tabela 32 apresenta os valores  $F_0$  para os tratamentos térmicos aos quais foram submetidos os 4 lotes de leite, com a respectiva redução teórica no número de microrganismos que cada processo atingiu, em função da contagem inicial de esporos de mesófilos aeróbios. Os valores  $F_0$  e  $N$  foram calculados através das Equações 1 e 2, respectivamente, apresentadas na *Revisão Bibliográfica*. No cálculo de  $N$  considerou-se  $D_{121,1}=1,0\text{min}$  (para esporos mesofílicos), baseado em Massagué (1998). Os valores  $F_0$  foram calculados considerando-se apenas a seção de retenção do trocador de calor a placas, assumindo-se as temperaturas mínima, média e máxima atingidas ao longo do tubo de retenção. As temperaturas foram medidas através de um termopar instalado no final do tubo de retenção.

**Tabela 32** - Efeito de esterilização do tratamento térmico ( $F_0$ ) do leite na seção de retenção durante 10s.

LOTE	TEMPERATURA MEDIDA NA RETENÇÃO DURANTE O PROCESSAMENTO DO LEITE (°C)		F <sub>0</sub> (min)	N <sub>0</sub> (esporos/ mL de leite)	N (esporos/ mL de leite)	RD log (N <sub>0</sub> /N)
1	T <sub>mínima</sub>	135,0	4,1	10	7,9.10 <sup>-4</sup>	4,1
	T <sub>média</sub>	136,5	5,8	10	1,6.10 <sup>-5</sup>	5,8
	T <sub>máxima</sub>	138,0	8,2	10	6,3.10 <sup>-8</sup>	8,2
2	T <sub>constante</sub>	141,0	16,3	46	2,3.10 <sup>-15</sup>	16,3
3	T <sub>mínima</sub>	142,0	20,5	21	6,6.10 <sup>-20</sup>	20,5
	T <sub>média</sub>	143,0	25,8	21	3,3.10 <sup>-25</sup>	25,8
	T <sub>máxima</sub>	144,0	32,5	21	6,6.10 <sup>-32</sup>	32,5
4	T <sub>mínima</sub>	135,0	4,1	40	3,2.10 <sup>-3</sup>	4,1
	T <sub>média</sub>	138,0	8,2	40	2,5.10 <sup>-7</sup>	8,2
	T <sub>máxima</sub>	141,0	16,3	40	2,0.10 <sup>-15</sup>	16,3

$N_0$  - população inicial de esporos de mesófilos aeróbios quantificada.

N - população final estimada (calculada).

RD - reduções decimais na população de esporos.

A Tabela 32 mostra que o aumento na temperatura de processamento resulta em um aumento no valor  $F_0$  calculado, com conseqüente redução no número de sobreviventes de esporos no leite.

Durante o processamento do lote 1, a temperatura do leite na seção de retenção variou de 135 a 138°C. Durante o processamento 2 a temperatura manteve-se constante. No processamento 3, registrou-se uma variação de 2°C. A maior oscilação na temperatura foi registrada no processamento 4, variando de 135 a 141°C. Essas variações refletiram no cálculo de  $F_0$ , cujos valores mínimo e máximo foram 4,1 e 32,5 minutos.

Geralmente, o valor  $F_0$  experimental de 3 minutos é considerado adequado em relação ao *Clostridium botulinum*, uma vez que corresponde à redução de mais de 12 ciclos logarítmicos em sua população (Quast, 1976).

## 5.4 Avaliação DO PRODUTO FINAL

### 5.4.1 Determinação do pH

Imediatamente após o processamento, 3 amostras foram tomadas para determinação do pH, conforme apresentado na Tabela 33.

**Tabela 33** - Leitura de pH a 25°C em amostras de leite ao final do processo.

LOTE	pH <sup>1</sup>					
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	média	dp	Média	dp	média	dp
1	6,74	0,01	6,74	0,01	6,73	0,01
2	6,74	0,01	6,73	0	6,73	0
3	6,75	0	6,75	0	6,74	0,01
4	6,75	0	6,75	0	6,75	0

<sup>1</sup> - média de 3 leituras

dp - desvio padrão

### 5.4.2 Teste de esterilidade comercial

Conforme Mehta (1980), a técnica de pré-incubação foi desenvolvida para aumentar o número de bactérias viáveis ou esporos, caso estejam presentes. As condições normalmente recomendadas são 32, 37 ou 55°C por 5, 7 ou 10 dias. Sob essas condições, se produto acidificar ou coagular, a presença de microrganismos viáveis é estabelecida.

Segundo Ahvenainen (1988), após o processamento e acondicionamento asséptico o produto não está pronto para venda. Sua esterilidade é assegurada após o período de pré-incubação das amostras, cujo objetivo é promover o desenvolvimento de possíveis microrganismos no produto em nível onde possam ser detectados através de métodos microbiológicos. O período de pré-incubação do leite pode variar de 2 a 18 dias, em diferentes países. Entretanto, de acordo com a maioria dos trabalhos pesquisados, o tempo mínimo para pré-incubação é de 5 dias. A IDF recomenda a incubação do leite a 30°C durante 14 dias antes do início dos testes microbiológicos.

#### 5.4.2.1 Inspeção visual dos lotes após incubação a 35°C/10dias

A inspeção visual de cada lote foi feita nas 60 unidades cujo pH foi determinado, tendo sido feitas as seguintes observações:

*Lote 1* – A única alteração aparente notada nas amostras foi a separação de gordura, supostamente devido a uma homogeneização insuficiente do leite, realizada antes do tratamento UHT. Modificações na cor, odor e estufamento não foram observadas.

*Lote 2* – Pequena separação de gordura. Modificações na cor, odor e estufamento não foram observadas.

*Lote 3* – As 2 unidades com variação de pH > 0,2 apresentaram odor ácido ou fermentado, com alterações nítidas na viscosidade e textura do produto. Nas demais amostras inspecionadas observou-se apenas uma pequena separação de gordura.

*Lote 4* – A única unidade com variação de pH > 0,2 apresentou odor ácido ou fermentado, com alterações nítidas na viscosidade e textura do produto. Nas demais amostras inspecionadas observou-se uma pequena separação de gordura.

Conforme Cerf (1988), raramente o tamanho da amostra é superior a 1% do volume total produzido, podendo ser ainda reduzido com o aumento da sensibilidade dos métodos de detecção.

#### 5.4.2.2 Determinação de pH

Após incubação a 35°C/10 dias, foram feitas as determinações de pH em todas as 60 embalagens incubadas de cada lote, cujos resultados estão apresentados na Tabela 34. Os valores em destaque indicam alterações significativas ( $\Delta\text{pH} > 0,2$ ) em relação aos valores medidos imediatamente após o processo.

**Tabela 34** - Leitura de pH a 25°C em amostras de leite processado após incubação a 35°C/10 dias.

AMOSTRA	LOTE							
	pHL <sub>1</sub>		pHL <sub>2</sub>		pHL <sub>3</sub>		pHL <sub>4</sub>	
	média <sup>1</sup>	dp	média <sup>1</sup>	dp	média <sup>1</sup>	dp	média <sup>1</sup>	dp
1	6,66	0,01	6,67	0,01	6,70	0,01	6,65	0,01
2	6,64	0,04	6,66	0,01	6,66	0,01	6,65	0,01
3	6,70	0	6,66	0,01	6,69	0,01	6,63	0,01
4	6,66	0,01	6,68	0,01	6,68	0,01	6,64	0
5	6,76	0	6,67	0	6,68	0	6,64	0,01
6	6,66	0	6,66	0,01	6,69	0,01	6,65	0,01
7	6,66	0,01	6,67	0,01	6,69	0,01	6,64	0,01
8	6,66	0,01	6,66	0,01	6,69	0,01	6,65	0,01
9	6,66	0,01	6,66	0,01	6,72	0,01	6,64	0,01
10	6,66	0,01	6,66	0,01	6,70	0	6,64	0

11	6,66	0,01	6,66	0,01	6,74	0,01	6,65	0,01
12	6,68	0	6,67	0	6,72	0,01	6,64	0,01
13	6,67	0	6,67	0,01	6,70	0	6,64	0,01
14	6,67	0,01	6,68	0	6,70	0	6,64	0,01
15	6,67	0	6,67	0	6,71	0	6,64	0
16	6,68	0,01	6,66	0	6,70	0	6,64	0,01
17	6,67	0	6,67	0,01	6,71	0,01	<b>6,30</b>	0,01
18	6,68	0	6,67	0,01	6,71	0	6,63	0
19	6,71	0	6,66	0,01	6,71	0	6,64	0
20	6,69	0	6,67	0	6,72	0,01	6,64	0,01
21	6,72	0,01	6,67	0	6,70	0,01	6,64	0,01
22	6,68	0	6,68	0	6,69	0	6,65	0,01
23	6,69	0	6,68	0	6,69	0,01	6,64	0,01
24	6,68	0	6,69	0,01	6,70	0,01	6,65	0,01
25	6,69	0,01	6,69	0,01	6,70	0,01	6,64	0,02
26	6,70	0,01	6,69	0	6,72	0,01	6,64	0,01
27	6,69	0	6,69	0	6,71	0,01	6,65	0,01
28	6,70	0,01	6,69	0	6,71	0	6,65	0,01
29	6,69	0,01	6,66	0,01	6,71	0,01	6,64	0,01
30	6,70	0	6,69	0	<b>5,87</b>	0,01	6,64	0
31	6,69	0,01	6,69	0,01	6,73	0	6,65	0,01
32	6,75	0	6,70	0	6,72	0,01	6,62	0,02
33	6,69	0,01	6,69	0	6,72	0,01	6,64	0,01
34	6,70	0,01	6,67	0,01	6,72	0	6,65	0,01
35	6,70	0	6,69	0	6,71	0	6,66	0,01
36	6,70	0,01	6,69	0	6,70	0,01	6,65	0,01
37	6,69	0	6,69	0,01	6,69	0,01	6,66	0,01
38	6,70	0	6,70	0,01	6,70	0,01	6,66	0,01
39	6,71	0	6,70	0,01	<b>5,90</b>	0,01	6,66	0,01
40	6,70	0,01	6,69	0,01	6,71	0	6,66	0,01
41	6,73	0	6,70	0,01	6,71	0,01	6,65	0,01
42	6,67	0	6,70	0	6,70	0,01	6,65	0,01
43	6,75	0,01	6,70	0	6,70	0,01	6,65	0,01
44	6,67	0,01	6,71	0,01	6,70	0,01	6,65	0,01
45	6,68	0	6,70	0,01	6,71	0	6,64	0,01
46	6,68	0,01	6,71	0,01	6,71	0,01	6,66	0,01
47	6,68	0,01	6,71	0,01	6,70	0	6,64	0,01
48	6,68	0	6,71	0	6,71	0,01	6,65	0
49	6,69	0,01	6,71	0,01	6,70	0	6,65	0,01
50	6,70	0,01	6,71	0,01	6,71	0,01	6,65	0,01
51	6,69	0,01	6,71	0,01	6,70	0,01	6,65	0,01
52	6,70	0,01	6,71	0,01	6,71	0,01	6,65	0,01
53	6,69	0,01	6,72	0,01	6,70	0,01	6,65	0,01
54	6,69	0	6,71	0	6,70	0	6,65	0,01
55	6,72	0,01	6,71	0,01	6,71	0,01	6,65	0,01
56	6,69	0	6,67	0,01	6,71	0,01	6,66	0,01
57	6,69	0,01	6,71	0	6,71	0	6,65	0,01
58	6,70	0,01	6,72	0	6,71	0,01	6,65	0,01
59	6,69	0	6,72	0,01	6,71	0	6,65	0,01
60	6,70	0,01	6,72	0,01	6,71	0	6,65	0,01

<sup>1</sup> - média de 3 leituras    dp - desvio padrão

De acordo Cerf (1988), o conceito de estabilidade para leite UHT pressupõe flutuações no pH do produto inferiores a 0,2.

Observando os valores de pH da Tabela 34, pôde-se fazer as seguintes considerações:

Taxa de não esterilidade

*Lote 1* – nenhuma unidade com alteração significativa de pH ( $\Delta > 0,2$ ), em relação às leituras feitas imediatamente ao final do processo, entre as 60 embalagens avaliadas.

*Lote 2* – nenhuma unidade com alteração significativa de pH.

*Lote 3* – 2 unidades com alteração significativa de pH.

*Lote 4* – 1 unidade com alteração significativa de pH.

De acordo com a Tabela 34, os percentuais de garrafas não estéreis, em relação às 60 unidades incubadas, foram 0; 0; 3,33 e 1,67% para os lotes 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Conforme Aggarwal (1974), não é incomum encontrar embalagens de um mesmo lote de produto esterilizado que se deteriora prematuramente, ao passo que outras permanecem inalteradas bem além de sua data de validade.

A fração máxima de amostras contaminadas pretendida é de 1 a 5 por 10.000 unidades, ao passo que frações defeituosas superiores não são aceitáveis e frações inferiores são dificilmente atingidas sob condições normais (Cordier, 1990).

De acordo com Von Bockelmann (1988), as seguintes considerações relacionadas ao nível de não esterilidade de um lote podem ser feitas:

1:100	geralmente elevada
1:1.000	realista em algumas situações
1:10.000	ambicioso
1:100.000	difícil de atingir
1:1.000.000	virtualmente impossível

Geralmente, as taxas máximas de unidades defeituosas aceitáveis variam entre 1:1.000 e 1:10.000 (Von Bockelmann, 1988).

Conforme Cerf (1988), inicialmente foram feitas tentativas para produção de leite UHT com uma taxa de não-esterilidade variando de 1 a 5 unidades por 1.000. Posteriormente, esse valor foi reduzido para 5 unidades não estéreis em 10.000 unidades produzidas, sendo que o objetivo tem sido atingir uma taxa de não esterilidade de 1 em 10.000.

Segundo Ahvenainen (1988), a correlação entre a contagem total em placa e a deterioração do leite processado assepticamente não é sempre adequada devido a deteriorações causadas por enzimas termoestáveis, cuja presença leva freqüentemente à deterioração do produto durante a pré-incubação, e embora o produto esteja estéril, sua composição foi inteiramente alterada. As enzimas termoestáveis provocam alteração na textura do produto, que pode ser detectada como uma mudança na viscosidade. Além disso, muitos microrganismos também alteram a textura do produto.

### 5.4.3 Procedimento microbiológico para detecção de contaminantes

Após a incubação das amostras a 35°C/10 dias, 3 unidades de cada lote produzido foram destinadas à um procedimento microbiológico para detecção de contaminantes. As Tabelas 35 e 36 apresentam os resultados obtidos na análise microbiológica dos lotes de leite processados e acondicionados assepticamente em garrafas de PEAD de 500mL, indicando a presença ou ausência de microrganismos em condições específicas de incubação.

**Tabela 35** - Resultados da fase 1<sup>1</sup> da análise microbiológica de leite processado e acondicionado assepticamente.

LOTE	AMOSTRA	MEIO E CONDIÇÃO DE CULTIVO EM TUBOS			
		CALDO DEXTROSE PÚRPURA DE BROMOCRESOL		MEIO DE CARNE COZIDA	
		AEROBIOSE		ANAEROBIOSE	
		35°C/5dias	55°C/3dias	35°C/5dias	55°C/3dias
L <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	-	-	-
L <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	+	-	-

L <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	+	-	-
L <sub>4</sub>	A <sub>1</sub>	+	-	-	-
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	-	-	-

+ presença de microrganismo.

- ausência de microrganismo.

A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>/A<sub>3</sub> - amostras retiradas no início, meio e fim do processo, respectivamente.

<sup>1</sup> inoculação em caldo.

**Tabela 36** - Resultados da fase 2<sup>1</sup> da análise microbiológica de leite processado e acondicionado assepticamente.

LOTE	AMOSTRA	MEIO E CONDIÇÃO DE CULTIVO EM PLACAS					
		ÁGAR NUTRIENTE MANGANÊS		ÁGAR FÍGADO DE VITELA			
		AEROBIOSE		AEROBIOSE		ANAEROBIOSE	
		35°C/10dias	55°C/10dias	35°C/4dias	55°C/2dias	35°C/4dias	55°C/2dias
L <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	-	-	+	-	-
L <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-
L <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	-



L <sub>4</sub>	A <sub>1</sub>	+	-	+	+	+	+
	A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
	A <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-

+ presença de microrganismo.

- ausência de microrganismo.

A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>/A<sub>3</sub> - amostras retiradas no início, meio e fim do processo, respectivamente.

<sup>1</sup> confirmação (presença/ausência) de microrganismo em meio sólido.

A Tabela 37 apresenta o diagnóstico final das amostras de leite, realizado a partir dos resultados das Tabelas 35 e 36.

**Tabela 37** - Diagnóstico final do teste de esterilidade comercial de leite processado e acondicionado assepticamente em garrafa de PEAD.

LOTE	AMOSTRA DE LEITE	CLASSIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO ENCONTRADO	DIAGNÓSTICO FINAL DA AMOSTRA
L <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	-	comercialmente estéril
	A <sub>2</sub>	-	comercialmente estéril
	A <sub>3</sub>	termófilo aeróbio	comercialmente estéril
L <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	-	comercialmente estéril
	A <sub>2</sub>	-	comercialmente estéril
	A <sub>3</sub>	termófilo aeróbio	comercialmente estéril
L <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	-	comercialmente estéril
	A <sub>2</sub>	mesófilo aeróbio	não comercialmente estéril
	A <sub>3</sub>	termófilo aeróbio	comercialmente estéril

L <sub>4</sub>	A <sub>1</sub>	mesófilo/termófilo anaeróbio facultativo	não comercialmente estéril
	A <sub>2</sub>	-	comercialmente estéril
	A <sub>3</sub>	-	comercialmente estéril

A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>/A<sub>3</sub> - amostras retiradas no início, meio e fim do processo, respectivamente.  
- não houve desenvolvimento microbiano.

Os resultados apresentados confirmaram a presença de microrganismos deterioradores no leite, indicados anteriormente na determinação do pH, devido à ocorrência de variação superior a 0,2. Ou seja, os lotes 3 e 4, que apresentaram amostras com redução de pH, foram reprovados nos testes microbiológicos devido à detecção de microrganismos mesófilos.

De acordo com Cerny (1993), a contaminação em um sistema asséptico pode ocorrer durante a esterilização do produto, após a esterilização, durante o enchimento e após a embalagem. Deve-se considerar, também, uma eventual presença de microrganismos esporulados resistentes ao tratamento UHT.

#### 5.4.4 Caracterização físico-química do leite processado

Três embalagens de cada lote processado foram tomadas para caracterização físico-química do produto final, sendo os resultados apresentados na Tabela 38.

Baseado na resolução ANVISA (1994), que define o regulamento técnico de identidade do leite UHT, foram feitas as seguintes considerações:

A acidez titulável das amostras estava dentro faixa de 14 a 18°D, conforme recomendado.

O teor de gordura atendeu ao limite mínimo estabelecido pela resolução citada que é de 3%.

Avaliando os resultados obtidos, em relação ao extrato seco desengordurado, as amostras dos lotes 1 e 2 estavam um pouco abaixo do parâmetro mínimo estabelecido de 8,2%.

De acordo com especificações do Ministério da Agricultura, citado por Guimarães (2002), a crioscopia deve variar entre -0,53 a -0,56°H.

**Tabela 38** - Caracterização físico-química do leite processado.

TESTE	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3		LOTE 4	
	m	dp	m	dp	m	dp	m	dp
pH	6,81	0,01	6,77	0,01	6,80	0	6,78	0,01
Acidez titulável (°D)	17,81	0,30	17,05	0,06	17,05	0,03	17,05	0,03
Proteína total	3,46	0,03	3,31	0	3,32	0,07	3,29	0,02
Gordura (%)	5,5	0	3,50	0	3,55	0,05	3,50	0
Lactose (%)	3,62	0,26	4,02	0,09	4,87	0,04	4,31	0,18
Crioscopia (°H)	-0,55	0	-0,55	0	-0,55	0	-0,55	0
Sólidos totais (%)	11,61	0,62	11,54	0,09	12,41	0,04	11,82	0,19
Densidade (kg/L)	1,0307	0,0001	1,0305	0,0001	1,0305	0	1,0322	0,0025
(ESD) Extrato seco desengordurado	7,68	0,25	8,04	0,09	8,86	0,09	8,32	0,19
Cinzas (%)	0,7617	0,0118	0,7131	0,0066	0,7144	0,0021	0,7154	0,0007

m - média de 3 leituras  
dp - desvio padrão

Guimarães (2002) cita alguns requisitos físico-químicos para leite fluido integral, a saber:

- Gordura:  $\geq 3\%$
- Densidade: 1,028 a 1,034%
- Acidez: 0,14 a 0,18g de ácido láctico/100mL
- Extrato seco desengordurado:  $\geq 8,4\%$
- Índice crioscópico:  $\leq -0,530^{\circ}\text{H}$
- Proteína:  $\geq 2,9\%$

#### 5.4.5 Avaliação sensorial para estimativa da estabilidade do leite

Conforme Shew (1981), a vida útil do leite UHT depende de sua avaliação sensorial, sendo subjetiva e variando de consumidor para consumidor.

Após o teste de esterilidade comercial, amostras dos 4 lotes de leite produzidos foram submetidas à avaliação sensorial com o objetivo de estimar o tempo de vida útil do produto.

Os resultados das médias das notas dos testes de aceitação realizados com as amostras de leite são apresentados nas tabelas seguintes. As temperaturas médias empregadas nos tratamentos térmicos dos lotes 1, 2, 3 e 4 foram 136, 141, 143 e 138°C, respectivamente, durante 10s.

A Tabela 39 apresenta as médias das notas atribuídas pelos provadores no teste de aceitação para amostras dos 4 lotes produzidos e 4 marcas comerciais de leite longa vida adquiridas no mercado local, com 2 semanas de estocagem à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que as notas atribuídas ao aroma, sabor e impressão global para a amostra comercial 8 foram superiores às atribuídas às amostras comerciais 1, 2 e 4. Por isso, a amostra 8 foi eleita como amostra controle, utilizada nas sessões de análise sensorial subsequentes. Os resultados indicaram ainda que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras avaliadas para aroma, sabor e impressão global, com relação à sua aceitação.

**Tabela 39** - Médias das notas dos testes de aceitação do leite produzido e marcas comerciais estocados durante 2 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	7,7 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>
2	7,6 <sup>a,b</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>
3	7,3 <sup>a,b</sup>	6,0 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>
4	8,0 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>
5	7,3 <sup>a,b</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>
6	6,7 <sup>b</sup>	6,2 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>
7	7,1 <sup>a,b</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>
8	7,3 <sup>a,b</sup>	6,8 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>

Médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Amostras 1, 2, 4, 8 - marcas comerciais de leite longa vida adquiridas no mercado local.

Amostra 3 - lote 1

Amostra 5 - lote 2

Amostra 6 - lote 3

Amostra 7 - lote 4

A Tabela 39 mostra que praticamente não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na aceitação sensorial entre os lotes produzidos através do sistema asséptico piloto e amostras comerciais de leite longa vida, durante as primeiras semanas de estocagem.

A Tabela 40 apresenta os resultados obtidos no teste de aceitação para amostras dos 4 lotes produzidos e uma marca comercial, utilizada como controle. Para os atributos aroma, sabor e impressão global não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras, após 3 semanas de estocagem.

**Tabela 40** - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 3 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	6,7 <sup>b</sup>	6,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>
2	7,5 <sup>a,b</sup>	6,9 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	7,0 <sup>a</sup>
3	7,9 <sup>a</sup>	7,0 <sup>a</sup>	7,4 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>
4	7,5 <sup>a,b</sup>	7,1 <sup>a</sup>	7,4 <sup>a</sup>	7,4 <sup>a</sup>
5	8,0 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>

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

Amostra 1 - lote 1

Amostra 2 - lote 2

Amostra 3 - lote 3

Amostra 4 - lote 4

Amostra 5 - marca comercial de leite longa vida adquirida no mercado local, utilizada como controle.

A Tabela 41 apresenta os resultados obtidos no teste de aceitação para os 4 lotes produzidos, após 4 semanas de estocagem à temperatura ambiente, e a amostra controle. Para os atributos aparência e aroma não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras.

**Tabela 41** - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 4 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	8,0 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a,b</sup>	7,1 <sup>a</sup>
2	7,3 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>
3	7,6 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a,b</sup>	6,7 <sup>a,b</sup>
4	7,6 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>
5	7,7 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a,b</sup>	7,3 <sup>a</sup>

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

Amostra 1 - lote 1

Amostra 2 - lote 2

Amostra 3 - lote 3

Amostra 4 - lote 4

Amostra 5 - controle

Os resultados obtidos na avaliação dos 4 lotes, após 7 semanas de estocagem, e a amostra controle são apresentados na Tabela 42; tendo sido observado diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) para todos os atributos avaliados. Como as amostras 1 e 2, referentes aos lotes 1 e 2, receberam notas cuja média foi inferior a 6, elas foram eliminadas nas análises posteriores, tendo sido considerado o fim de sua vida útil.

**Tabela 42** - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 7 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	5,0 <sup>b</sup>	6,4 <sup>a,b</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>
2	4,2 <sup>b</sup>	5,7 <sup>b</sup>	4,6 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>
3	6,7 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>
4	6,7 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>
5	8,0 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>

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

Amostra 1 - lote 1

Amostra 2 - lote 2

Amostra 3 - lote 3

Amostra 4 - lote 4

Amostra 5 - controle

A Tabela 43 apresenta as médias das notas atribuídas às amostras dos lotes 3 e 4, após 8 semanas de estocagem, e amostra controle, não tendo sido observado diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ), para os atributos aparência, aroma e sabor.



**Tabela 43** - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes de leite produzidos e estocados durante 8 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	7,3 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>
2	7,5 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	7,1 <sup>a,b</sup>
3	8,1 <sup>a</sup>	7,0 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	7,6 <sup>b</sup>

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

Amostra 1 - lote 3

Amostra 2 - lote 4

Amostra 3 - controle

A Tabela 44 mostra as médias das notas atribuídas às amostras dos lotes 3 e 4, após 9 semanas de estocagem, e a amostra controle, não tendo sido observado diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) apenas para o aroma. Como a amostra 1, referente ao lote 3, recebeu notas inferiores a 6, para sabor e impressão global, esta foi eliminada, tendo sido considerado o fim de sua vida útil.

**Tabela 44** - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes produzidos e estocados durante 9 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	6,5 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>	5,8 <sup>a</sup>
2	6,6 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a,b</sup>	6,4 <sup>a,b</sup>
3	7,9 <sup>b</sup>	6,6 <sup>a</sup>	7,1 <sup>b</sup>	7,2 <sup>b</sup>

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

Amostra 1 - lote 3

Amostra 2 - lote 4

Amostra 3 - controle

Após 11 semanas de estocagem do lote 4, não foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo e a amostra controle para todos os atributos avaliados, como mostra a Tabela 45.

**Tabela 45** - Médias das notas dos testes de aceitação com o lote de leite produzido e estocado durante 11 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	7,3 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	6,9 <sup>a</sup>
2	7,7 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>

Médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )  
 Amostra 1 - lote 4  
 Amostra 2 - controle

Após 13 semanas de estocagem, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o lote 4 e a amostra controle para todos os atributos considerados. Notou-se uma redução acentuada nas notas atribuídas ao aroma, sabor e impressão global do lote 4, indicando o fim de sua vida útil, como mostra a Tabela 46.

**Tabela 46** - Médias das notas dos testes de aceitação com os lotes produzidos e estocados durante 13 semanas à temperatura ambiente.

AMOSTRA	ATRIBUTO AVALIADO			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	6,7 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>	4,1 <sup>a</sup>
2	7,9 <sup>b</sup>	6,7 <sup>b</sup>	7,3 <sup>b</sup>	7,4 <sup>b</sup>

Médias com o mesmo expoente, na mesma coluna, não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )  
 Amostra 1 - lote 4  
 Amostra 2 - controle

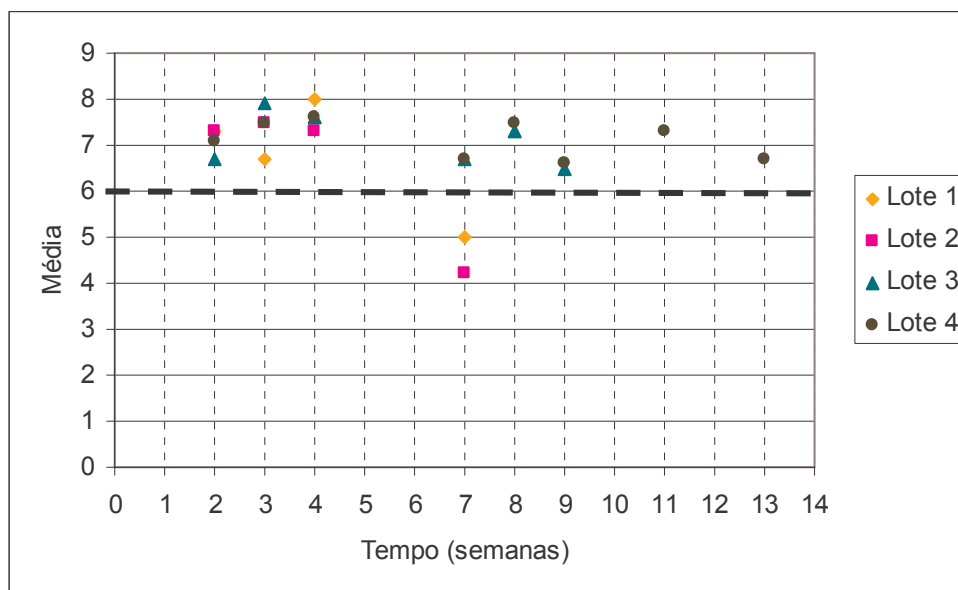
As Figuras 12, 13, 14 e 15 ilustram os gráficos das médias das notas atribuídas à aparência, aroma, sabor e impressão global para os 4 lotes

produzidos e a amostra comercial (controle) ao longo do tempo de estocagem. A linha tracejada no gráfico representa a nota de corte, ou o fim da vida útil do leite. Considerando médias inferiores a 6 como nota de corte para qualquer dos atributos avaliados, podemos observar que o tempo de vida útil estimado para os lotes 1, 2, 3 e 4 foram 4, 4, 8 e 11 semanas, respectivamente. A vida útil de marcas comerciais de leite longa vida, conforme declarado na embalagem, varia de 3 a 5 meses, sendo superior àquelas estimadas para os 4 lotes produzidos através do sistema asséptico piloto.

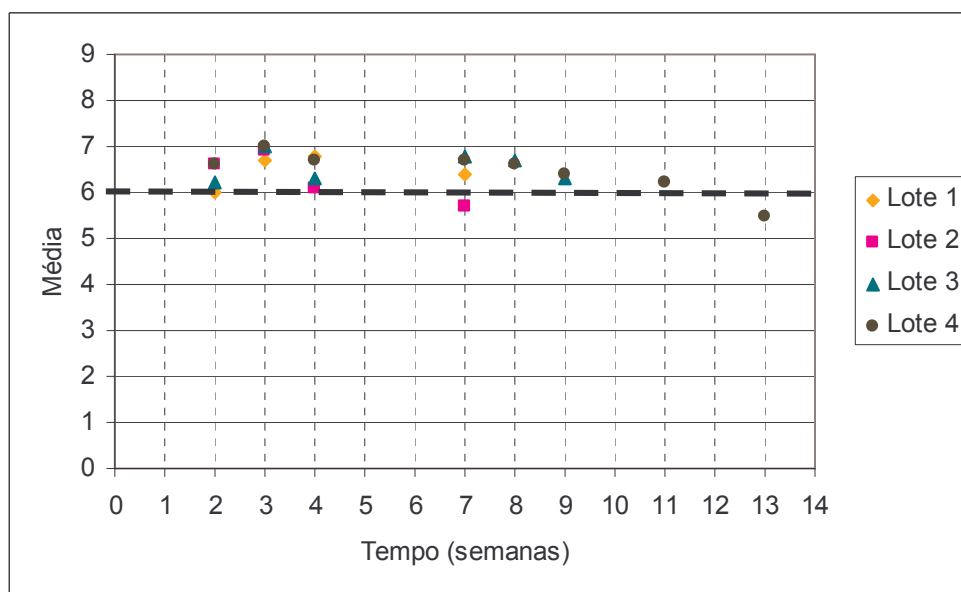
As diferenças observadas entre a vida útil dos 4 lotes poderiam ser atribuídas à variação na qualidade da matéria-prima utilizada, que foi diferente para os 4 processos, apesar de adquirida na mesma origem.

As propriedades de barreira do material de embalagem, especialmente à luz e oxigênio, são determinantes fundamentais para o tempo de vida útil do leite UHT. A indisponibilidade de garrafas plásticas de alta barreira à luz para acondicionamento de leite longa vida no mercado nacional impôs uma relativa restrição ao sistema asséptico avaliado nesta pesquisa, restando como alternativa a utilização de garrafas de PEAD pigmentadas, com barreira intermediária. A redução da vida útil dos lotes produzidos em relação às marcas comerciais poderia ser justificada por este motivo; todavia, podendo ser contornado em pesquisas futuras com a utilização de garrafas plásticas de alta barreira projetadas para leite UHT.

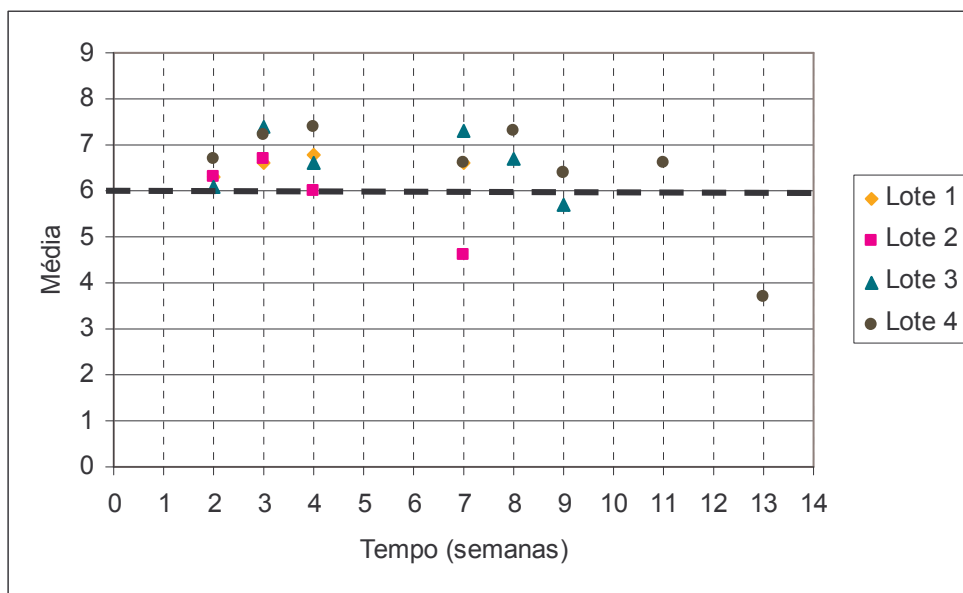
De acordo com Bischoff (1988), um pré-requisito para uma vida útil prolongada é a utilização de polímeros com propriedades de barreira melhoradas. Devido à sensibilidade do produto à oxidação é essencial a utilização de materiais com boa barreira ao oxigênio e à luz.



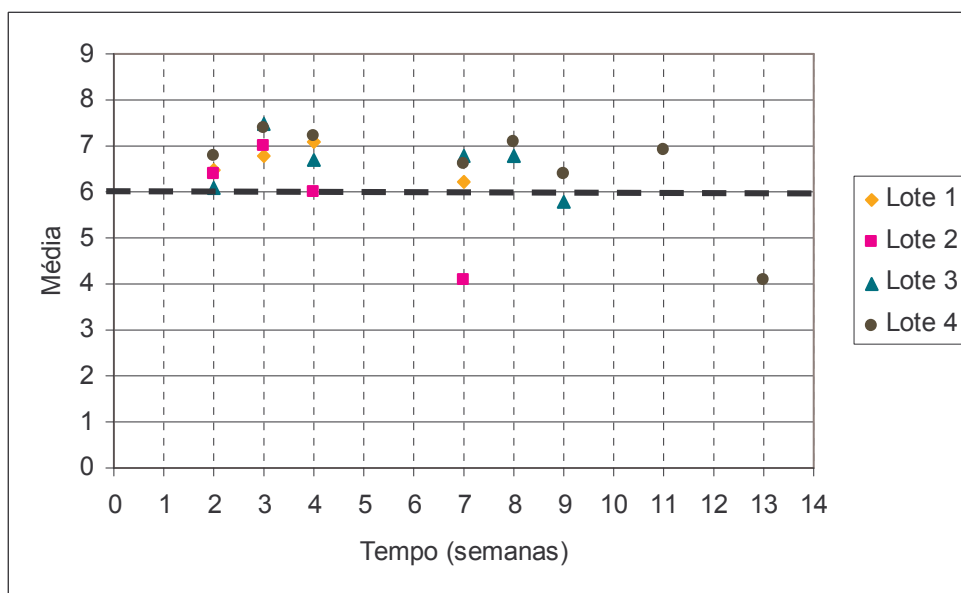
**Figura 12** - Gráfico de médias de notas para aparência dos lotes de leite produzidos.



**Figura 13** - Gráfico de médias de notas para aroma dos lotes de leite produzidos.



**Figura 14** - Gráfico de médias de notas para sabor dos lotes de leite produzidos.



**Figura 15** - Gráfico de médias de notas para impressão global dos lotes de leite produzidos.

Os histogramas apresentados no Anexo 6, mostram a freqüência de notas atribuídas à aparência, aroma, sabor e impressão global dos lotes produzidos, das

amostras comerciais e controle, ao longo do tempo de estocagem à temperatura ambiente. Ao atingir a nota de corte adotada (6), as amostras foram eliminadas dos testes sensoriais subseqüentes.

Complementando os resultados dos testes de aceitação, os histogramas apresentados no Anexo 7 indicam a intenção de compra (em %) dos 30 provadores para os lotes de leite avaliados, ao longo do tempo de estocagem à temperatura ambiente. Como já mencionado, ao atingir a nota de corte, os lotes foram eliminados dos testes de intenção de compra subseqüentes.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM

Os resultados relacionados à caracterização e análise da embalagem utilizada na pesquisa são apresentados e discutidos a seguir.

### 5.5.1 Avaliação dimensional

A Tabela 47 apresenta os resultados da avaliação dimensional da embalagem.

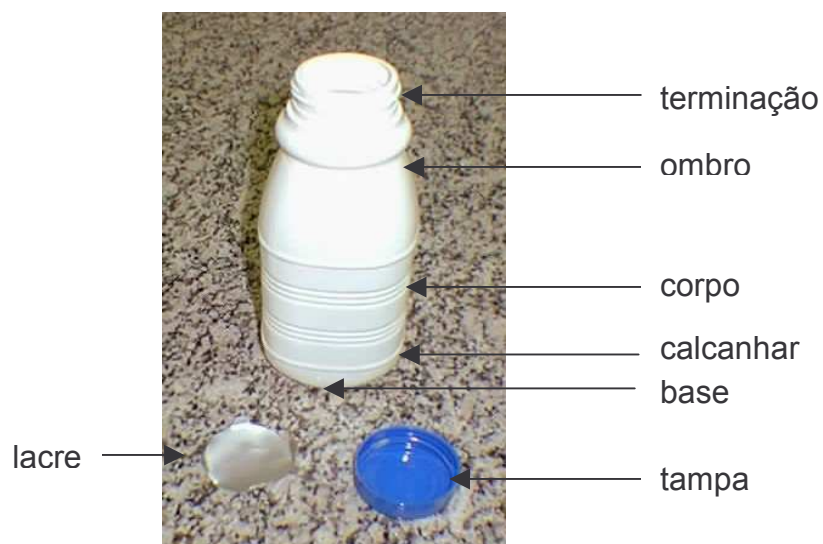
**Tabela 47** - Avaliação dimensional da garrafa.

AMOSTRA	ALTURA (mm)	DIÂMETRO EXTERNO DO CORPO (mm)	DIÂMETRO EXTERNO DA TERMINAÇÃO (mm)
A1	176	66,0	37,4
A2	176	65,7	37,2
A3	175	66,0	37,2
A4	175	65,4	37,5
A5	175	65,3	37,4
A6	175	65,3	37,0
A7	175	63,3	37,7
A8	175	65,4	37,6
A9	175	65,8	37,3
A10	176	65,1	37,2
MÉDIA	<b>175,3</b>	<b>65,3</b>	<b>37,4</b>
DESVIO PADRÃO	<b>0,5</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>

A origem de variações dimensionais em embalagens plásticas rígidas pode estar relacionada às irregularidades durante o processo de transformação ou às deformações provocadas na embalagem após esta etapa (Alves et al, 1998).

### 5.5.2 Distribuição de espessura

A Figura 16 ilustra a embalagem utilizada no envase asséptico de leite, identificando as regiões onde a espessura foi determinada.



**Figura 16** - Embalagem utilizada no experimento.

A Tabela 48 apresenta os resultados da determinação da distribuição de espessura das diferentes regiões da embalagem. A distribuição de espessura na embalagem está diretamente relacionada ao seu desempenho mecânico. Regiões da embalagem com menor espessura podem resultar em uma menor resistência à pressão interna e/ou perda de desempenho quando a mesma for submetida a esforços mecânicos como compressão durante o empilhamento, queda durante o manuseio e impacto na linha de enchimento (Alves et al, 1998). Pontos de baixa espessura afetam também a permeabilidade e, conseqüentemente, a vida útil.

**Tabela 48** - Distribuição de espessura da garrafa.

AMOSTRA	REGIÃO DE DETERMINAÇÃO DA ESPESSURA (mm)			
	OMBRO	CORPO	CALCANHAR	BASE



	m	dp	m	dp	m	dp	m	dp
A1	0,59	0,05	0,50	0,03	0,43	0,02	0,97	0,04
A2	0,62	0,11	0,49	0,08	0,42	0,08	1,07	0,14
A3	0,62	0,05	0,50	0,09	0,45	0,08	1,09	0,13
A4	0,52	0,04	0,49	0,05	0,44	0,03	1,01	0,43
A5	0,52	0,05	0,51	0,04	0,43	0,02	1,02	0,27
A6	0,55	0,05	0,50	0,06	0,43	0,02	1,11	0,34
A7	0,53	0,05	0,51	0,04	0,43	0,04	0,98	0,10
A8	0,58	0,08	0,51	0,06	0,43	0,04	1,10	0,22
A9	0,51	0,07	0,51	0,05	0,43	0,02	1,14	0,25
A10	0,50	0,05	0,50	0,08	0,44	0,07	1,04	0,29

m - média de 4 leituras feitas na respectiva região.

dp - desvio padrão.

A Tabela 49 mostra os resultados das determinações da espessura da tampa e do lacre de vedação.

**Tabela 49** - Espessura da tampa e do lacre laminado de vedação.

AMOSTRA	TAMPA (mm)		LACRE (mm)	
	m	dp	m	dp
A1	0,97	0	0,165	0,002
A2	0,95	0,01	0,182	0,003
A3	0,89	0,01	0,167	0,004
A4	0,96	0,01	0,150	0,045
A5	1,00	0,04	0,111	0,004
A6	0,98	0,01	0,172	0,001
A7	0,98	0,01	0,168	0,004
A8	0,84	0,01	0,167	0
A9	0,84	0,04	0,178	0,001
A10	0,98	0,01	0,179	0,001

m - média de 2 leituras.  
dp - desvio padrão.

### 4.5.3 Determinação do peso

Os resultados da determinação do peso da garrafa, tampa e lacre são apresentados na Tabela 50.

**Tabela 50** - Peso da garrafa plástica.

AMOSTRA	GARRAFA (g)	TAMPA (g)	LACRE DE VEDAÇÃO (g)
---------	-------------	-----------	----------------------

A1	20,19	3,88	0,32
A2	20,55	3,87	0,31
A3	20,60	3,76	0,32
A4	20,55	3,78	0,31
A5	20,18	3,98	0,34
A6	20,19	3,78	0,32
A7	20,57	3,59	0,31
A8	20,62	3,89	0,30
A9	20,19	3,75	0,32
A10	20,56	3,88	0,33
MÉDIA	<b>20,42</b>	<b>3,82</b>	<b>0,32</b>
DESVIO PADRÃO	<b>0,20</b>	<b>0,11</b>	<b>0,01</b>

#### 5.5.4 Capacidade volumétrica

A Tabela 51 indica as leituras dos volumes útil e total da embalagem.

**Tabela 51** - Volume da garrafa plástica.

AMOSTRA	VOLUME ÚTIL (mL)	VOLUME TOTAL (mL)
A1	510	560
A2	515	560
A3	515	560

A4	510	560
A5	510	560
A6	510	560
A7	510	560
A8	500	560
A9	500	560
A10	510	560
MÉDIA	<b>509</b>	<b>560</b>
DESVIO PADRÃO	<b>5</b>	<b>0</b>

O peso e a capacidade volumétrica são medidas rápidas, eficientes e práticas para o controle e avaliação da qualidade de embalagens plásticas rígidas, pois permitem avaliar rapidamente a homogeneidade de um lote. Variações de peso refletem alterações na distribuição de espessura, bem como desajustes no processo de transformação de uma embalagem. Uma massa abaixo da especificação pode ter como consequência espessuras mais finas, resultando em uma menor resistência mecânica e, em alguns casos, em piores características de barreira a gases, vapor de água e vapores orgânicos (Alves et al, 1998).

#### 5.5.5 Torque de fechamento e abertura

O valor médio do torque de fechamento aplicado às embalagens foi de 17,5lb.pol (2,0N.m). O manual de operação da seladora utilizada sugere que o torque de fechamento, em lb.pol, seja a metade do diâmetro da terminação da embalagem, em mm. Como o diâmetro medido foi próximo a 38mm, o torque aplicado deveria ser de 19lb.pol para garantir uma selagem de boa qualidade. Como as garrafas foram fechadas manualmente o torque aplicado foi ligeiramente abaixo do valor ideal. A média da determinação do torque de abertura das embalagens foi de 5lb.pol (0,6N.m).

### 5.5.6 Integridade do fechamento

A integridade do fechamento das embalagens foi verificada anteriormente ao envase do leite através do teste de emissão de bolhas, não tendo sido verificada vazamentos para as condições de selagem adotadas; ou seja, através da termosselagem por indução com potência alta durante 2s.

Entretanto, durante o envase verificou-se algumas falhas na selagem devido à presença de resíduo de leite na área de contato do gargalo da garrafa com o selo. Verificou-se também que a exposição prolongada dos lacres ao ácido peracético, agente utilizado na operação de esterilização das embalagens, pode comprometer a eficiência da termosselagem por indução.

Em embalagens plásticas termosseladas a integridade do fechamento pode influenciar na vida útil dos produtos nelas acondicionados, uma vez que falhas na termossoldagem constituem-se em pontos de entrada de microrganismos, ar e/ou umidade ou ainda para a perda de misturas gasosas e vapores orgânicos. Sendo assim, problemas de integridade do fechamento podem levar os alimentos termoprocessados na embalagem ou acondicionados assepticamente, a serem recontaminados pela entrada de microrganismos. De maneira geral, um fechamento é considerado íntegro quando assegura ao produto, no mínimo, a mesma proteção que é conferida pelo material de embalagem. A integridade do fechamento deve ser preservada mesmo depois de solicitações mecânicas que ocorrem durante o manuseio e distribuição (Alves et al, 1998).

### 5.5.7 Taxa de permeabilidade ao oxigênio

A taxa de permeabilidade ao oxigênio ( $TPO_2$ ) é uma propriedade importante das embalagens plásticas, relacionada à proteção de produtos sensíveis ao oxigênio, como o leite. A  $TPO_2$  de uma embalagem é definida como a quantidade de oxigênio que passa através da superfície da embalagem, por unidade de tempo, sob as condições de ensaio; sendo comumente expressa em  $\text{cm}^3/\text{embalagem}/\text{dia}$  a uma atmosfera de pressão diferencial de oxigênio entre as superfícies da embalagem, a certa temperatura e umidade relativa.

A Tabela 52 apresenta os resultados da determinação da  $TPO_2$  da garrafa utilizada. Com o objetivo de se fazer uma avaliação relativa, mediu-se a  $TPO_2$  de outros tipos de embalagem utilizadas comercialmente para leite longa vida.

**Tabela 52** - Taxa de permeabilidade ao oxigênio de embalagens para leite longa vida.

EMBALAGEM	<sup>3</sup> TPO <sub>2</sub> cm <sup>3</sup> /embalagem.dia.atm	<sup>3</sup> TPO <sub>2</sub> cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .dia.atm	dp
<sup>1</sup> garrafa de PEAD de 500mL pigmentada com TiO <sub>2</sub>	5,45	165,15	0,05
<sup>2</sup> garrafa de PEAD de 1L pigmentada com TiO <sub>2</sub> com camada intermediária preta	8,05	125,8	0,04
<sup>2</sup> laminado cartonado	-	-	-

<sup>1</sup> utilizada na pesquisa.

<sup>2</sup> disponível no mercado para leite longa vida.

<sup>3</sup> média de duas leituras de diferentes embalagens.

dp - desvio padrão.

O teste foi feito em condições ambiente cujos valores médios de temperatura e umidade relativa foram 26°C e 62%UR.

Os resultados das análises de TPO<sub>2</sub> indicaram que a garrafa utilizada na pesquisa apresentou uma boa barreira ao O<sub>2</sub> em relação às outras embalagens disponíveis no mercado, podendo ser considerada adequada para o acondicionamento de leite longa vida, do ponto de vista de barreira ao O<sub>2</sub>.

Não foi possível determinar a TPO<sub>2</sub> das embalagens cartonadas, pois estas apresentaram-se com falta de integridade; ou seja, com porosidade nas regiões de selagem, formando-se bolhas ao aplicar uma pressão de 12mmHg. A integridade foi avaliada através do teste de formação de bolhas por pressão da embalagem submersa em água. Portanto, a TPO<sub>2</sub> destas embalagens foi muito alta, acima do limite operacional do aparelho equipado com detector coulométrico de alta sensibilidade.

#### 5.5.8 Opacidade da garrafa

Os valores de opacidade determinados para a embalagem utilizada na pesquisa e de outras comercialmente disponíveis para leite longa vida são mostrados na *Tabela 53*.

**Tabela 53** - Determinação de opacidade de embalagens para leite longa vida.

EMBALAGEM	<sup>3</sup> OPACIDADE (%)
<sup>1</sup> garrafa de PEAD pigmentada com TiO <sub>2</sub>	90,10
<sup>2</sup> garrafa de PEAD pigmentada com TiO <sub>2</sub> com camada intermediária preta	99,41
<sup>2</sup> laminado cartonado com camada de alumínio	100,00

<sup>1</sup> utilizada na pesquisa.

<sup>2</sup> disponível no mercado para leite longa vida.

<sup>3</sup> média de três leituras.

As reações de oxidação de lipídios, por exemplo, são altamente sensíveis à luz, especialmente às radiações de comprimento de onda na região do ultravioleta (200 a 400nm). Outros exemplos de reações de deterioração catalisadas pela luz são a oxidação de vitaminas e a fotodegradação de pigmentos que alteram o valor nutritivo e a cor do produto, respectivamente. Outro exemplo decorrente da fotodegradação é o desenvolvimento de odor e sabor estranhos em produtos de laticínios (Alves et al, 1998).

Os resultados da análise de opacidade sugerem que a garrafa utilizada na pesquisa deveria ter sua barreira à luz reforçada acrescentando-se uma camada totalmente impermeável à luz. Uma embalagem com características superiores de barreira não foi utilizada em virtude de sua indisponibilidade durante o desenvolvimento da pesquisa.

Conforme Nicolas (1995), para garantir uma boa estabilidade ao leite UHT, uma proteção eficiente contra a luz deve ser obtida, já que o leite é muito sensível à radiação ultravioleta (uv). A garrafa de PEAD transparente monocamada produzida por extrusão oferece uma proteção parcial contra a radiação uv. Portanto, para evitar a degradação do produto, a técnica de co-extrusão tem sido aplicada. Neste caso, a garrafa é produzida com três diferentes camadas: a interna e externa de PEAD de cor branca pigmentadas com TiO<sub>2</sub>, e a camada intermediária de carbono escuro e polietileno reciclado. Essa embalagem multicamada garante uma vida útil mínima de 3 meses ao leite UHT.

Entre as duas embalagens comerciais avaliadas a garrafa de PEAD de 1L apresentou boa barreira ao O<sub>2</sub> e à luz. Apesar de apresentar uma excelente

barreira à luz, as embalagens cartonadas apresentaram uma alta permeabilidade ao O<sub>2</sub>.



## 6 conclusões

As conclusões da pesquisa foram divididas em cinco partes:

### *Conclusões relativas aos testes preliminares que antecederam aos processamentos*

- De acordo com a verificação da pressurização da sala de envase, esta se manteve constante e suficiente para manter o grau de limpeza do ambiente especificado;
- A taxa de movimentação do ar na área limpa excedeu os parâmetros estabelecidos, proporcionando uma qualidade adicional à limpeza do ar interno;
- Os resultados gerados na contagem de partículas totais em suspensão na sala de envase, ante-sala e vestiário, nos três estados ocupacionais, satisfizeram às normas internacionais estabelecidas para classificação de áreas limpas;
- De acordo com a monitoração de microrganismos na área limpa, as contagens realizadas nos três estados de ocupação atenderam aos padrões internacionais, indicando a adequação do ambiente quanto ao número de microrganismos em suspensão no ar;
- O plano de sanitização e esterilização implementado na planta piloto demonstrou eficiência, baseado nos testes microbiológicos realizados.

### *Conclusões relacionadas aos controles simultâneos aos processos preliminares*

- A limpeza da sala de envase avaliada foi considerada satisfatória para o desempenho de sua função;
- Os procedimentos de sanitização e esterilização adotados na planta piloto foram considerados eficazes;
- A área limpa apresentou as condições necessárias projetadas para atender seu objetivo como componente do sistema asséptico desenvolvido.

### *Conclusões relacionadas aos controles simultâneos aos processos finais*

- A sala limpa monitorada apresentou-se em conformidade com suas especificações funcionais e expectativas de desempenho;
- Os procedimentos utilizados na assepsia das garrafas demonstraram eficácia para a linha de envase asséptico avaliada;

- O plano de limpeza e esterilização química da linha de processamento e envase demonstrou relativa eficiência, sugerindo, no entanto, monitorações sistemáticas e um eventual aumento no rigor dos procedimentos.

#### *Conclusões relativas à avaliação do sistema asséptico*

- Apesar da relativa eficiência do desempenho do sistema, verificada a partir da monitoração sistemática dos pontos de controle identificados, observou-se uma taxa de não esterilidade em dois dos quatro lotes processados;
- A estimativa da vida útil para os 4 lotes de leite variou de 4 a 11 semanas, observação supostamente justificada pela variação da qualidade sensorial da matéria-prima utilizada;
- A utilização de embalagens de alta barreira, especialmente à luz, aumentaria a vida útil do produto; indicando a necessidade de pesquisas neste sentido, para se obter vida útil semelhante aos outros sistemas de leite longa vida.
- Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam a necessidade de implementação de melhorias na infra-estrutura da planta construída, como a instalação de uma válvula dosadora para um envase mais apropriado ao acondicionamento asséptico do leite, visto que o dispositivo utilizado provocava produção de espuma e dificuldade de atingir o mesmo nível de enchimento.

#### *Conclusões relacionadas à caracterização das embalagens*

- A garrafa utilizada apresentou baixa taxa de permeabilidade ao oxigênio ( $\text{TPO}_2$ );
- A permeabilidade à luz poderia ser reduzida através da técnica de coextrusão de uma camada de barreira à embalagem;
- Das duas embalagens, comercialmente disponíveis para leite longa vida, ambas apresentaram alta barreira à luz. O laminado cartonado, entretanto, apresentou alta permeabilidade a gases, revelando a garrafa de PEAD uma qualidade superior, resultando em melhor proteção ao leite.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. F. **Avaliação de processo de sanificação química de garrafas plásticas para sistemas assépticos**. 2001. 117p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

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

ABS / CONTROLE AMBIENTAL E VALIDAÇÕES. **Áreas limpas classificadas**. Jundiaí, s.n.t.

AGGARWAL, M. L. Commercial sterilization and aseptic packaging of milk products. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 37, n.5, p.250-254. 1974.

AGENEW, B. Clean Air Systems for aseptic packaging. **Food Technology**, Chicago, v. 27, n. 9, p.58-62, Sept., 1973.

AHVENAINEN, R. Quality assurance and quality control of aseptic packaging. **Food Reviews International**. v.4, n.1, p.45-76, 1988.

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.

ALEXANDRE, C. S. Filtragem do ar. In: SEMINÁRIO SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO DE PROJETO E CONSTRUÇÃO DE ÁREAS LIMPAS, 1997, São José dos Campos.

ALMEIDA, T. C. A.; FARIA, J. A. F. Análise sensorial e estudos de estabilidade. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.2, n.15, p.30-32, set./out., 1997.

ALVES, R. M. V.; OLIVEIRA, L. M.; COLTRO, L.; GARCIA, E. E. C.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M. **Ensaio para avaliação de**

**embalagens plásticas rígidas.** Centro de Tecnologia de Embalagem - ITAL. Campinas, 1998. 224p.

AMARAL, F. D. Contaminação microbiana em ambiente industrial farmacêutico. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.6, n.57, p. 32-37, jan, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E 18.06.07. Standard guide for the shelf life determination of consumer products by sensory evaluation.** Philadelphia, ASTM, 1993.

ANDRADE, N. J.; DE MACÊDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1996. 182p.

ANON. Aseptics take off. **Food Technology**, Chicago, p. 46-50, Jan.,1971.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução nº 12 de 2 jan. 2001. Documento Brasília p.18.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução Mercosul/GMC nº 78 de 1994.

ABLV (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA). **Estatísticas de leite longa vida.** Disponível em: <[www.ablv.org.br](http://www.ablv.org.br)>. Acesso em: 30 abr. 2004.

AOAC INTERNATIONAL (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. Arlington. 16<sup>th</sup> Edition. 1995. 75p.

A assepsia na embalagem. **EMBANNEWS**, São Paulo, v.8, n.4, p.24-26, abr.,1997.

BANKS, W.; DALGLEISH, D. G. Milk and Milk Processing. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology – The Microbiology of Milk.** London: Elsevier Applied, 1990. V.1, cap.1: p.32-34.

BARONI, M. C. V. S. M. Monitoramento ambiental na manufatura de produtos estéreis. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São José dos Campos, n.5, p. 14-18, nov./dez. 2001.

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.

BEARG, D. W. **Indoor air quality and HVAC systems**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 220p.

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

BENNETT, E. S. F. Testes em áreas limpas. In: SEMINÁRIO SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO DE PROJETO E CONSTRUÇÃO DE ÁREAS LIMPAS, São José dos Campos, 1997.

BERTRAND, K. Aseptic - Beyond Brick-style Paks. *Packaging*. May p. 65-70, 1984.

BERNARD, D. T.; GAVIN, A.; SCOTT, V. N.; CHANDARANA, D. I.; ARNDT, G.; SHAFER, B. Establishing the aseptic processing and packaging operation. In: CHAMBERS, J. V.;

BISCHOFF, E. Aseptic processing in the food industry – general observations regarding the application of aseptic processes in the food industry. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. Hamburg: Technomic, 1988. Cap.6.3. p. 258-267.

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

BLOIS, A. Projeto de conjunto de áreas limpas. In: SEMINÁRIO SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO (SBCC) DE PROJETO E CONSTRUÇÃO DE ÁREAS LIMPAS, 1997, São José dos Campos.

BLOCK, S. S. Sterilization. In: LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**. London: Academic Press, 1992. v.4, p. 87-103.

BLÜMKE, H. Sterile room techniques in the food industry. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.6.11 p.265-270.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, 166p. 1981.

BRASIL. Portaria nº 307, de 4 de setembro de 1997. Estabelece padrões de identidade e qualidade para o leite UHT/UAT. **Diário Oficial** (República Federativa do Brasil), Brasília, 4 set. 1997.

BROWN, W. E. **Plastics in food packaging**: properties, design, and fabrication. New York: Marcel Dekker, 1992. 539p.

BUCHNER, N. Aseptic packaging in glass and plastic bottles. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.6.8. p.237-239.

BUCHNER, N. Aseptic processing and packaging of food particulates. In: WILLHOFT, E, M, A. **Aseptic Processing and Packaging of Food Particulates**. Blackie Academic e Professional, 1993. Cap.1. p.9-10.

BURTON, H. Thirty-five years on – a story of UHT research and development. **Chemistry and Industry**. s/v. n.16. p.546-553, Aug., 1985.

CADWELL, G. H.; WHYTE, W. High efficiency air filtration. In: WHYTE, W. **Clean room design**. Baffins Lane: John Wiley e Sons Ltd, 1991. Cap. 7, p.181-204.

CARLSON, V. R. **Aseptic Processing**. 4<sup>th</sup>ed. Iowa: Cherry-Burrell Corporation, march, 1971. 79p. (Technical digest cb-201).

CERF, O. Aseptic processing in the food industry – statistical control of uht milk. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. Hamburg: Technomic, 1988. Cap.6.2. p. 244-257.

CERNY, G. Testing of aseptic machines for their efficiency of sterilization of packaging materials by means of hydrogen peroxide. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup>ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.8. p. 307-313.

CETEA (CENTRO DE TECNOLOGIA DE EMBALAGEM DE ALIMENTOS) – ITAL. **Novas tecnologias de acondicionamento de alimentos**. Campinas, 1988. 162p.

CHAMBERS, J. V.; NELSON, P. E. **Principles of aseptic processing and packaging**. 2<sup>a</sup> ed. Washington, 1993. 257p.

CHEVROTON, D. The aseptic filling of beverage in bottles. **Industrie delle Bevande**, Dreux, v.25, n.142, p.120-122, apr., 1996.

Climatização cria novos conceitos na produção de alimentos. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.6, n.28, p.22-32, jan./fev., 2000.

CLOUGH, G. Surface finishes in cleanrooms. In: WHYTE, W. **Clean room design**. Baffins Lane: John Wiley e Sons Ltd, 1991. Cap. 8, p.205-229.

CORDIER, J. L. Quality assurance and quality monitoring of UHT processed foods. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v.43, n.2, p.42-45, may, 1990.

COUSIN, M. A. Microbiology of aseptic processing and packaging. In: CHAMBERS, J. V.; NELSON, P. E. **Principles of Aseptic Processing and Packaging**. 2<sup>a</sup> ed. Washington: The Food Processors Institute, 1993. Cap. 4. p.71.

DE MARTINO, D. B. A escalada do leite longa vida. **Engarrafador Moderno**, São Bernardo do Campo, v.10, n.86, p.10-15, jun, 2001.

DENNY, C. B.; CORLETT, D. A. Canned foods – tests for cause of spoilage. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap.61. p. 1051-1092.

DI RIENZO, C. Roupas especiais: proteção e qualidade em salas limpas. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.5, n.31, p. 16-22, nov, 2001.

DRENNAN B. Aseptic bottles. **Food Engineering**, Radnor, v. 55, n. 6, p. 64-65, Jun., 1983.

DRYER, J. M.; DEIBEL, K. E. Canned foods – tests for commercial sterility. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap.60. p. 1037-1049.

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

EGUCHI, S. Y.; MASSAGUER, P. R. **Desinfecção e Esterilização**. Curso de treinamento. Campinas, 1995.

FARIA, J. A. F. **Embalagem de leite de consumo (leites pasteurizados e esterilizados)**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1985. 16p.

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



FARIA, J. A. F. Estabilidade 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.

FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology**: principles and practice. New York: Ellis Horwood, 1988. 505p.

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

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.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1Ed. Blackie Academic e Professional, 1998. 478p.

FREDSTED, L. B.; RYSSTAD, G.; EIE, T. Pure-Lac<sup>TM</sup>:The new milk with protected freshness and extended shelf life. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Heat Treatments e Alternative Methods**. Brussels: IDF, 1996. session I. p.104-125.

FRIIS, A. Pesquisa e desenvolvimento relativos a controle de contaminação na indústria de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, n.2, p.6-10, set./out., 2000.

GAMINO, A. E. Projeto de salas limpas. In: SEMINÁRIO SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO (SBCC) DE PROJETO E CONSTRUÇÃO DE ÁREAS LIMPAS, 1997, São José dos Campos.

GILBERT, P.; BROWN, G.; SANDWITH, H. A novel method for cleaning high temperature short time pasteurizers. **South Africa Journal Dairy Technology**, Joahnnesburg, v.11, n.2, p. 57-59, Jun.,1979.

GRIMM, L. Assepsia a frio – Um processo de envase do futuro? **Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, n.56, p.72-74, mar./abr., 1998.

GRIMM, L. Beverage aseptic cold filling. **Fruit Processing**, Bad Kreuznach, v.8, n.7, p.262-265, Jul, 1998.

GRABHOFF, A. Versuche zur Ablösung festverkrusteter Verschmutzungen in Milcherhitzern im Mehrphasenreinigungsverfahren. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. 45: 67-80, 1993.

GRABHOFF, A. Cleaning of heat treatment equipment. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.328, p.32-44, 1997.

GRANDISON, A. S. UHT processing of milk: seasonal variation in deposit formation in heat exchangers. **Journal of the Society of Dairy Technology**. Huntingdon, v.41, n.2, p.43-49, May, 1988.

GUILHERME, A. S. Controle de contaminação através da tecnologia de salas limpas. **Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São José dos Campos, n.7, p. 28-29, mar./abr. 2002.

GUIMARÃES, R. A importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.16, n.102/103, p.25-34, nov./dez., 2002.

HAYNES, P. R. D. **Food Microbiology and Hygiene**. 2 ed. Editora Chapman e Hall, 1996. 578p.

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.

HERNANDEZ, R. J. Food packaging materials, barrier properties, and selection. In: VALENTAS, K. J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R. P. **Handbook of engineering practice**. Boca Raton: CRC Press, 1997. Cap.8, p.291-360.

HOLDSWORTH, S. D. **Aseptic Processing and Packaging of Food Products**. London: Elsevier Applied Science, 1992. 428p.

ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*). Programas de muestreo para conservas de alimentos. In: Microorganismos de los alimentos-Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. Chap.15, p 149-154. Volume II, Editorial ACRIBIA, Zaragoza, 1981.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5<sup>th</sup> edition. New York: Chapman e Hall, 1996. 661p.

JENSEN, J. A. Recent developments in direct and indirect UHT systems. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Heat Treatments e Alternative Methods**. Brussels: IDF, 1996. session I. p.45-50.

JÖNCK, R. H. Treinamento para operadores em ambientes assépticos proporciona segurança e qualidade. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.5, n.32, p. 12-19, dez, 2001.

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

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 e Hall, 1993. cap.8. p.160-164.

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.

KEOGH, M. K. Some problems in UHT processing. **Dairy Industries**, v.38, n.4, p.164-167, Apr., 1973.

KESSLER, H. G. **Food Engineering and Dairy Technology**. Verlag A. Kessler, Freising, 1981. 654p.

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

KOMOROWSKI, E. S.; EARLY, R. Liquid milk and cream. In: EARLY, R. **The Technology of Dairy Products**. 1<sup>st</sup> ed. New York: VCH Publishers, Inc, 1992. Cap.1. p. 10-15.

KOSINSKI, E. Raw material quality. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 315, p.12-16. 1996.

LEITÃO, M. F. F. Amostragem na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos: princípios gerais e planos de amostragem. Campinas, ITAL, sd.

LEME, I. L.; SILVA, V. G. Recomendações para a garantia da qualidade da água tratada para uso em unidades de hemodiálise – parte 1. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.5, n.36, p. 44-47, abr., 2002.

MANO, C. Os produtos campeões de venda num mundo ávido por praticidade. **Revista Exame**, São Paulo, v.34, n.13, p.40-43, jun., 2000.

MARCY, J. E.; NAGY, S. Symposium on nutritional, sensory and chemical changes associated with aseptic packaging of foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.34, n.3, p. 383, May/Jun., 1986.

MARTINS, J. F. P; LUCHESE, R. H. Prevenção e controle de contaminação na indústria de alimentos. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.3 n.13, p.36-38, set./out.1999.

MASSAGUER, P. R. Métodos de preservação e extensão de estabilidade.

**Apostila de aula.** Unicamp, Campinas, 1998. 12p.

MEHTA, R. S. Milk processed at ultra-high-temperatures - a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.43, n.3, p.212-225, Mar., 1980.

MAA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO). Normas de Lácteos. São Paulo, p.24-35, jul. 2001.

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

MÖLLER, A. L. International standards for the design of cleanrooms. In: WHYTE, W. **Clean room design**. Baffins Lane: John Wiley e Sons Ltd, 1991. Cap. 5, p.121-162.

MOSTERT, J. F.; LÜCK, H.; HURMANN, R. A. Isolation, identification e practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. **South Africa Journal of Dairy Technology**, Johannesburg, v.11, n.3. p.125-132, 1979.

MUIR, D. D. The Microbiology of Heat-Treated Fluid Milk Products. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology – The Microbiology of Milk**. London: Elsevier Applied, 1990. V.1, cap.6: p.212.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 3. Factors influencing intermediate and long life dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon, v.49, n.3, p.67-72, Aug. 1996.

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

NASCIMENTO, F. Leite e queijo: Qual a melhor embalagem? **Revista Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.3, n.16, p.10-13, nov./dez., 1997.

NELSON, P. E. **Principles of Aseptic Processing and Packaging**. 2<sup>a</sup> ed. Washington: The Food Processors Institute, 1993. Cap. 8. p.238.

NICOLAS, R. Aseptic filling of UHT dairy products in HDPE bottles. **Food Technology**, p. 52-58, Mar./Apr. 1995.

NICOLÓSI, M. Tecnologia para quando a vida estiver por um fio. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.5, n.28, p. 20-25, ago. 2001.

OLIVEIRA, A. F. A. Produtos lácteos em embalagens cartonadas. **Engenharia de Alimentos**. v.2, n.9, p.22-24, jan., 1997.

ORTIZ, S. A.; OLIVEIRA, L. M.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M. Ensaio para embalagens plásticas e de vidro. In: DANTAS, S. T.; ORTIZ, S. A.; OLIVEIRA, L. M. **Embalagens Rígidas para Bebidas**. Campinas: CETEA/ITAL, 2000. Cap.7. p161-257.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. vol.2. Trad. Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo:Ed. McGraw-Hill do Brasil. 1981. 495p.

PERLAT, M. N.; LALANDE, M; CORRIEU, G. Cleaning a UHT milk sterilizer. Use of alkaline and acid detergents and kinetic aspects. **Lait** 66: 31-36. 1986.

PETRUS, R. R. Avaliação de conformidade das condições operacionais de uma área limpa para envase asséptico. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.17, n.112, p.22-30, set., 2003.

PETRUS, R. R. A importância da aplicação da tecnologia de salas limpas na indústria de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.37, n.1, p.48-51, jan./jun., 2003.

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

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

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.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKEBRANDT, E.; PRIEST, F. G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, n.3, p.759-764, 1996

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.246-255.

PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. Processamento de leite de consumo. **Apostila de aula**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1991.

PRATA, L. F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.54, p.10-15, mar./abr., 1998.

QUAST, D. G. **Cálculo da intensidade de esterilização e de cozimento de alimentos**. Instruções Técnicas nº10, ITAL. Campinas: 1976. 59p.

RADMORE, K.; OLZAPFEL, W. H.; LÜCK, H. Proposed guidelines for maximum acceptable air-borne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. **International Journal of Food Microbiology**, p.91-95, 1988.

RAMMERT, M. Aseptic cold fill: experiences and developments. **Industrie delle Bevande**, Dreux, v.25, n.142, p.123-128, apr. 1996.

REES, J. A G; BETTISON, J. Processing and Packaging of Heat Preserved Foods; AVI, Blackie e Son Ltda. 1991.

REIN, C. E. Materiais de construção e acabamentos. In: SEMINÁRIO SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO (SBCC) DE PROJETO E CONSTRUÇÃO DE ÁREAS LIMPAS, 1997, São José dos Campos.

REUTER, H. Processes for packaging materials sterilization and system requirements. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap.5 p155-165.

REUTER, H. Aseptic packaging of food. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. Hamburg: Technomic, 1989. Cap.1 p. 3-10.

RIBAS, S. Brasil ainda tem um longo caminho. **Estado de Minas**, Belo Horizonte, 29 set. 2003. Caderno Agropecuário, p.3.

RICE, J. What's new in aseptics? **Food Processing**, v.54, n.10, p.12-23. 1993.

ROBERTSON, G. L. Packaging Materials for aseptic foods. **Food Technology in New Zealand**, v.18, n.2, p.21-27, Feb., 1983.

ROLAND, N. Aseptic packaging system for PET bottles. **Fruit Processing**, La Ferté Bernard, v.6, n.9, p.367-371, Sep. 1996.

ROMANO, M. A.; FARIA, J. A. F.; ANJOS, C. A. R. Sistemas assépticos para alimentos em embalagens plásticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.32, n.2, p.180-188, set/dez. 1998.



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

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

Salas limpas na indústria alimentícia. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.5, n.26, p.22-24, set./out.1999.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. Embalagens plásticas. In: DANTAS, S. T. **Embalagens rígidas para bebidas**. Campinas: CETEA/ITAL, 2000. Cap.5, p.115-128.

SATYANARAYANA, C. V. V.; DATTA, A. K.; MISHRA, B. P. Design and testing of a small scale indirect type ultra high temperature (UHT) milk sterilizer. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.26, n.3, p.379-387, 1995.

SCHICHT, H. H. Cost-efficiency and energy-saving concepts for cleanrooms. In: WHYTE, W. **Clean room design**. Baffins Lane: John Wiley e Sons Ltd, 1991. Cap. 6, p.163-179.

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

SENAI/SEBRAE. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Brasília, 1999. 371p.

SHAPTON, D. A ; SHAPTON, N. F. **Principles and Practices for the Safe Processing of Foods**. Oxford: Heinz, 1991. 457p.

SHEW, D. I. Technical aspects of quality assurance. **International Dairy Federation Bulletin** – New Monography on UHT Milk. n. 133, cap.9, p.115-121, 1981.

SHIPE, W. F.; BASSETTE, R.; DEANE, D. D.; DUNKLEY, W. L., HAMMOND, E. G.; HARPER, W. J.; KLEYN, D. H.; MORGAN, M. E.; NELSON, J. H.; SCANLAN, R. A. Off-flavors in milk: nomenclature, standards and bibliography. **Journal of Dairy Science**. 61:855, 1978.

SIGNORE, A. C. Protection of light-sensitive products. **Modern Packaging**. p.143-145, jun, 1968.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 227p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVA, C. A. S.; CABRAL, B. P. O.; SIMM, E. M.; ANDRADE, N. J. Polietileno para embalagem de leite: adesão bacteriana e controle pela radiação ultravioleta. **Indústria de Laticínios**. v.7, n.39, p.54-58, maio./jun., 2002.

SNYDER, J. O. P. Control of surface microorganisms and biofilms. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, p.525-529, Jul. 1992.

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

STEINMAN, A. Contaminação eletrostática na fabricação em salas limpas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, n.2, p.4-5, set./out., 2000.

STEPANIAK, L. Factors affecting quality and possibilities of predicting shelf-life of pasteurized and ultra-high temperature heated milks. **Italian Journal of Food Science**. v.3, n.1, p.11-25, 1991.

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<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap.3. p.51-74.

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

TOLEDO, R. T. Chemical sterilants for aseptic packaging. **Food Technology**, Chicago, p.102-112, May,1975.

TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2<sup>nd</sup>ed. London: Ed. Academic Press. 1993. 478p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and Milk Products**: technology, chemistry and microbiology. London: 1<sup>a</sup> ed. Chapman e Hall, 1994. v.1. 451p.

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

VIALTA, A. Microbiologia de produtos lácticos fluidos tratados termicamente. **Coletânea de Textos: Processos, Instrumentação e Automação de Sistemas UHT - TECNLAT/ITAL**. Campinas, 1996.

VIEIRA, R. M. R. Diretrizes para implementação de um projeto de produção de água utilizada para uso farmacêutico. **Controle de Contaminação**, São Paulo, v.6, n.54, p. 26-31, out. 2003.

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

VON BOCKELMANN, B. **Long life products**: long life from raw materials to finished products. Värnamo: Tetra Pak, 1988b. 68p.

VON BOCKELMANN, B. Processamento asséptico e empacotamento de produtos alimentícios líquidos (leite, creme, água, sucos). **Revista do ILCT**, v. 31, n.13, maio./jun.1976.

YOKOYAMA, M. New aseptic packaging systems. **Packaging Japan**, Tokyo, p.23-27, Set.1987.

WATSON, M. P.; McEWAN, J. A. Sensory changes in liquid milk during storage and the effect on consumer acceptance. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.48, n.1, p.1-8, Feb. 1995.

WESTHOFF, D. C. Heating milk for microbial destruction: a historical outline and update. **Journal of Food Protection**, v.41, n.2, p.122-130, Fev. 1978.

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

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

## 8 anexos

**Anexo 1** - *Lay out* da planta piloto utilizada no processamento e envase asséptico de leite, construída no DTA/FEA/UNICAMP.











## **Anexo 2 - *Lay out* da área limpa.**











### Anexo 3 - Fotos dos equipamentos da planta piloto.



Conjunto de equipamentos utilizados no processamento do leite, constituído por tanque de equilíbrio (1), trocador de calor a placas (2) e tanque de água pressurizada (3)



Trocador de calor a placas para tratamento UHT





Equipamento utilizado na esterilização das garrafas



Linha de envase asséptico montada na sala limpa ISO classe 7



Leite envasado assepticamente



Detalhes do envase asséptico de leite em garrafas de PEAD com monitoração simultânea de partículas





Termosselagem da garrafa por indução

#### Anexo 4 - Ficha utilizada na avaliação sensorial de leite longa vida.

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL DE LEITE LONGA VIDA	
NOME: _____	DATA: ____/____/____
E-MAIL: _____	
POR FAVOR, AVALIE A AMOSTRA CODIFICADA DE LEITE LONGA VIDA E USE A ESCALA ABAIXO PARA INDICAR O QUANTO VOCÊ GOSTOU OU DESGOSTOU EM RELAÇÃO AOS ATRIBUTOS APRESENTADOS.	
9 – GOSTEI MUITÍSSIMO	
8 – GOSTEI MUITO	
7 – GOSTEI MODERADAMENTE	
6 – GOSTEI LIGEIRAMENTE	
5 – NEM GOSTEI/NEM DESGOSTEI	
4 – DESGOSTEI LIGEIRAMENTE	
3 – DESGOSTEI MODERADAMENTE	
2 – DESGOSTEI MUITO	
1 – DESGOSTEI MUITÍSSIMO	
AMOSTRA: _____	
APARÊNCIA	
VALOR: _____	
COMENTÁRIOS:	
AROMA	
VALOR: _____	
COMENTÁRIOS:	
SABOR	
VALOR: _____	
COMENTÁRIOS:	
IMPRESSÃO GLOBAL	
VALOR: _____	
COMENTÁRIOS:	
SE ENCONTRASSE ESTE PRODUTO NO MERCADO:	
( ) CERTAMENTE EU COMPRARIA	
( ) PROVAVELMENTE COMPRARIA	
( ) TALVEZ COMPRARIA/TALVEZ NÃO COMPRARIA	
( ) PROVAVELMENTE NÃO COMPRARIA	
( ) CERTAMENTE NÃO COMPRARIA	

#### Anexo 5 - Certificações da área limpa

## 1ª Certificação

ABS Ambiental Comércio Ltda – Jundiaí/SP

› Verificação do *lay out* da área limpa

Na verificação do *lay out*, constatou-se que a área não apresentava problemas construtivos, estando apta ao trabalho.

› Taxa de movimentação de ar e pressão ambiental

Parâmetros de controle da área limpa *como construída*

AMBIENTE MONITORADO	NÚMERO DE MOVIMENTAÇÕES DE AR/HORA	PRESSÃO AMBIENTAL	PRESSÃO EM RELAÇÃO AO MEIO EXTERNO (mmca)
sala de envase	75	positiva	2,2
ante-sala	71	positiva	2,2
Vestiário	73	positiva	0,3

› Filtros absolutos

Os filtros absolutos não apresentaram problemas de vedação e integridade de seu meio filtrante, estando aptos ao processo de trabalho a que se destinavam.

› Pré-filtragem

O equipamento de ar condicionado em análise apresentou seus pré-filtros em bom estado de operação.

› Contagem eletrônica de partículas totais

Contagem de partículas totais em suspensão na área limpa *como construída*

AMBIENTE MONITORADO	CONTAGEM DE PARTÍCULAS (/m <sup>3</sup> de ar)		PADRÃO ISO 14644-1 (partículas/m <sup>3</sup> de ar)	
	≥ 0,5µm	≥ 5,0µm	≥ 0,5µm	≥ 5,0µm
SALA DE ENVASE (ISO classe 7)	55 809	1 276	352 000	2 930
ANTE-SALA (ISO classe 8)	712 604	2 042	3 520 000	29 300
VESTIÁRIO (ISO classe 8)	56 852	1 650	3 520 000	29 300

- Concluiu-se que a área limpa obteve resultados dentro da conformidade do projeto, atendendo as especificações normativas, estando certificada e apta ao processo produtivo.

*2ª Certificação*

*Air Clean* Controle de Contaminação Ambiental Ltda – Campinas/SP

- Taxa de movimentação de ar e pressão ambiental nos três ambientes da área limpa

Parâmetros de controle da área limpa *como construída*

AMBIENTE MONITORADO	NÚMERO DE MOVIMENTAÇÕES DE AR/HORA	PRESSÃO AMBIENTAL	PRESSÃO EM RELAÇÃO AO MEIO EXTERNO (mmca)
sala de envase	104	positiva	2,8
ante-sala	52	positiva	2,6
vestiário	51	positiva	2,6

- Estanqueidade dos filtros absolutos  
Em conformidade com as especificações funcionais
- Contagem eletrônica de partículas totais

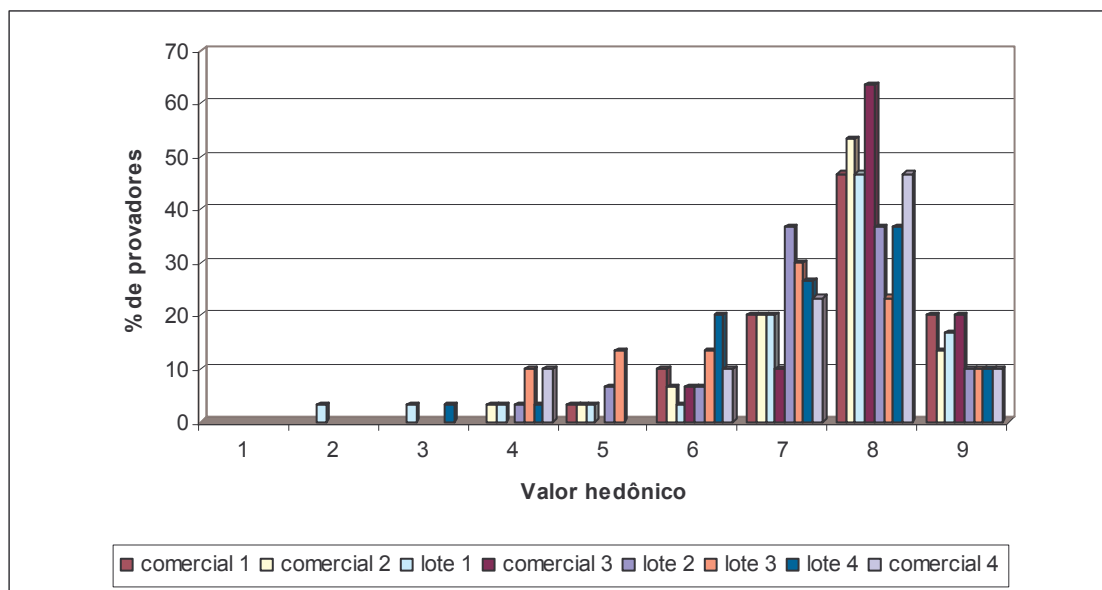
Contagem de partículas totais em suspensão na área limpa *como construída*

AMBIENTE MONITORADO	CONTAGEM DE PARTÍCULAS (/m <sup>3</sup> de ar)		PADRÃO ISO 14644-1 (partículas/m <sup>3</sup> de ar)	
	≥ 0,5µm	≥ 5,0µm	≥ 0,5µm	≥ 5,0µm
SALA DE ENVASE (ISO classe 7)	8 127	283	352 000	2 930
ANTE-SALA (ISO classe 8)	14 382	459	3 520 000	29 300
VESTIÁRIO (ISO classe 8)	74 488	389	3 520 000	29 300

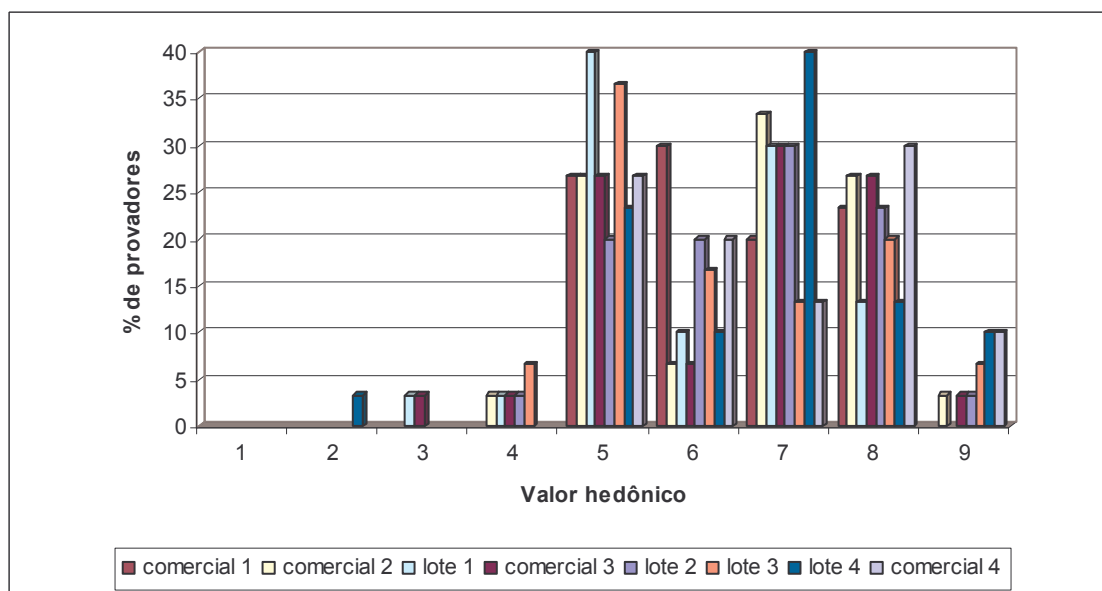
- Concluiu-se que os resultados obtidos estavam em conformidade com os valores estabelecidos pela ISO 14644-1, estando a área limpa certificada.

**Anexo 6** - Histogramas de frequência de notas dos testes de aceitação do leite.

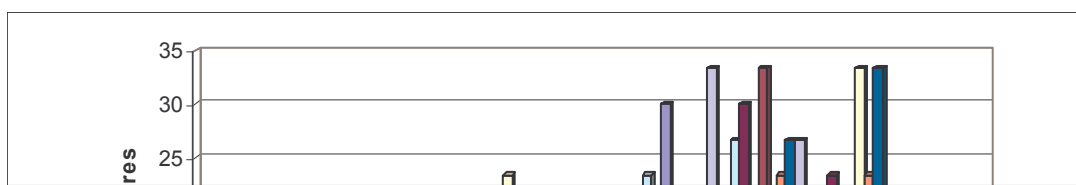




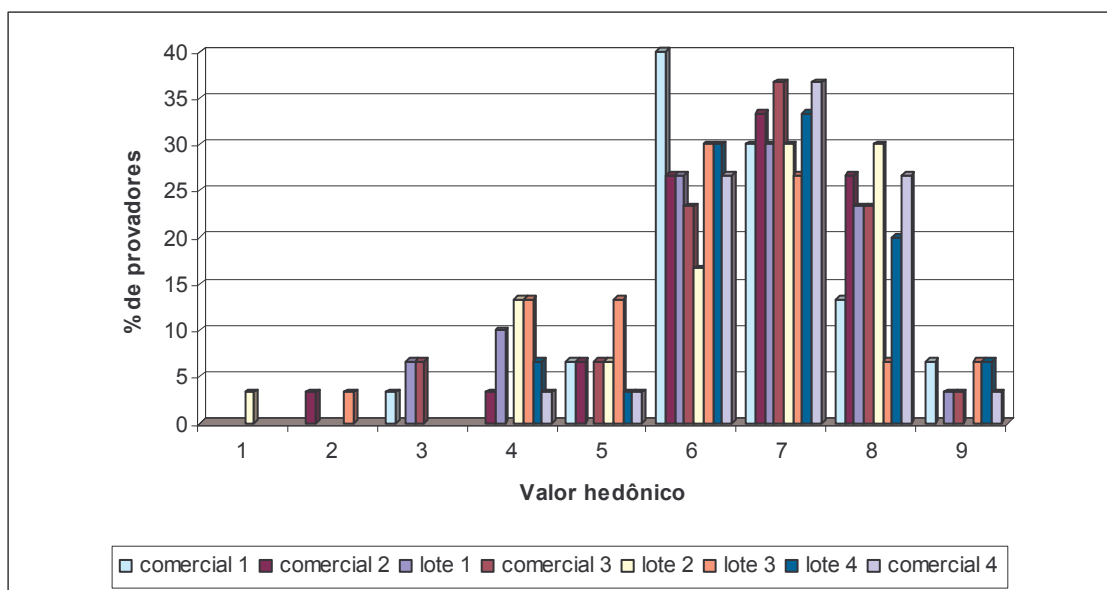
Histograma de frequência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 2 semanas.



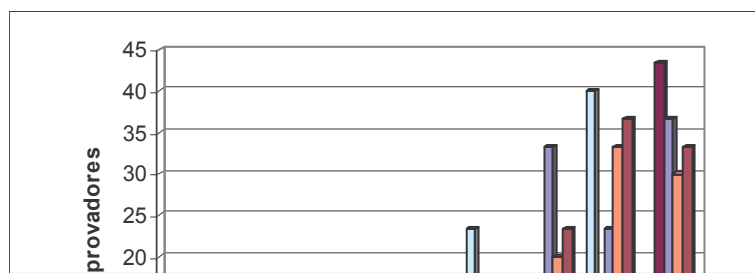
Histograma de frequência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 2 semanas.



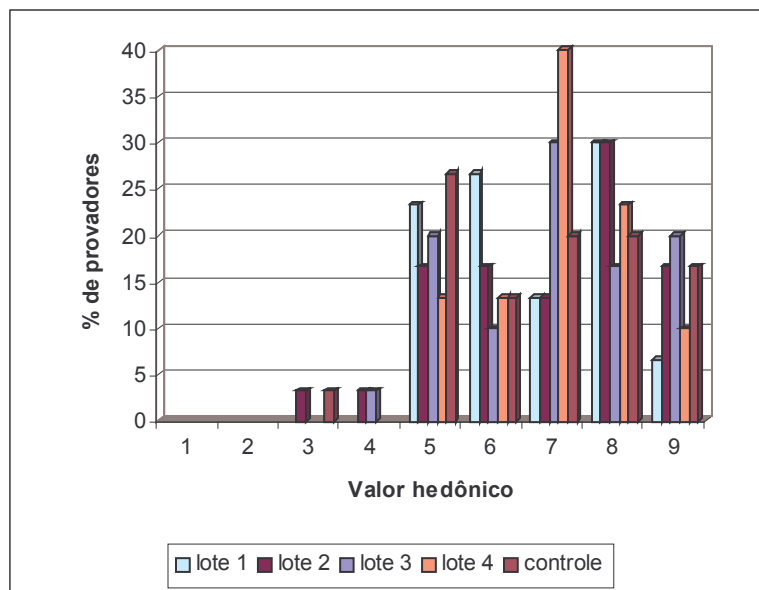
Histograma de freqüência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 2 semanas.



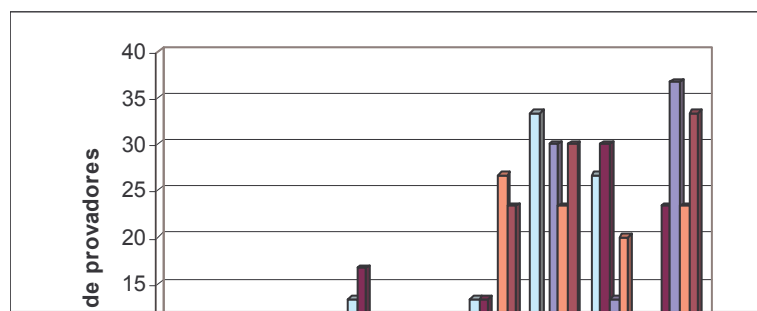
Histograma de freqüência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 2 semanas.



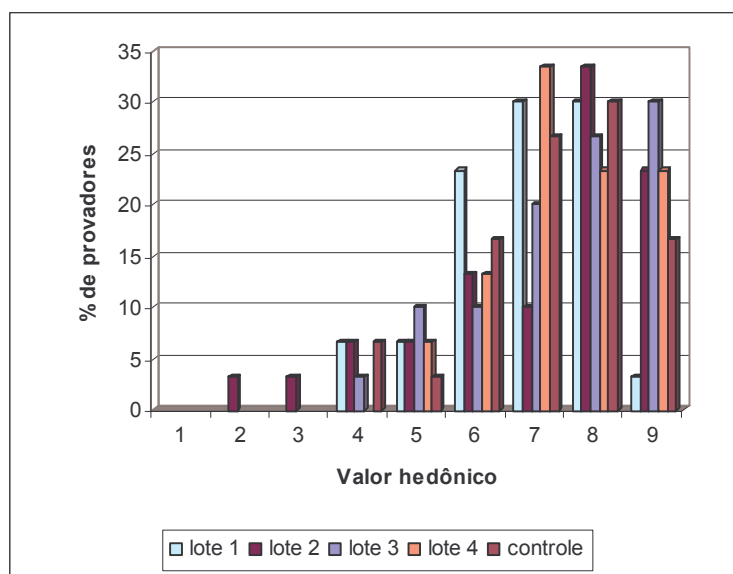
Histograma de freqüência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 3 semanas.



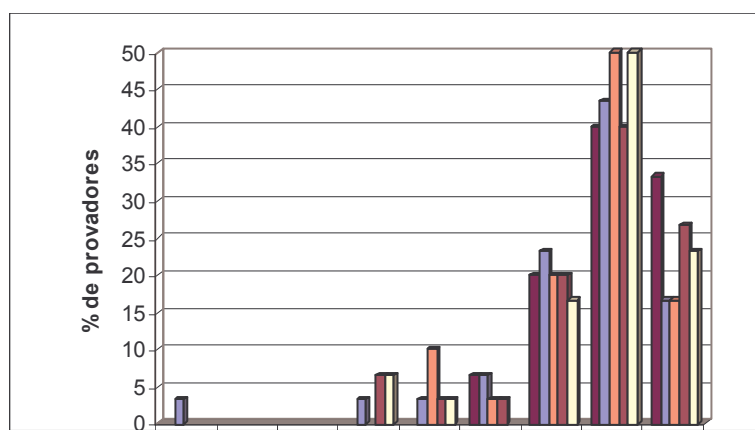
Histograma de freqüência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 3 semanas.



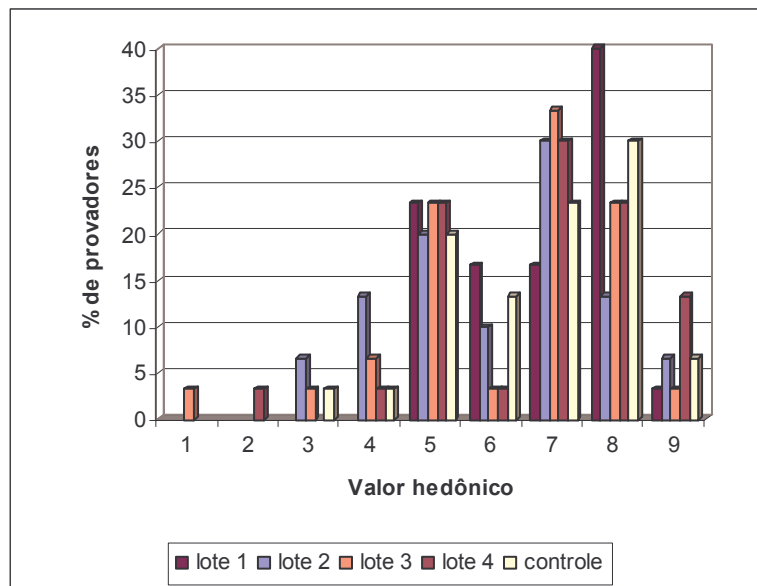
Histograma de freqüência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 3 semanas.



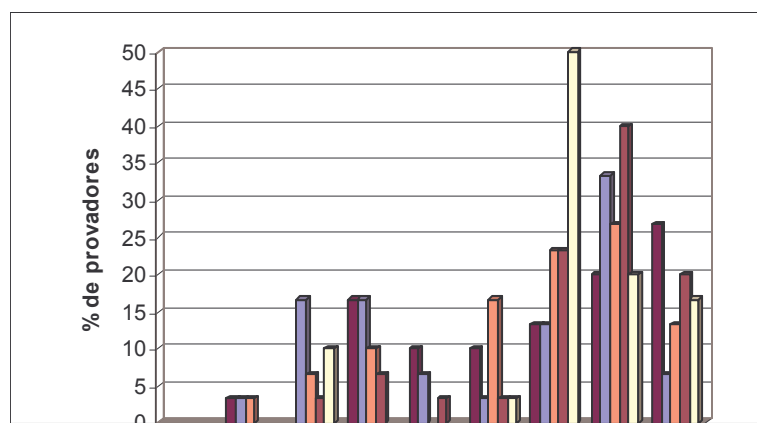
Histograma de freqüência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 3 semanas.



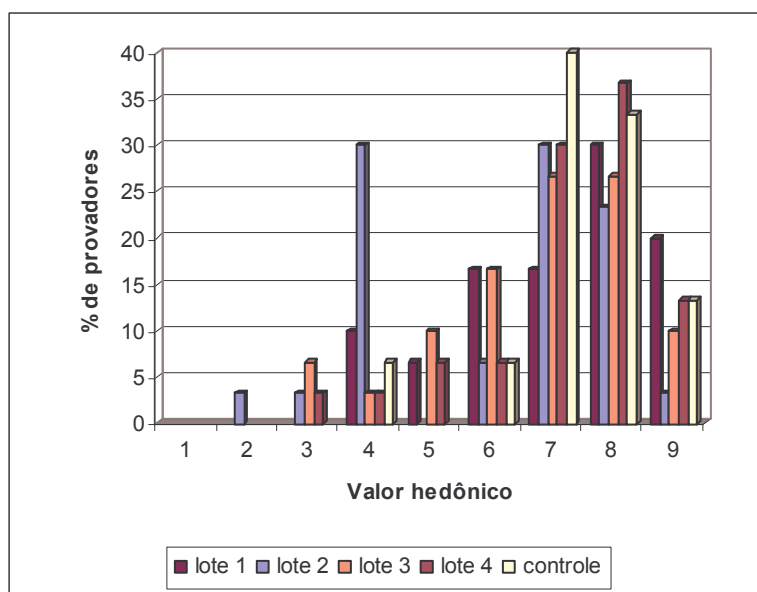
Histograma de freqüência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 4 semanas.



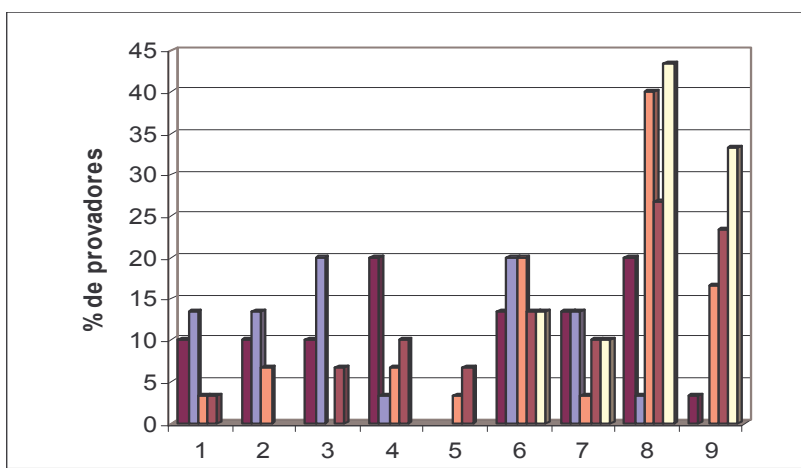
Histograma de freqüência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 4 semanas.



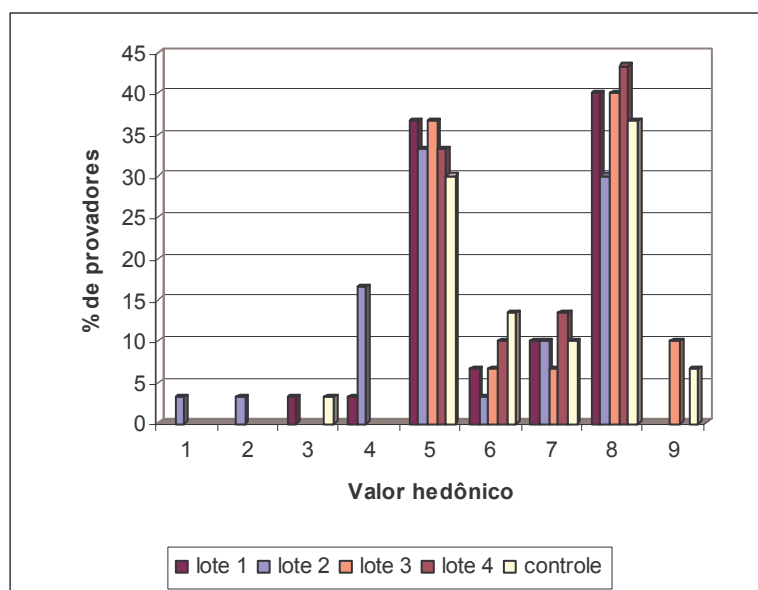
Histograma de freqüência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 4 semanas.



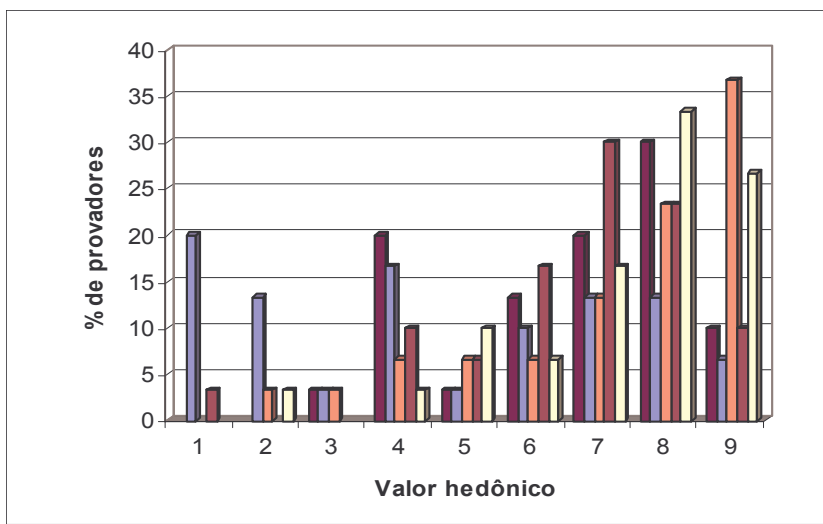
Histograma de freqüência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 4 semanas.



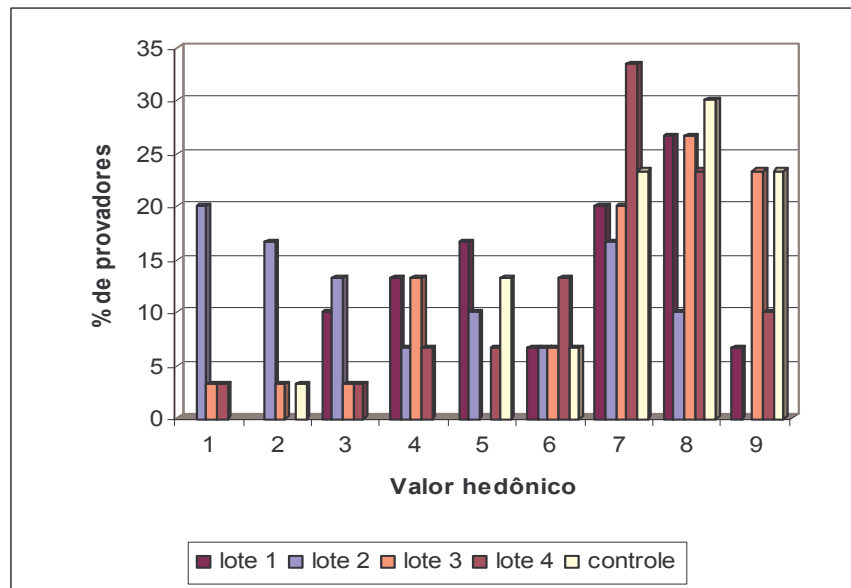
Histograma de frequência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 7 semanas.



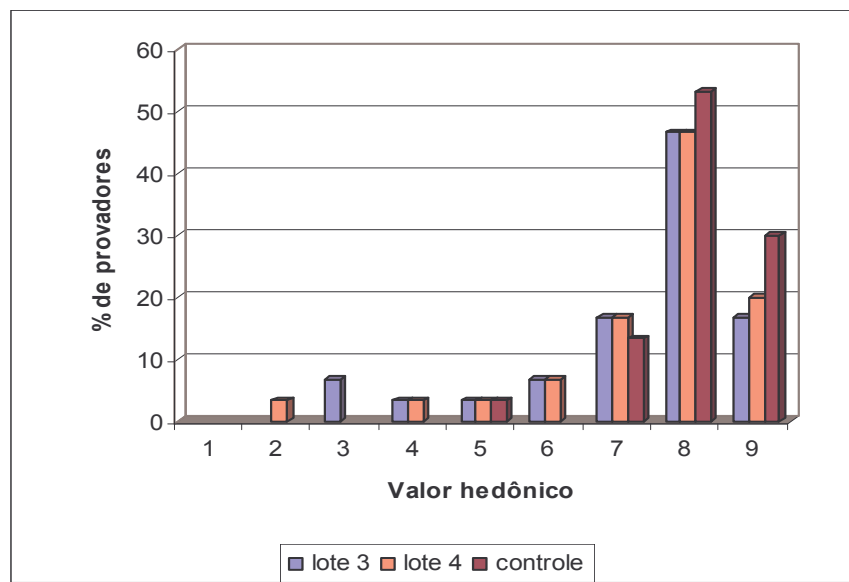
Histograma de frequência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 7 semanas.



Histograma de freqüência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 7 semanas.

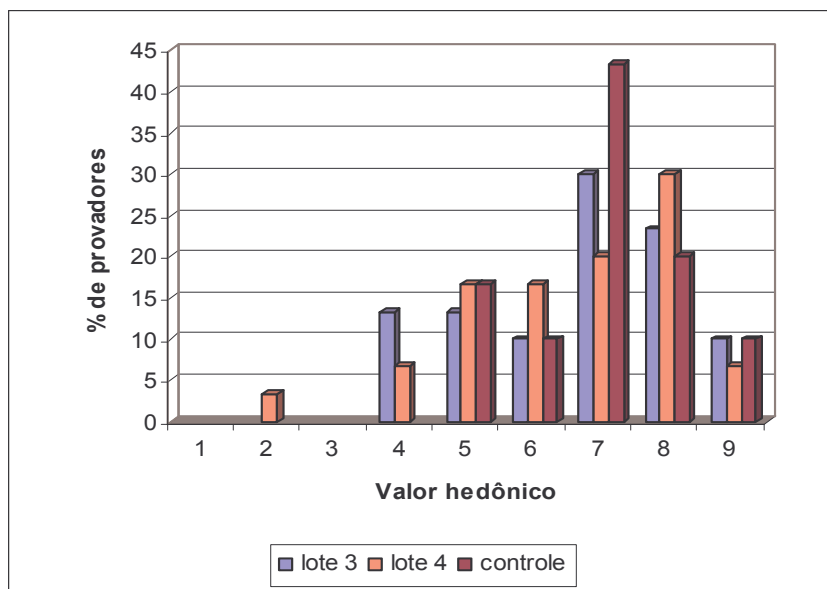


Histograma de freqüência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 7 semanas.

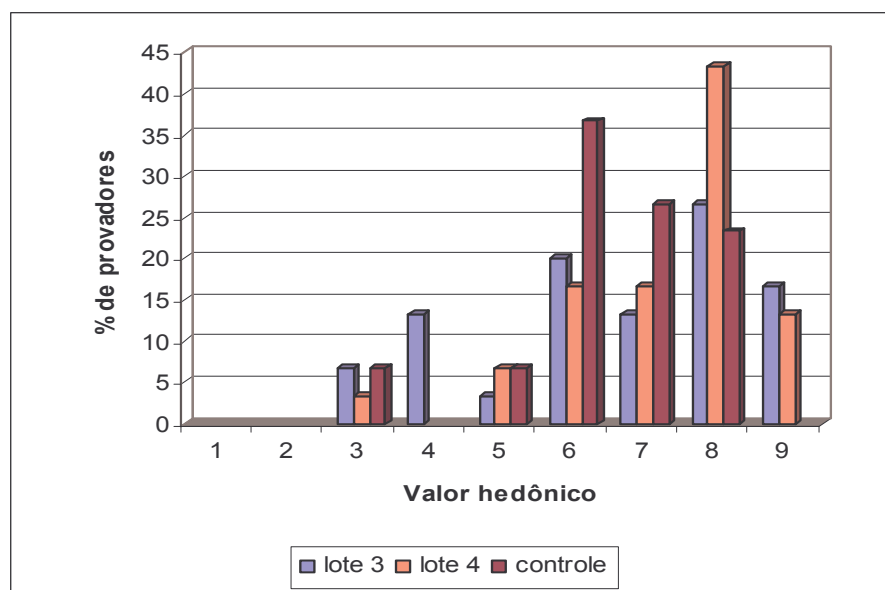




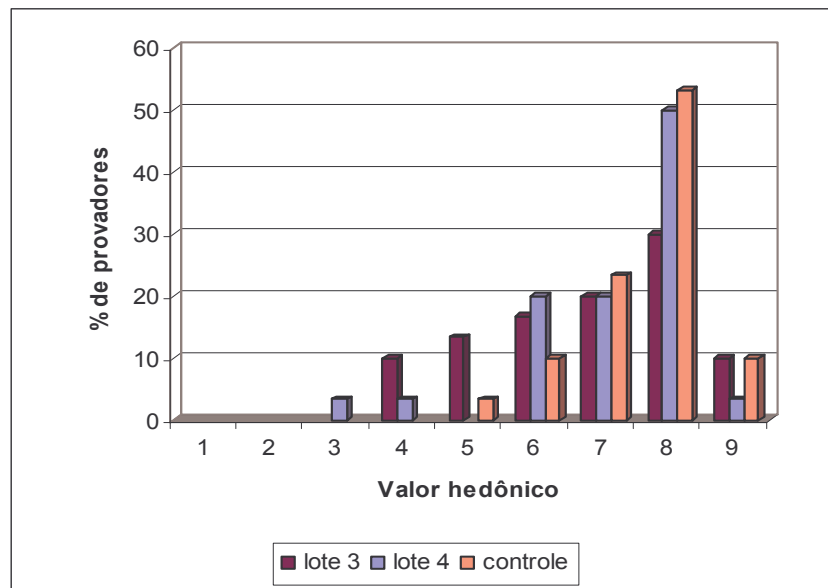
Histograma de frequência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 8 semanas.



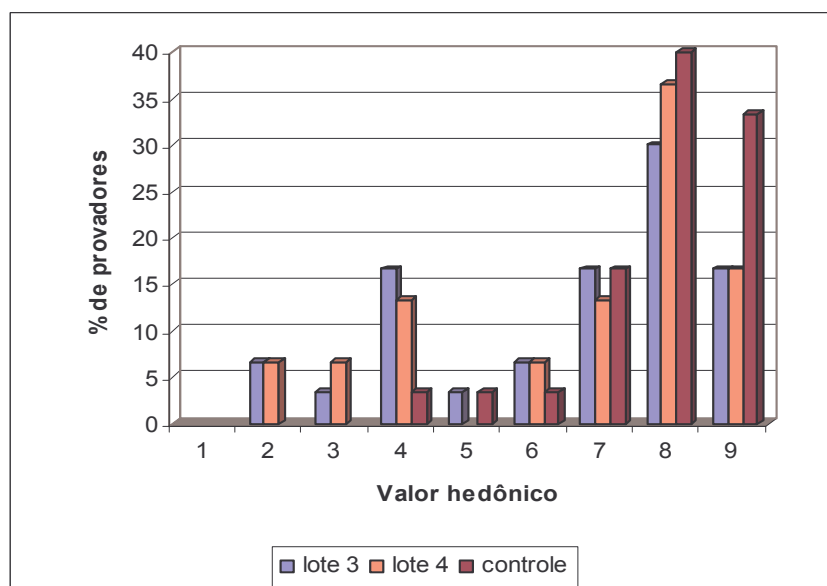
Histograma de frequência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 8 semanas.



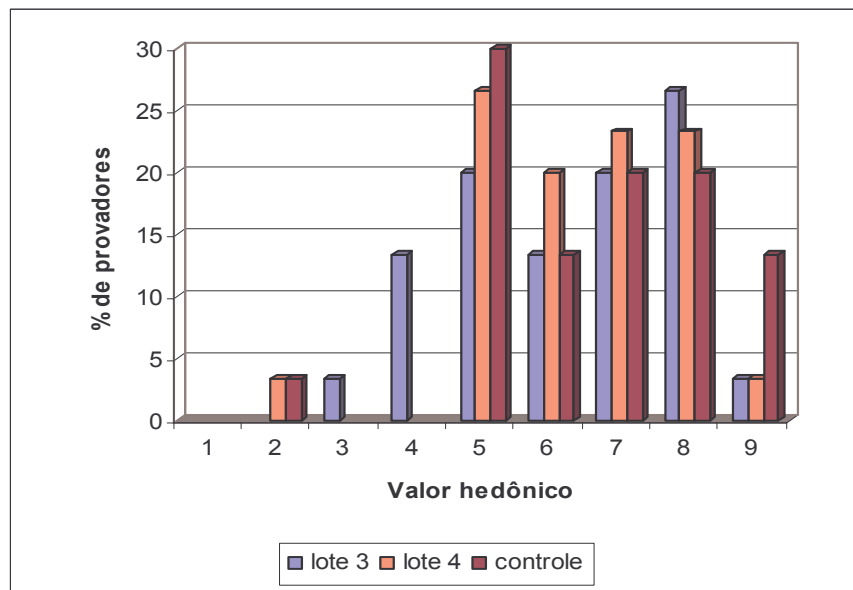
Histograma de frequência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 8 semanas.



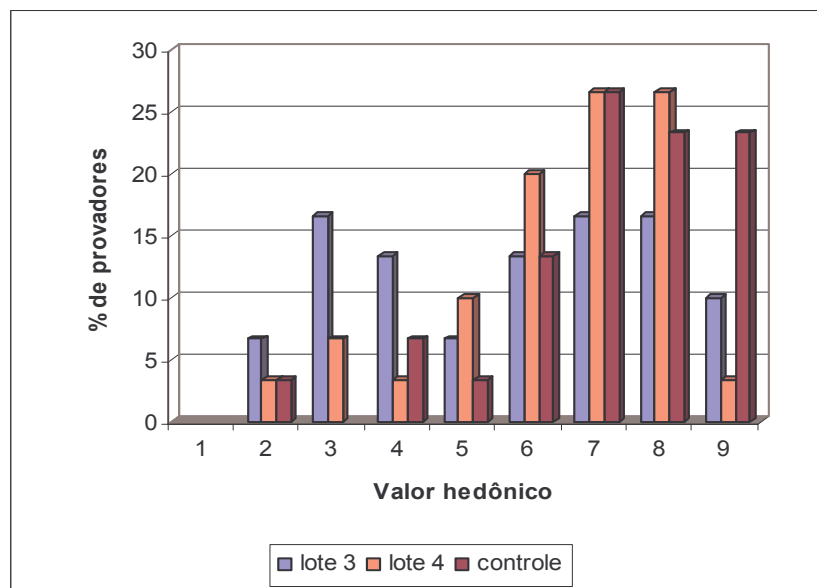
Histograma de frequência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 8 semanas.



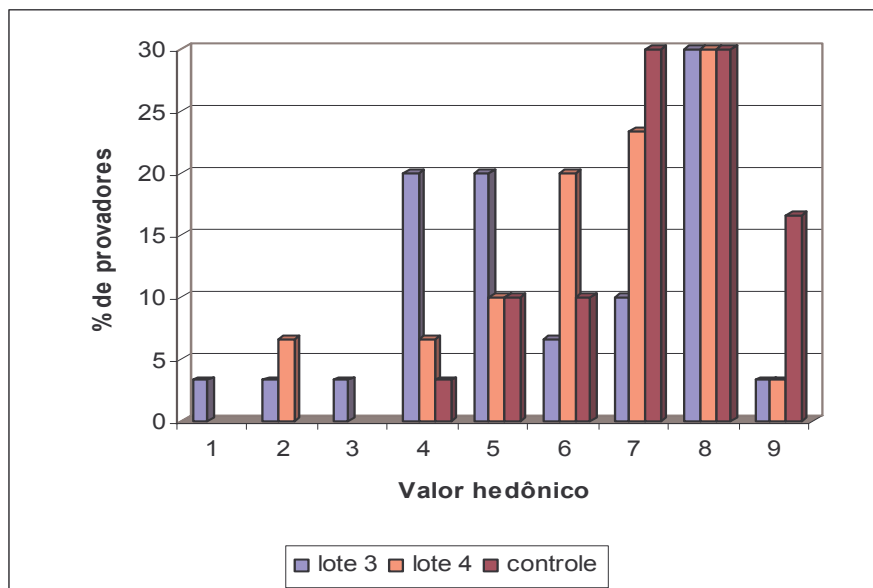
Histograma de freqüência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 9 semanas.



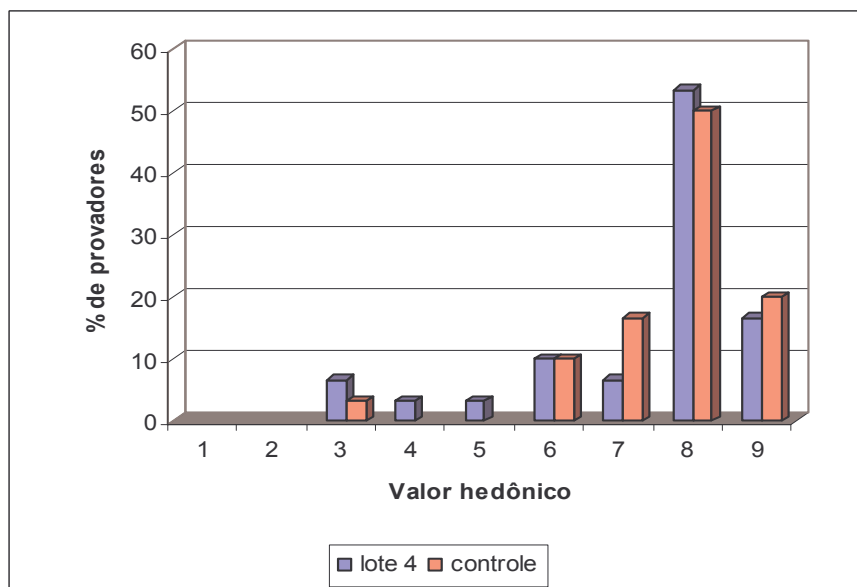
Histograma de freqüência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 9 semanas.



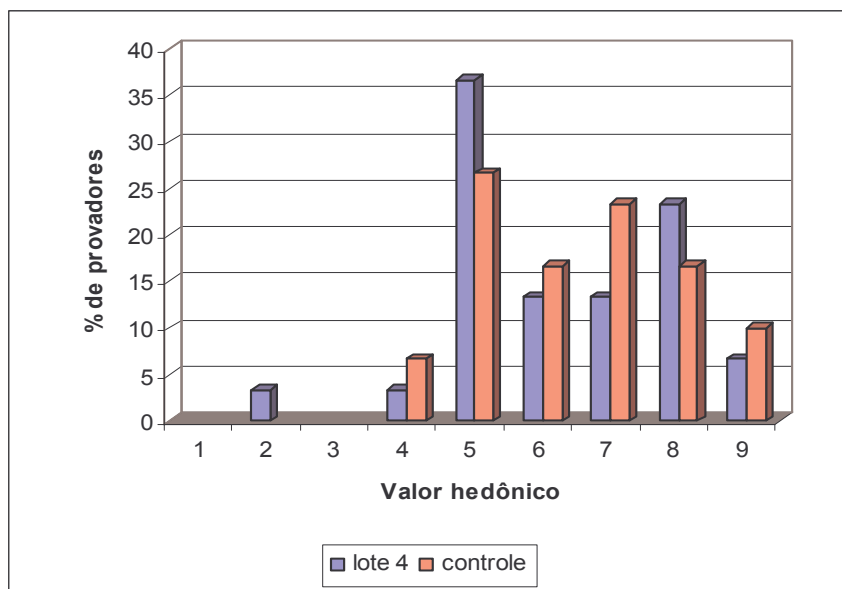
Histograma de frequência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 9 semanas.



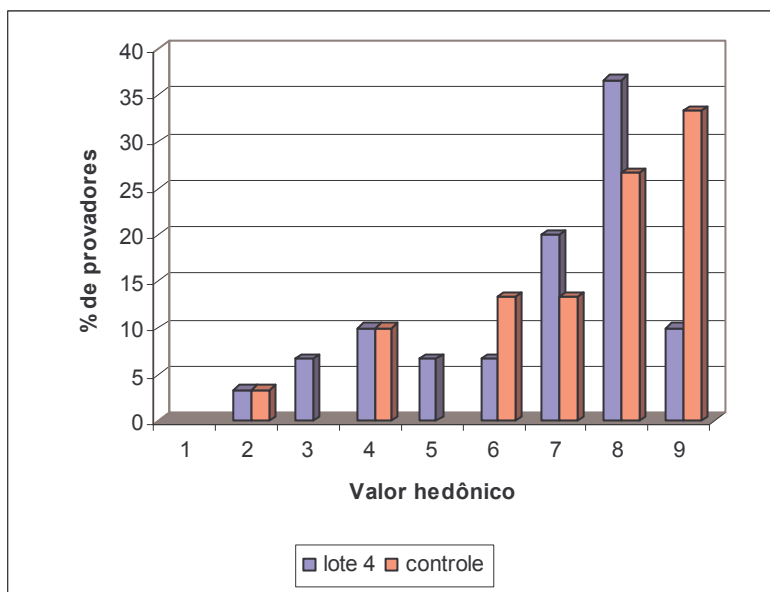
Histograma de frequência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 9 semanas.



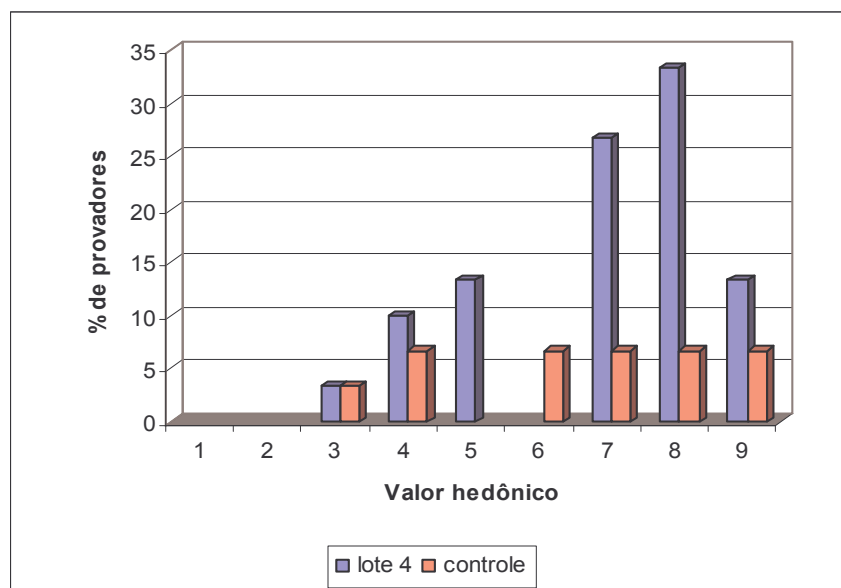
Histograma de frequência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 11 semanas.



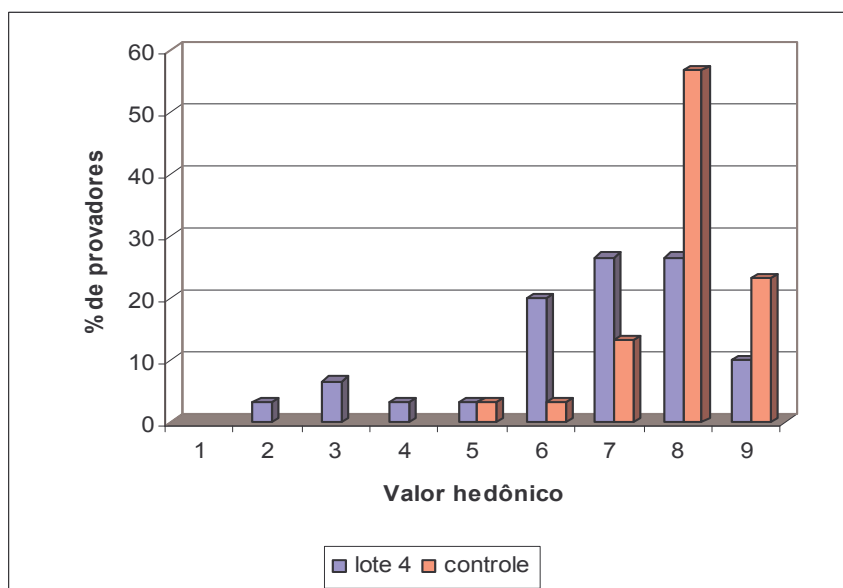
Histograma de frequência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 11 semanas.



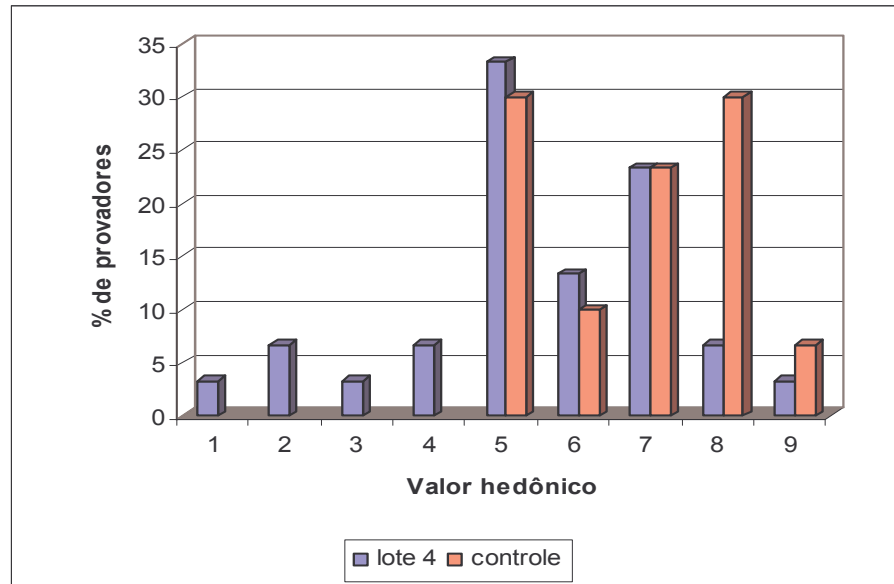
Histograma de freqüência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 11 semanas.



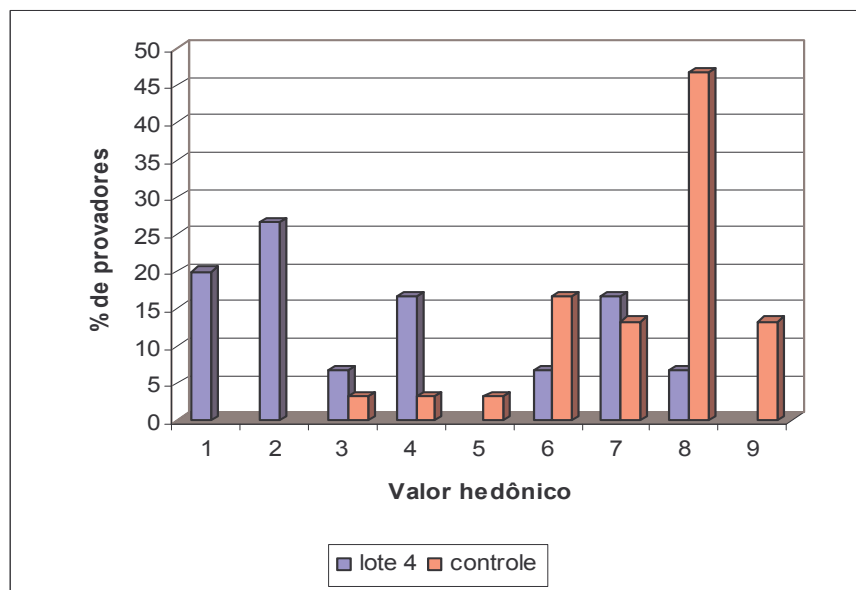
Histograma de freqüência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 11 semanas.



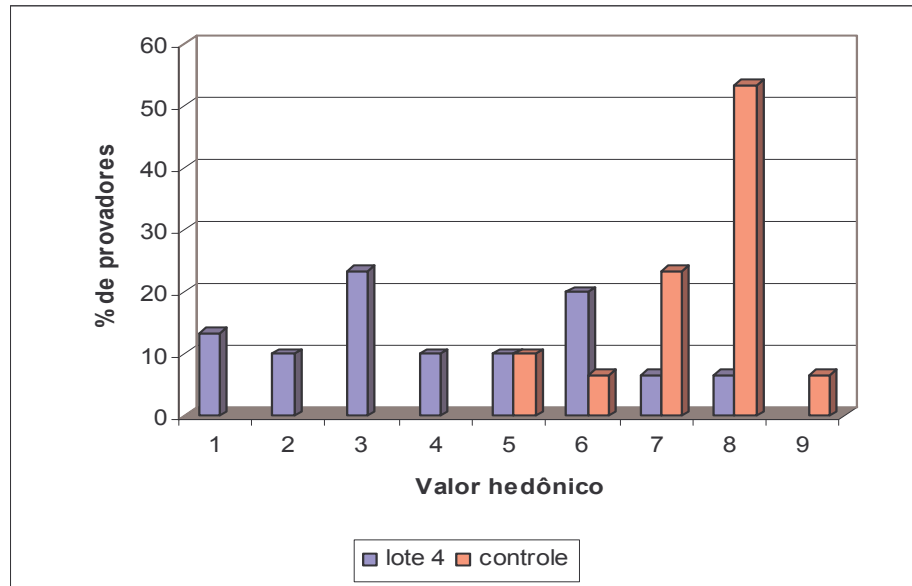
Histograma de frequência de notas para aparência no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 13 semanas.



Histograma de frequência de notas para aroma no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 13 semanas.

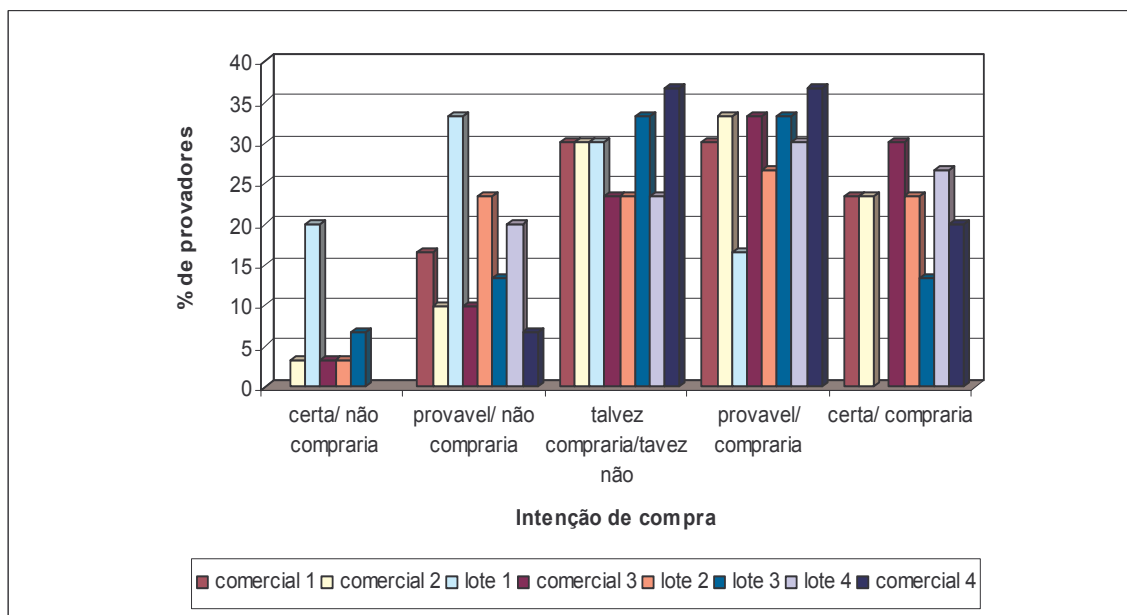


Histograma de freqüência de notas para sabor no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 13 semanas.



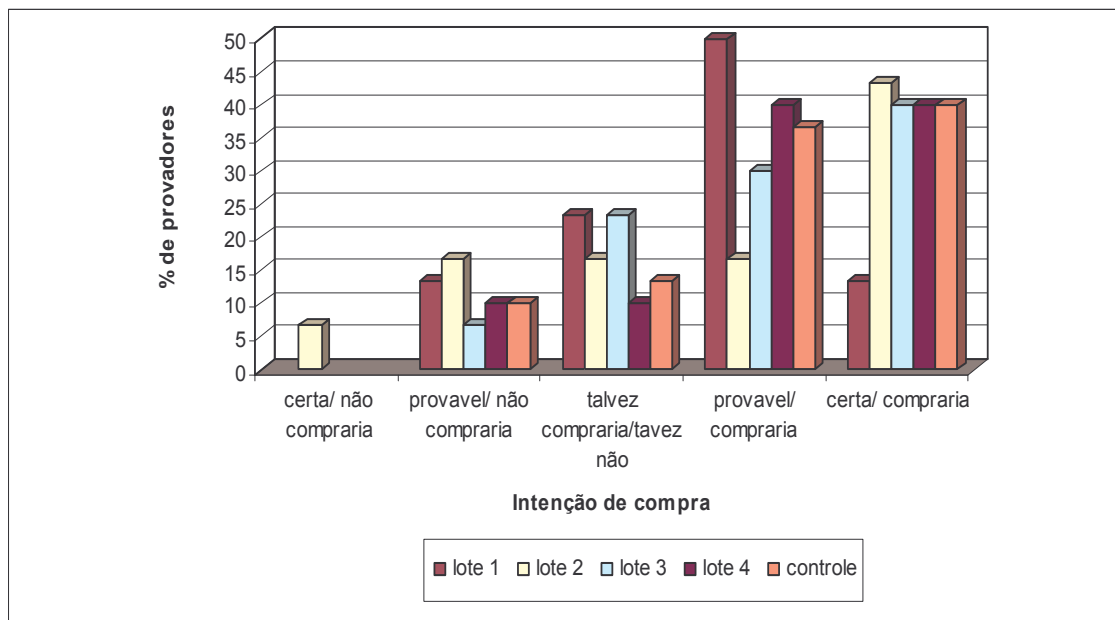
Histograma de freqüência de notas para impressão global no teste de aceitação do leite estocado a temperatura ambiente durante 13 semanas.

## Anexo 7 - Histogramas de intenção de compra dos provadores na avaliação sensorial do leite.

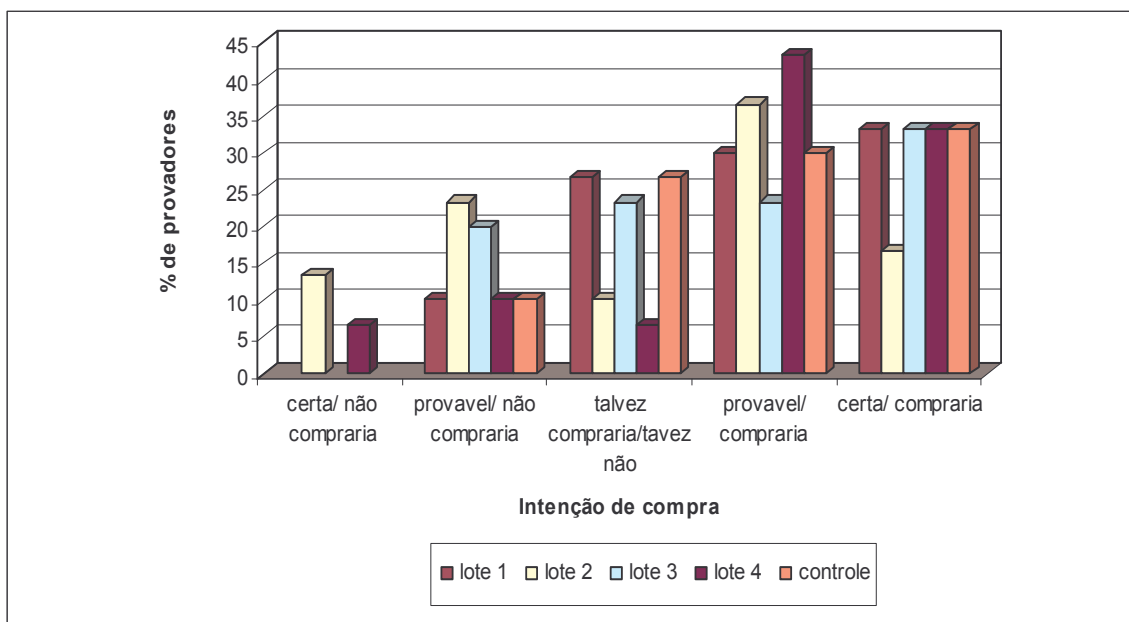




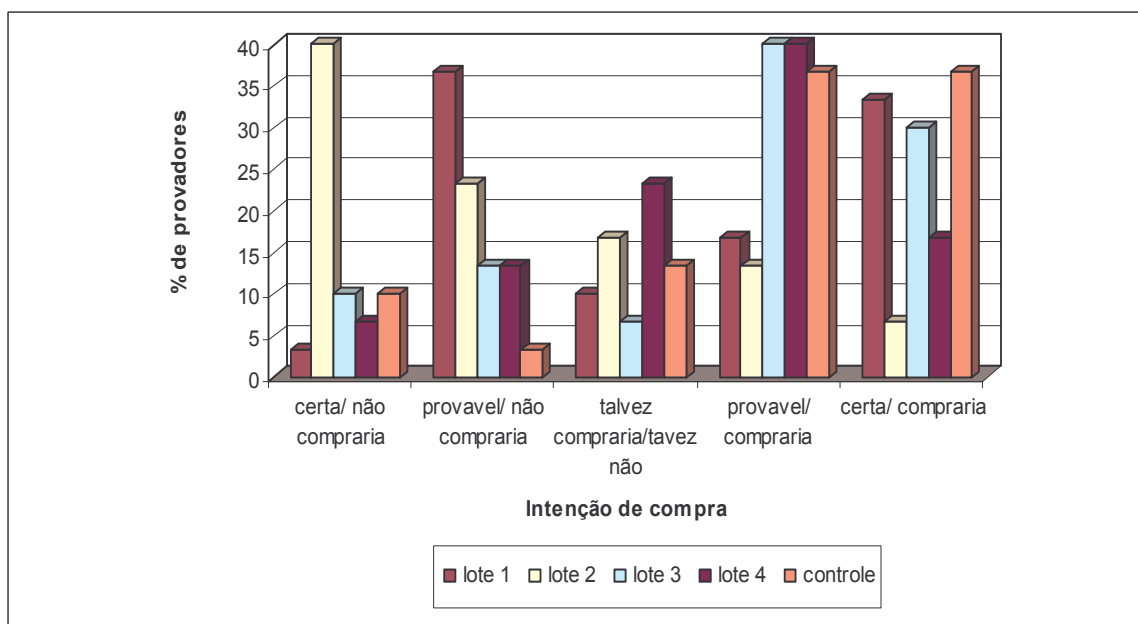
Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 2 semanas.



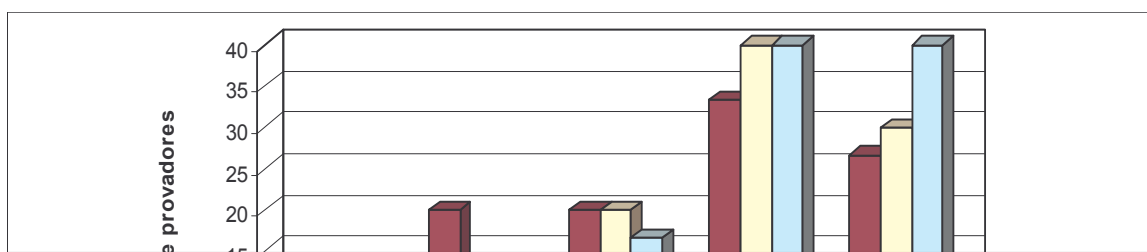
Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 3 semanas.



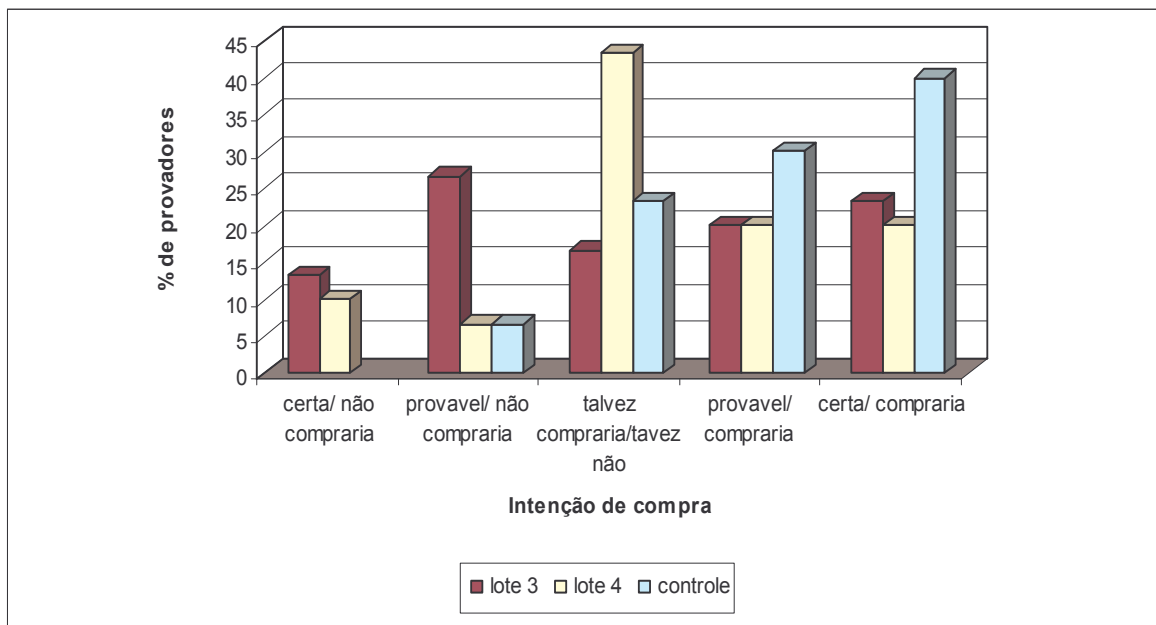
Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 4 semanas.



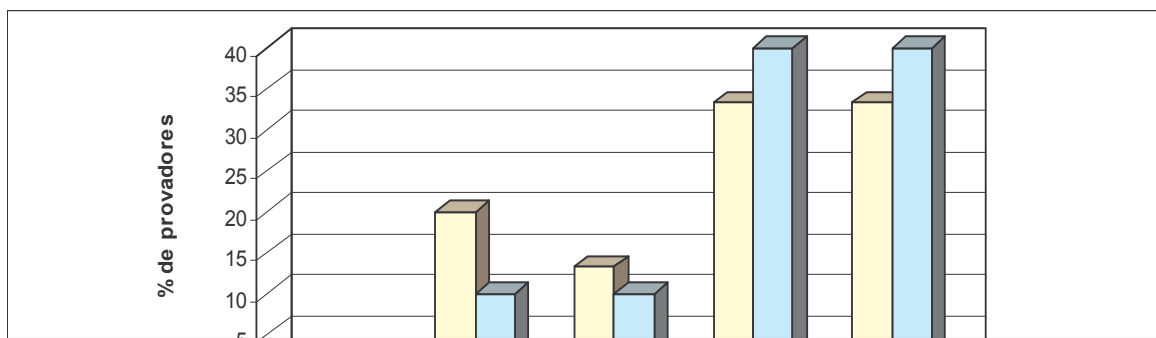
Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 7 semanas.



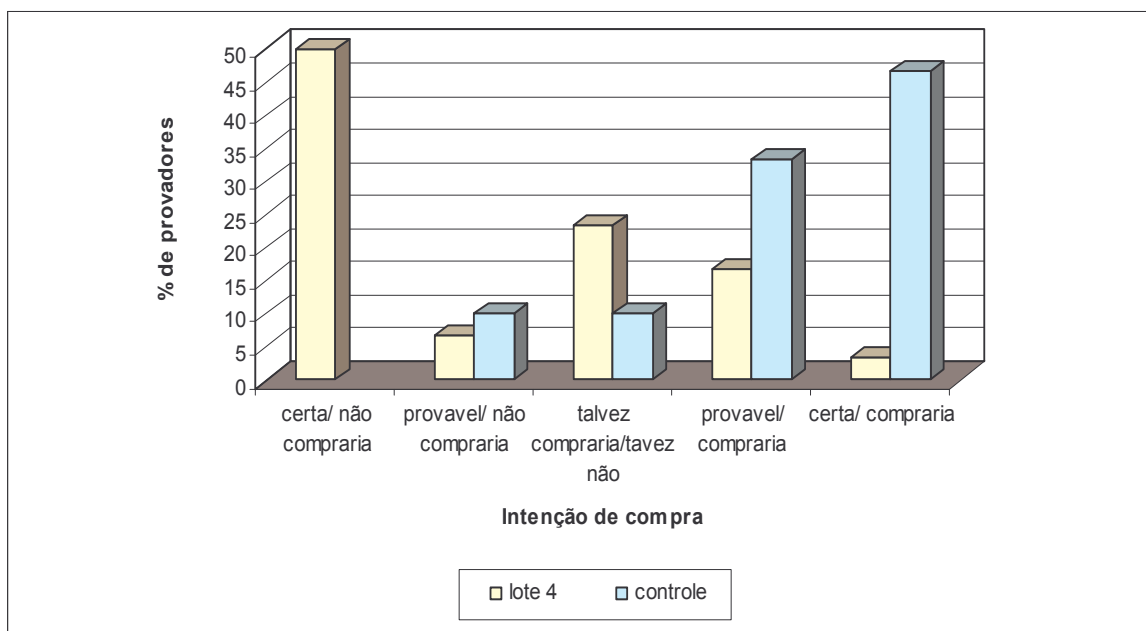
Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 8 semanas.



Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 9 semanas.



Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 11 semanas.



Histograma de intenção de compra do leite estocado a temperatura ambiente durante 13 semanas.