



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MECATRÔNICA  
MESTRADO EM MECATRÔNICA**

**RICARDO SANTOS NASCIMENTO**

**MONITORAMENTO DO PROCESSO DE AUTOCLAVAÇÃO DE  
ALIMENTOS ENLATADOS**

Salvador  
2010

**RICARDO SANTOS NASCIMENTO**

**MONITORAMENTO DO PROCESSO DE AUTOCLAVAÇÃO DE  
ALIMENTOS ENLATADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Mecatrônica da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Mecatrônica.

Orientador:

Prof. Carlos Arthur M. T. Cavalcante, Dr. Eng.

Co-Orientador:

Prof. Ricardo de Araújo Kalid, Dr. Eng.

Salvador  
2010

---

N244 Nascimento, Ricardo Santos

Monitoramento do processo de autoclavação de alimentos enlatados / Ricardo Santos Nascimento. – Salvador, 2010.

124 f. : il. color.

Orientador: Prof. Doutor Carlos Arthur M. T. Cavalcante

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2010.

1. Alimentos – Conservação. 2. Acondicionamento e conservação de alimentos. 3. Tecnologia química I. Cavalcante, Carlos Arthur M. T. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDD.: 660.7

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

RICARDO SANTOS NASCIMENTO

### MONITORAMENTO DO PROCESSO DE AUTOCLAVAÇÃO DE ALIMENTOS ENLATADOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Mecatrônica, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Carlos Arthur M. T. Cavalcante   
Doutor em Engenharia de Produção pela Universidade de São Paulo

Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque   
Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas

Pablo Rodrigo Fica Piras   
Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Salvador, 17 de dezembro de 2010

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

Aos meus pais Ginaldo e Edmary, pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta caminhada.

Ao meu irmão Alexandre pelo incentivo e apoio; e a todos que me acompanharam e ajudaram para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as bênçãos concedidas dia a dia.

Aos meus pais Ginaldo e Edmary, que sempre se esforçaram ao máximo para me propiciar a melhor formação possível e todo o apoio necessário, sem os quais eu não chegaria onde estou.

Aos professores Carlos Arthur e Ricardo Kalid, pela orientação, incentivo, paciência e por terem depositado confiança em mim para a conclusão deste trabalho.

À equipe do LABSIP – Laboratório de Sistemas Integrados de Produção, que foi um dos pilares para o início da minha carreira profissional.

Ao LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica, pela ajuda incondicional, disponibilizando grande parte dos recursos usados neste trabalho.

Aos professores, alunos e funcionários do curso de Eng. de Alimentos da UEFS, pela valiosa colaboração.

Aos Eng. Paulo Araújo ex-coordenador da Nossa Sopa, pelo apoio e pela doação das latas de sopa concentrada.

Ao colega de pós-graduação Leonardo Silva, pelo trabalho desenvolvido com o ANSYS.

Aos meus familiares pelo incentivo, apoio e compreensão de minha ausência.

A Maria Lúcia, pelas correções e sugestões à redação final.

Aos amigos, pelo apoio, incentivo, colaboração e pelas orações.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

## RESUMO

Visando calcular em tempo real o nível de esterilização térmica foi desenvolvido um sistema de monitoramento da temperatura do processo de autoclavação de um enlatado, avaliando-se em tempo real a esterilização. Os testes de autoclavação foram realizados em uma autoclave de 75L e o produto em análise foi uma sopa concentrada enlatada, com peso líquido de 3kg. O sistema de medição da temperatura usado no monitoramento foi composto por: um controlador lógico programável, sensores de temperatura, transdutores, software supervisor e um computador. A calibração dos sensores deste sistema foi realizada pelo método indireto, comparando-os com os valores de outro previamente calibrado. Um modelo bidimensional foi construído utilizando-se a técnica de elementos finitos, identificando assim a interferência do *head space* na determinação do ponto frio no produto. Experimentalmente, o ponto frio foi identificado a aproximadamente 60mm acima do fundo, equivalente a 36% da altura total. As propriedades térmicas do alimento utilizadas no modelo foram: condutividade térmica, calor específico, viscosidade, densidade e difusividade térmica – estes foram determinadas experimentalmente e os valores obtidos foram: 0,51J/(m.K.s),  $3,7 \cdot 10^3$ J/(kg.K), 18,83N.s/m<sup>2</sup>, 1052kg/m<sup>3</sup> e  $1,31 \cdot 10^{-7}$ m<sup>2</sup>/s, respectivamente. O cálculo da destruição térmica dos microorganismos foi programado no supervisor com base na equação de Arrhenius, adotando-se as constantes referentes ao *Geobacillus stearothermophilus* ( $k_0 = 7,94 \cdot 10^{38}$ /min e  $\Delta E = 287,44$ kJ/mol). O nível de destruição térmica, informado pelo programa, foi validado experimentalmente através de ciclos de esterilizações monitorados, na qual as amostras da sopa foram inoculadas com uma suspensão esporulada do *Geobacillus stearothermophilus*, adotado como microorganismo para o monitoramento devido a sua alta resistência ao processo de esterilização pelo calor úmido. Os resultados deste trabalho mostraram que o sistema de monitoramento foi capaz de prever de maneira satisfatória a destruição térmica dos microorganismos.

**Palavras-chave:** Esterilização, alimentos enlatados, autoclaves, cinética da destruição térmica, instrumentação, monitoramento digital.



## ABSTRACT

Aiming to calculate in real time the level of thermal sterilization has been developed a monitoring system temperature autoclave process for a canned, evaluating in real time the sterilization. The autoclave tests were conducted in an autoclave with capacity of 75L and the product in question was a canned condensed soup, with a net weight of 3kg. The measurement system used for tracking the temperature was composed of a programmable logic controller, temperature sensors, transducers, monitoring software and a computer. The calibration of sensors of this system was performed by the indirect method, comparing them with the values of another previously calibrated. A two-dimensional model was constructed using the finite element technique, thus identifying the interference of the headspace in the determination of the product cold spot. Experimentally, the cold spot was identified approximately 60mm above the bottom, equivalent to 36% of the total height. The thermal properties of food used in the model were: thermal conductivity, specific heat, viscosity, density and thermal diffusivity - these were determined experimentally and the values obtained were: 0.51J/(m.K.s),  $3.7 \cdot 10^3$ J/(kg.K), 18.83N.s/m<sup>2</sup>, 1052kg/m<sup>3</sup> e  $1.31 \cdot 10^{-7}$ m<sup>2</sup>/s, respectively. Calculation of thermal destruction of microorganisms has been programmed into supervisory based on Arrhenius equation, adopting the constants for the *Geobacillus stearothermophilus* ( $k_o = 7,94 \cdot 10^{38}$ /min e  $\Delta E = 287,44$ kJ/mol). The level of thermal destruction, informed by the program, was experimentally validated through sterilization cycles monitored, in which samples of the soup were inoculated with a spore suspension of *Geobacillus stearothermophilus*, adopted as a microorganism for monitoring because of its high resistance to the process of sterilization by moist heat. These results show that the monitoring system was able to predict satisfactorily the thermal destruction of microorganisms.

**Keywords:** Sterilization, canned, autoclaves, kinetics of thermal destruction, instrumentation, digital monitoring.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Autoclave de Chamberland. ....	7
Figura 2 – Processo de esterilização. (a) Envase, (b) recravação e (c) autoclave vertical. ....	10
Figura 3 – Fluxograma do processamento de alimentos enlatados. ....	10
Figura 4 – Representação esquemática da variação de temperatura durante a esterilização por processo descontínuo. ....	11
Figura 5 – Representação esquemática do número de microorganismos vivos ( $N$ ), após um tempo $t$ de manutenção do meio a uma temperatura letal ( $T_i$ ). ....	13
Figura 6 – Variação da temperatura do meio com o tempo durante a esterilização. ....	15
Figura 7 – Indicadores Químicos, fita auto-adesiva: (a) Muda de coloração de azul para rosa em presença de peróxido de hidrogênio; (b) A cor muda de branco para preto em esterilização a vapor saturado. ....	20
Figura 8 – IB Primeira Geração. Frascos com o meio de cultura e envelopes contendo tiras de papel impregnadas com esporos. ....	23
Figura 9 – Indicadores Biológico, auto-contido, Segunda Geração: (a) ATTEST 3M; B) BIOTECH; C) ESTERITESTE-CPPI. ....	24
Figura 10 – Incubadora para IB Terceira Geração. ....	24
Figura 11 – Áreas de medidas biológicas em função do número de sobreviventes ao processo por unidade. ....	30
Figura 12 – Nodalização típica de um sistema embalagem cilíndrica. ....	32
Figura 13 – Sistema de medição. Figura modificada . ....	34
Figura 14 – Fluxograma do trabalho. ....	39
Figura 15 – Lata de 3kg de sopa concentrada. ....	41
Figura 16 – Gráfico do logaritmo da diferença de temperatura em função do tempo. ....	42
Figura 17 – (a) Célula de Dickerson; (b) sistema usado na determinação da difusividade. ....	44
Figura 18 – (a) Autoclave vertical; (b) detalhe da adaptação para passagem dos sensores. ....	46
Figura 19 – Válvula construída para passagem dos fios dos sensores. a) foto real, b) desenho do corte axial válvula aberta e c) desenho do corte axial válvula fechada. ....	47
Figura 20 – Sensor usado para medir a temperatura. (a) Termopar tipo J (b) Termoresistor Referência PT-100 de três fios e (c) Termoresistor PT-100 de três fios, com cabeçote. ....	49
Figura 21 – Características da resistência do PT-100 . ....	50
Figura 22 – Transmissor de temperatura. ....	51
Figura 23 – Tela de configuração do transmissor. ....	52
Figura 24 – (a) CLP; (b) Sistema de aquisição de dados interligados, composto pela fonte de energia, CLP e transdutor, mostrado da esquerda para a direita. ....	53
Figura 25 – Tela principal do supervisório Eclipse Scada. ....	55
Figura 26 – Tela secundária do supervisório Eclipse Scada. ....	56

Figura 27 – Calibração Indireta de um sistema de medição.....	57
Figura 28 – Calibrador de Temperatura da Prime Lab.....	58
Figura 29 – Janela de configuração da escala do indicador de temperatura no supervisório Elipse.....	59
Figura 30 – Indicador de temperatura no supervisório Elipse.....	59
Figura 31 – Posicionamento dos termopares na esterilização da lata.....	60
Figura 32 – Recipiente para monitoramento de temperatura e validação do modelo de destruição térmica.....	61
Figura 33 – (a) Inoculação dos esporos na sopa para ser esterilizada; (b) Capela adaptada próximo ao local de trabalho. ....	62
Figura 34 – (a) Lupa para contagem de placas; (b) placa com colônias do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> sendo contada. ....	63
Figura 35 – Curva da análise de penetração de calor. ....	67
Figura 36 – Curva característica da determinação da difusividade térmica.....	68
Figura 37 – Curva de erros do termopar nº1. ....	74
Figura 38 – Curva de erros do termopar nº2. ....	75
Figura 39 – Curva de erros do termopar nº3. ....	76
Figura 40 – Modelo bidimensional da transferência de calor na lata, a) sem <i>head space</i> , b) com <i>head space</i> . ....	79
Figura 41 – Representação da distribuição da temperatura no eixo axial da lata, na fase de resfriamento.....	80
Figura 42 – Perfil da temperatura no processo de esterilização.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constantes cinéticas da inativação de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	17
Tabela 2 – Valores de constante de referência e energia de ativação.....	18
Tabela 3 – Valores para tempo de manutenção em diferentes temperaturas para obter a mesma ordem de letalidade.....	19
Tabela 4 – Composição nutricional na embalagem do produto .....	40
Tabela 5 – Composição centesimal da sopa concentrada.....	64
Tabela 6 – Densidade da sopa concentrada.....	69
Tabela 7 – Graus de liberdade para incerteza do Tipo B, segundo critérios de qualidade da informação.....	71
Tabela 8 – Tabela de calibração do sistema de medição do primeiro termopar.....	74
Tabela 9 – Tabela de calibração do sistema de medição do segundo termopar .....	75
Tabela 10 – Tabela de calibração do sistema de medição do terceiro termopar .....	76
Tabela 11 – Parâmetros usados no modelo de transferência de calor.....	78
Tabela 12 – Distribuição da temperatura no eixo axial da lata, na fase de resfriamento.....	79
Tabela 13 – Resultados das esterilizações monitoradas.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Difusividade térmica do alimento
$A_q$	Taxa de aquecimento do banho da célula de Dickerson
$A'$	Constante empírica da equação de Bigelow
$a$	Erro de arredondamento
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
$B'$	Constante empírica da equação de Bigelow
b	Volume de Branco
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C	Valor da correção
$C_C$	Correção combinada
$c_p$	Calor específico
$CCal$	Correções levantadas na calibração
CLP	Controlador Lógico Programável
CV	Coefficiente de variação
DP	Desvio padrão
$E_{máx}$	Erro máximo
F	Fator de diluição
$F_o$	Tempo de letalidade
f.e.m.	Força eletro motriz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fh	Penetração de calor
Gij	Condutância térmica entre os nós
GUM	<i>Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement</i>
h	Cota na direção vertical no cilindro
$H_e$	Altura da embalagem
HTST	<i>High Temperatures for Short Time</i>
IB	Indicador Biológico
K	Constante de velocidade de destruição térmica do microorganismo
k	Condutividade térmica
$k_o$	Constante empírica da equação de Arrhenius

$k_a$	Fator de abrangência
$k_F$	Número de diluições
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
MEF	Método de Elementos Finitos
MP	Média da temperatura padrão
$m_a$	Fração mássica de água
$m_c$	Fração mássica de carboidratos
$m_g$	Fração mássica de gorduras
$m_p$	Fração mássica de proteínas
$m_z$	Fração mássica de cinzas
$N$	Número de microorganismos vivos após a esterilização
$N_o$	Número de microorganismos iniciais
NCA	<i>National Cannery Association</i>
$P_w$	Percentual de umidade do produto
POP	Procedimento Operacional Padrão
PTC	<i>Positive Temperature Coefficient</i>
PUNE	Probabilidade de Unidades Não Estéreis
$R$	Constante universal dos gases perfeitos
$r$	Cota na direção radial no cilindro
$R_c$	Raio da célula de Dickerson
$R_e$	Raio da embalagem
$Re$	Repetitividade do medidor
$Rm$	Resolução do medidor
RM	Resultado da medição
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>
SCADA	<i>Supervisory Control and Data Acquisition</i>
SMC	Sistema de medição a calibrar
SMP	Sistema de medição padrão
$T$	Temperatura
$t$	Tempo
$T_e$	Temperaturas de esterilização
$T_f$	Temperatura final
$T_i$	Temperatura inicial

$T_m$	Temperatura mínima letal
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
u	Incerteza
$u_C$	Incerteza combinada
$u_{CCal}$	Incerteza-padrão da correção de calibração
$u_R$	Incerteza-padrão do erro de arredondamento
$u_{Re}$	Incerteza-padrão da repetitividade
U	Incerteza expandida
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VFE	Valor de Fundo de Escala
$v_{CCal}$	Grau de liberdade da correção de calibração
$v_R$	Número de graus de liberdades do erro
w	Incerteza padronizada relativa
wF	Incertezas das diluições
wL	Incerteza da leitura
wp	Incerteza da confirmação
wv	Incertezas das medições volumétricas
wz	Dispersão de Poisson
y	Resultado para contagem em membrana e Pour Plate
z	Contagem de colônias nos ensaios microbiológicos
$\Delta E$	Energia de ativação de destruição térmica do microorganismo
$\alpha$	Coefficiente angular
$\theta$	Tempo de esterilização
$\rho$	Densidade relativa
$v_{ef}$	Número de graus de liberdade efetivos
$v_{Re}$	Número de graus de liberdades da repetitividade

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	1
1.2. OBJETIVO DO TRABALHO .....	6
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
2.1. ESTERILIZAÇÃO .....	7
2.1.1. Cinética da destruição térmica de microorganismos.....	12
2.1.2. Nível de esterilização .....	15
2.1.3. Monitorização do processo de esterilização.....	19
2.1.4. O <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (ATCC 7953) .....	25
2.1.5. O <i>Clostridium botulinum</i> .....	26
2.1.6. Método de contagem dos sobreviventes a partir dos Indicadores Biológicos.....	27
2.2. MODELO MATEMÁTICO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR.....	30
2.3. INCERTEZA DAS MEDIÇÕES .....	33
2.3.1. Medição de Incerteza em contagem de placa.....	35
<b>3. MATERIAL E METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
3.1. FLUXOGRAMA DO TRABALHO .....	39
3.2. MATÉRIA PRIMA .....	39
3.2.1. Composição centesimal.....	41
3.2.2. Propriedades térmicas.....	41
3.2.3. Densidade .....	41



3.2.4. Penetração de Calor.....	42
3.2.5. Difusividade .....	42
3.3. MICROORGANISMO UTILIZADO .....	44
3.3.1. Preparo das suspensões de esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	45
3.4. EQUIPAMENTO PARA MONITORAMENTO DA TEMPERATURA .....	45
3.4.1. Autoclave.....	45
3.4.2. Sensores de temperatura.....	47
3.4.3. Transmissor de temperatura .....	51
3.4.4. Controlador Lógico Programável (CLP).....	53
3.4.5. Sistema Supervisório.....	53
3.4.6. Calibração e Ajuste do Sistema de Medição .....	56
3.5. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA NO INTERIOR DA EMBALAGEM.....	59
3.6. MODELO DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA .....	60
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>64</b>
4.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	64
4.2. PROPRIEDADES TÉRMICAS .....	65
4.2.1. Condutividade Térmica (k) .....	65
4.2.2. Calor Específico (cp).....	65
4.2.3. Penetração de Calor (fh).....	66
4.2.4. Difusividade ( $\alpha$ ).....	67
4.3. DENSIDADE .....	68
4.4. CALIBRAÇÃO E AJUSTES DOS TERMOPARES.....	69
4.4.1. Termopar 1 .....	74
4.4.2. Termopar 2 .....	75
4.4.3. Termopar 3 .....	76
4.5. MODELO DO PERFIL DE TEMPERATURA .....	77
4.5.1. Perfil de Temperatura no Processo de Esterilização .....	80
4.6. VALIDAÇÃO DO MODELO DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA.....	81
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>84</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>85</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Desde a pré-história, a necessidade de armazenar alimentos para o período de entressafra levou o homem a desenvolver técnicas para preservá-lo e, à medida que as populações foram se desenvolvendo, surgiu a necessidade dos alimentos estarem disponíveis aos consumidores com qualidade, velocidade, quantidade e com preço acessível (ROJA JÚNIOR, 2008)

Estas necessidades deram origem ao desenvolvimento das tecnologias de processamento e conservação. Certamente, o advento das guerras e as mudanças no modo de vida da sociedade foram fatores determinantes para o aparecimento de novas técnicas e materiais utilizados na preservação de alimentos (PINHO, 2003).

Muitos dos processos de conservação de alimentos não são novos, pois há muito se conhece que a salga e a defumação como métodos eficientes de conservação. No descobrimento do Brasil a história descreve sobre os primeiros aditivos de alimentos: as especiarias (pimenta, cravo, canela etc.) que os portugueses traziam da Índia (ORDÓÑEZ et al., 2005). Segundo Gava (1986) os egípcios e romanos tinham conhecimento dos efeitos preservativos do sal, da dessecação e da defumação.

Nas escrituras sagradas comenta-se que os israelitas, na fuga do Egito, já tinham o conhecimento da técnica de preservação do alimento pelo calor, ao descrever que o alimento deveria ser assado no forno ou cozido, e então armazenado para ser consumido no dia seguinte, e dessa forma o alimento não cheiraria mal e nem criaria bichos (ALMEIDA, 1996, Pv. 16:23,24).

Alimentos termo-processados, embalados hermeticamente e comercializados à temperatura ambiente, são uma categoria de produto de alto risco de Segurança de Saúde Pública, principalmente no caso de produtos de baixa acidez cujo pH é superior a 4,5 (ORDÓÑEZ, et al. 2005), que, quando mal processados, podem gerar casos de botulismo alimentar (GONÇALVES et al., 1995; TOLEDO, 2007). Os produtos de baixa acidez incluem a grande maioria dos alimentos “enlatados” e “de caixinha” como: milho, palmito, cogumelos, leite “longa vida”, atum, sopas e feijoadas.

O botulismo é uma enfermidade que resulta da ação de uma potente neurotoxina de origem protéica, produzida pelo *Clostridium botulinum*, normalmente decorrente da ingestão de alimentos contaminados. O *C. botulinum* é um microorganismo que se desenvolve em meio anaeróbio (alimentos enlatados) e pouco ácido, encontrado com frequência no solo, em legumes, verduras, frutas, sedimentos aquáticos e fezes humanas (GELLI, 2002; SCARCELLI e PIATTI, 2002).

As conservas caseiras constituem o maior risco para o ser humano, em razão dos procedimentos inadequados para a preparação dos alimentos. A primeira epidemia de botulismo do Brasil ocorreu em 1958, no Estado do Rio Grande do Sul, em que nove pessoas morreram após consumirem conserva caseira de peixe (CERESER, 2008). Nos Estados Unidos, inúmeros alimentos têm sido associados aos surtos de botulismo, no entanto, há predominância das conservas de vegetais como feijão, pimentão, cenoura e milho (STEPHEN, 2001).

Segundo Berto e Vitali (2008), alimentos termo-processados, cujo pH se situe entre 4,5 e 8,9 e que estejam contidos em embalagens completamente livres de oxigênio, considerados como potencialmente botulogênicos, devem ser tratados por procedimentos capazes de evitar a multiplicação dos microorganismos e conseqüente produção de toxinas do *Clostridium botulinum* nos alimentos.

Esses procedimentos para conservação dos alimentos enlatados começou em 1795, quando o governo Francês ofereceu um prêmio de 12000 francos para quem inventasse um método para conservação de alimentos. De acordo com relatos históricos, as tropas de Napoleão estavam sendo arrasadas mais pela fome e pelas doenças relacionadas ao alimento, do que pelo próprio combate. As conquistas militares e a expansão colonial demandavam alternativas em que o transporte dos alimentos tivesse um maior tempo de conservação (ABRALATAS, 2010).

As técnicas de conservação de alimentos pela aplicação de calor, em embalagens herméticas, ganharam maior interesse após a publicação do primeiro livro sobre o assunto em 1810 na França, quando Nicolas Appert descreveu os primeiros métodos para o tratamento térmico dos alimentos (BERRY e PFLUG, 2003). O processo desenvolvido pelo autor que lhe mereceu um prêmio oferecido por Napoleão Bonaparte, consistia inicialmente em processar alimentos em garrafas de vidro fechadas com rolhas, em banho de água fervente. Amostras com comidas preservadas por esse método foram enviadas para o mar por mais de quatro meses, carnes e vegetais estavam entre os 18 itens diferentes em recipientes de vidro, todos

retiveram seu frescor e nenhuma substância passou por mudanças substanciais. A partir disto, o processo então conhecido como apertização, devido ao seu inventor chamado Nicolas Appert, mereceu o interesse da indústria e com ele a procura por novos métodos e materiais. (ROJA JÚNIOR, 2008; ABRALATAS, 2010).

A primeira lata surgiu na Inglaterra em 1823 e possuía um pequeno orifício no topo, o qual era rosqueado com uma tampa. Em 1900, surgia a primeira lata de três peças recravadas. A indústria de latas ganhou grande impulso desde então e detém hoje uma grande porção do mercado de alimentos (ROJA JÚNIOR, 2008), com a maior participação destinada para vegetais em conservas e peixes enlatados (ABRE, 2010b), desconsiderando as bebidas enlatadas. No Brasil a participação de cada segmento na indústria de embalagem, comparado ao ano de 2009, destacou o crescimento do mercado de embalagens metálicas, que saltaram de 17,6% para 26,6% (ABRE, 2010c). Sendo predominante sua atuação no setor de alimentos, com uma participação de aproximadamente 32% entre os demais tipos de embalagens, a saber: plástico, papel e vidro (ABRE, 2010a).

Uma pesquisa realizada nos Estados Unidos comprova que 68% dos consumidores acreditam que embalagens enlatadas oferecem uma maior segurança alimentar por serem invioláveis (CMI, 2010). No entanto a segurança alimentar não se baseia apenas na prevenção de contaminantes externo, mas da eliminação da contaminação interna, proveniente do produto ou da embalagem. Para uma maior segurança o produto enlatado deve passar por um processo de esterilização, monitorados por métodos consagrados nas indústrias de alimentos, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, APPCC (GIOVA, 1997) e Boas Práticas de Fabricação, BPF (GIORDANO e SANTANA, 1995), assim também como protocolos prescritos pela *Food and Drug Administration* (FDA). Nestes casos, a garantia de sua segurança é realizada pela monitoração e controle das variáveis críticas pertinentes, como a temperatura mínima do meio de aquecimento (temperatura da autoclave) e o tempo mínimo de processo.

O processo de esterilização por calor, aplicado pela primeira vez por Nicholas Appert em 1810, foi um dos maiores avanços na preservação dos alimentos. Desde então, muitos avanços foram feitos nos procedimentos de esterilização por calor e hoje o enlatamento seguido de processamento térmico ainda é considerado o método mais efetivo de preservação de alimentos. O tempo requerido para o processo de esterilização depende da característica do produto, do tipo e do tamanho do recipiente, bem como da forma de aquecimento (GHANI et al., 1999)

Na maioria dos produtos enlatados, a transferência de calor ocorre de maneira muito lenta, especialmente quando não existem correntes de convecção. Como consequência, para que o ponto frio do alimento atinja o valor de esterilização desejado, o mesmo é aquecido na autoclave de maneira muito mais intensa na periferia do que seria necessário para que a esterilidade comercial fosse atingida, resultando em perdas consideráveis de fatores de qualidade. Ocorrem alterações de cor, sabor, textura e os nutrientes mais termolábeis são destruídos por degradações químicas que são induzidas pelo tratamento térmico. Esta degradação reduz o valor nutritivo do produto, sendo que o cozimento doméstico também provoca perdas adicionais. Desta forma, o consumidor ingere apenas uma pequena fração dos nutrientes originalmente presentes no produto fresco. Além disso, as alterações organolépticas são tão grandes que freqüentemente o produto processado é totalmente diferente do produto fresco (PINHO, 2003; CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998).

O objetivo da esterilização de alimentos enlatados, é a destruição ou inativação de toda forma de vida presente no produto, especialmente microorganismos incluindo bactérias, fungos (tanto na forma vegetativa quanto esporuladas) e vírus (BORZANI et al., 2001). O grau de eliminação dos contaminantes varia conforme o caso.

Com o avanço tecnológico e recursos computacionais é possível a implementação de um sistema que possa identificar o comportamento da temperatura, no ponto frio, do produto e calcular o grau de eliminação dos microorganismos durante todo o processo de esterilização. Dessa forma é possível eliminar os riscos para a saúde do consumidor com a menor perda de qualidade do produto. A utilização de tais sistemas de monitoramento, em tempo real, também permite a otimização do processo, validando os binômios  $T \times t$  (temperatura *versus* tempo) a um nível de esterilização requerida.

Existem vários trabalhos publicados que apresentam análise de validação processo de esterilização em alimentos. Na maioria deles constam modelos matemáticos, que utilizam a técnica de elementos finitos para avaliar o comportamento térmico dos alimentos enlatados (SANTOS FILHO E PENNA, 2003; PINHO, 2003; GHANI et al., 1999; BERTO e VITALI, 2008; CRISTIANINI, 1998; AGUIAR, 2002). Em alguns trabalhos foram elaborados softwares que simulam a distribuição da temperatura (TAMEGA JÚNIOR, 2005; PINHO, 2003; BERTO e VITALI, 2008), em outros, porém, a identificação do ponto frio foi simplificada com o monitoramento da temperatura no centro geométrico da lata, obtendo resultados satisfatórios (SANTOS FILHO e PENNA, 2003).

Dentre os trabalhos pesquisados, com propostas similares na área de esterilização de alimentos, identificou-se que a resolução do tempo ideal de esterilização foi obtida por modelos matemáticos de transferência de calor, com validação dos resultados através de experimentos físicos, leitura de temperatura (SANTOS FILHO e PENNA, 2003; TAMEGA JÚNIOR, 2005; PINHO, 2003; BERTO e VITALI, 2008; AGUIAR, 2002). No entanto, em apenas um desses foi também realizada a validação do modelo através de análise microbiológica (PINHO, 2003). Com relação ao uso da análise sensorial para a seleção da combinação ideal do binômio, temperatura versus tempo, nada foi encontrado até o momento.

Os testes realizados com o produto em análise foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Estadual de Feira de Santana – LEB/UEFS, em uma autoclave de 75 litros, simulando as condições básicas de uma esterilização industrial a vapor. O monitoramento da temperatura foi realizado por meio de um Controlador Lógico Programável – CLP, medindo em tempo real a temperatura do processo de esterilização, este foi conectado a um computador para armazenar os dados e calcular em tempo real o nível de esterilização.

## **1.2. OBJETIVO DO TRABALHO**

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de monitoramento da temperatura, do processo de autoclavação de alimentos enlatados, calculando em tempo real o nível de esterilização para atender aos requisitos de uma esterilização segura.

## **1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos para este trabalho foram:

- Análise físico-química do produto em estudo;
- Identificar o ponto frio da lata;
- Desenvolver um programa de monitoramento da esterilização;
- Instalar o sistema de monitoramento de temperatura no interior da autoclave;
- Calibrar o sistema de monitoramento de temperatura;
- Preparar o indicador biológico;
- Validar o programa de monitoramento da esterilização.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ESTERILIZAÇÃO

Esterilização é o processo físico ou químico, que destrói ou inativa todas as formas de vida presentes em um determinado material e em especial, os microorganismos, incluindo: bactérias, fungos e vírus (BORZANI et al., 2001).

A história da esterilização é citada por Dlugokenski (2008) como tendo início em 1877, quando John Tyndall, um físico inglês, reconheceu o esporo como a forma termorresistente das bactérias, e desenvolveu métodos de esterilização para destruí-lo. Em 1880, o bacteriologista francês e colaborador de Louis Pasteur, Charles Chamberland, construiu o primeiro esterilizador a vapor, semelhante a uma "panela de pressão". Este equipamento ficou conhecido como a "Autoclave de Chamberland" (Figura 1).



Figura 1 – Autoclave de Chamberland (IRINI SOULTATOU, 2010).

A esterilização deve assegurar níveis de esterilidade compatíveis com as características exigidas aos produtos alimentícios. O método escolhido depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presente no item considerado. O calor, a filtração e a radiação podem ser citadas como agentes esterilizantes.

O calor não é somente o agente esterilizante mais usado como também o mais econômico e mais fácil de controlar. As duas formas de calor frequentemente utilizadas na esterilização são: calor úmido ou seco. O calor úmido refere-se ao vapor, saturado, gerado em equipamentos denominados autoclaves, enquanto que o calor seco refere-se ao ar quente proporcionado dentro das estufas. O calor úmido quando comparado ao calor seco demonstra

ser mais efetivo, devido a diferença do coeficiente de transferência de temperatura entre o vapor e o ar seco. Em virtude da maior eficiência de ação do vapor, o processo com calor úmido exige temperaturas mais baixas e um menor tempo necessário para garantir o nível de esterilidade proposto (MAZZOLA, 2006). Segundo Penna e Machoshvili (1997), o efeito da umidade reduz a temperatura necessária para a desnaturação ou coagulação das proteínas dos microorganismos nas esterilizações em autoclaves.

No método de esterilização através do calor úmido, o meio de transferência de calor pelo aquecimento é o vapor de água saturado. Neste método, usualmente, a temperatura interna da autoclave é medida por sensores analógicos de pressão, manômetros, cuja escala existe uma correlação da pressão com a temperatura do vapor saturado. Nessas condições, para assegurar que o aquecimento atinja a temperatura de esterilização desejada, indicada no manômetro da autoclave, se faz necessária a completa retirada de ar da câmara de esterilização.

A esterilização através do calor úmido é muito difundida, não só em indústrias alimentícias, como também em estabelecimentos de atendimento à saúde e em indústria farmacêuticas. Na indústria alimentícia, as embalagens metálicas usadas para armazenar alimentos em conservas, são comumente classificadas na categoria de “esterilizados comercialmente”, tendo em vista que nenhum microorganismo viável deve ser detectado pelos métodos de cultura normalmente empregados, ou que o número de sobreviventes é tão baixo que não apresenta riscos sob condições de enlatamento e estocagem (ROJA JÚNIOR, 2008).

O processo de esterilização de alimentos enlatados é um processo físico, conhecido como esterilização em autoclave ou esterilização por calor úmido, que consiste em aquecer o alimento, dentro de sua própria embalagem, em uma autoclave pressurizada por tempo e temperatura específicos, parâmetros que devem ser calculados com base no conhecimento da resistência térmica de microorganismos e componentes dos alimentos.

Na esterilização por calor úmido a temperatura elevada, associada ao alto grau de umidade, representa um dos métodos mais efetivos para a destruição dos microorganismos (BORZANI et al., 2001). O calor úmido inativam os microorganismos, principalmente pela desnaturação irreversível de suas proteínas, destruindo os elementos essenciais para a sobrevivência e multiplicação celular, como enzimas e membranas celulares.

No entanto, além da desnaturação das proteínas, os carboidratos também sofrem transformações denominadas de reação de Maillard e a caramelização (FERREIRA, JARDIM

e MIGUEL, 2005). Estas reações de escurecimento não-enzimático são desencadeadas pelas altas temperaturas do processo térmico de cocção ou de esterilização. Em ambas as reações a degradação do carboidrato forma um composto de coloração escura, sendo indesejável quando este gera alteração na característica do produto armazenado.

A caramelização depende da reatividade do açúcar, da temperatura aplicada ao alimento, da umidade e do pH do meio. Durante a reação de caramelização ocorrem desidratações e hidrólises, chegando ao final com predominância de ácidos (como o acético e o fórmico), de aldeídos (como o formaldeído e o hidroximetilfurfural), diacetil, carbonilas e grupos enólicos. Estes compostos são responsáveis pelo aroma, porque são voláteis, e pela cor, porque são ativos. A combinação destes forma um polímero insaturado que é um pigmento chamado melanoidina (FRONZA et al., 2010).

A reação de Maillard engloba reações complexas que, sob determinadas condições, fazem os açúcares redutores reagirem com as proteínas produzindo pigmentos de cor pardo-escura e modificações no odor e no sabor dos alimentos (FARIA e STABILLE, 2001), que podem ser desejáveis em alguns casos (assados, tostados ou frituras) e indesejáveis em outros (cores escuras que se desenvolvem durante o armazenamento dos alimentos). O escurecimento é devido à produção de melanoidinas, cuja cor é tão intensa quanto maior for seu peso molecular, podendo variar de marrom-claro até o preto. A reação ocorre entre açúcares redutores e aminoácidos (unidade estrutural das proteínas). Esta reação pode resultar na perda de nutrientes (como os aminoácidos do alimento) e no aparecimento de diferentes sabores e aromas ao alimento (FRONZA et al., 2010).

A esterilização de alimentos enlatados por autoclave é um processo descontínuo, também conhecido como processo por batelada, em que o alimento processado é envasado em latas metálicas e recravadas (hermeticamente fechada), prontas para serem inseridas na autoclave em lotes, conforme a capacidade da autoclave. Através de um processo de aquecimento por vapor, são esterilizados simultaneamente o produto e a lata. Na Figura 2 é demonstrado a sequência de envasamento, recravação e esterilização de uma sopa concentrada envasada em lata.

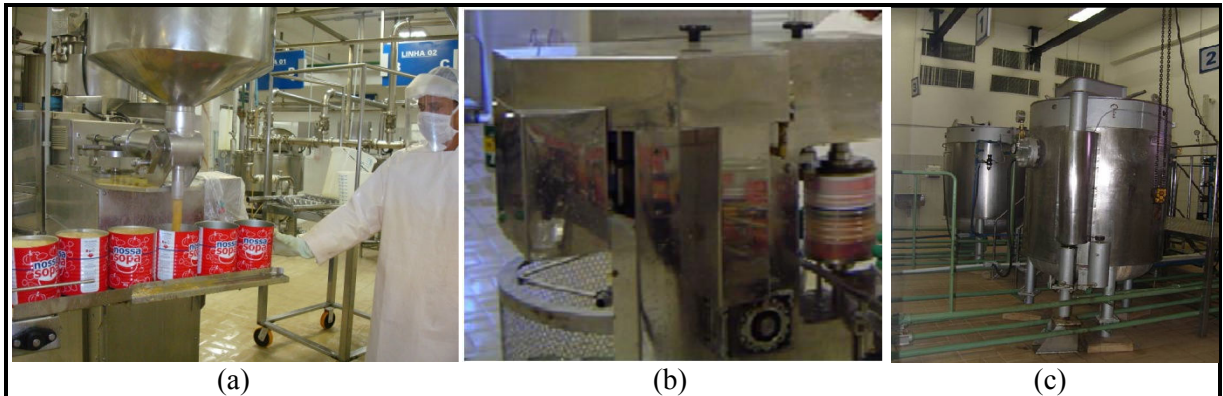


Figura 2 – Processo de esterilização. (a) Envase, (b) recravação e (c) autoclave vertical (NOSSA SOPA, 2008).

Segundo Sun (2005) o fluxograma básico do processamento de alimentos enlatados pode ser visualizado na Figura 3 e é composto pelos processos de: enchimento, fechamento e esterilização, sendo este um ponto crítico de controle para garantir a segurança do alimento.

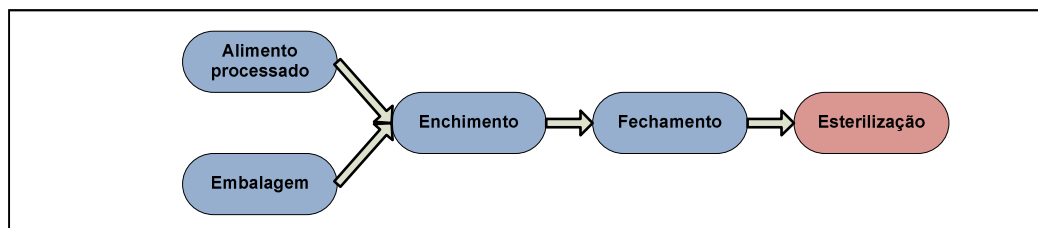


Figura 3 – Fluxograma do processamento de alimentos enlatados (adaptado de SUN, 2005).

No processo de esterilização por autoclave ou, autoclavação, distinguem-se três fases:

- a) Aquecimento, que eleva a temperatura inicial do produto até a temperatura de esterilização (geralmente na ordem de 120°C);
- b) Esterilização, na qual a temperatura é mantida aproximadamente constante durante um intervalo de tempo adequado, chamado tempo de esterilização;
- c) Resfriamento, quando termina o tempo de esterilização e com auxílio de água fria, ou de forma natural, a temperatura é reduzida até se atingir a temperatura próxima a inicial.

Na Figura 4 temos a representação da temperatura versus tempo no processo de esterilização descontínuo, composto pelas fases de aquecimento (**I**), esterilização (**II**) e resfriamento (**III**) descritas na curva do gráfico.

Neste mesmo gráfico podem ser visualizadas as temperaturas de esterilização ( $T_e$ ), a temperatura inicial ( $T_i$ ), a temperatura final ( $T_f$ ) e a temperatura mínima letal ( $T_m$ ), descritas no eixo da ordenada, enquanto na abscissa, é representado o tempo decorrido no processo e em especial o tempo de esterilização ( $\theta$ ), conhecido também como tempo de letalidade ( $F_o$ ).

O tempo de esterilização ( $\theta$ ) representa o tempo de manutenção da temperatura de esterilização ( $T_e$ ) a partir do instante em que ela é alcançada. A temperatura mínima letal corresponde à menor temperatura na qual os microorganismos estão susceptíveis ao calor.

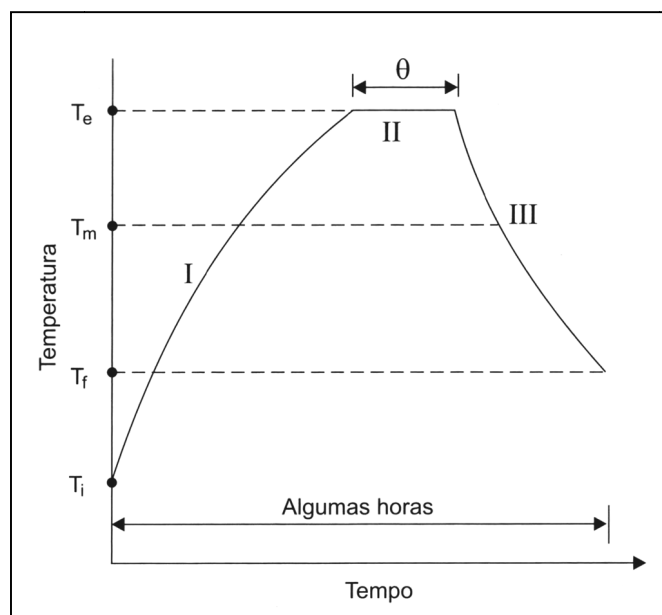


Figura 4 – Representação esquemática da variação de temperatura durante a esterilização por processo descontínuo (BORZANI et al., 2001).

A rigor, a destruição térmica dos microorganismos não se dá apenas na fase chamada “esterilização”, mas também no aquecimento, e durante o resfriamento, enquanto a temperatura for superior à denominada “temperatura mínima letal”, da ordem de (80 a 100)°C (BORZANI et al., 2001).

No monitoramento da temperatura na esterilização de produtos enlatados, em especificamente no caso dos alimentos, o objetivo comum em inúmeras pesquisas é a otimização desse processo, considerando os fatores de: retenção dos nutrientes, inativação enzimática, destruição dos microorganismos e redução do consumo de energia, mantendo suas características sensoriais próximas às originais (TERRA, 2000; SLONGO, 2008; FRAVET; 2006; ZANONI et al., 2003).

Comparando-se a velocidade de degradação de nutrientes com a de destruição dos microorganismos indesejáveis, foi identificado que a retenção de nutrientes é favorecida por processos com altas temperaturas por curtos períodos de tempo (HTST – *High Temperatures for Short Time*). Pinho (2003) verificou experimentalmente o favorecimento por processos HTST na retenção de tiamina em esterilizações de alimentos infantis. Zanoni (2003) também comprovou uma maior retenção de nutrientes em análises de qualidade nutricional e sensorial – atributo referente a cor – do purê de tomate após ser esterilizado durante um tempo menor e aplicando uma maior temperatura.

A esterilização de alimentos enlatados, em autoclaves, normalmente é feita considerando-se a temperatura da autoclave constante por um determinado tempo de processo. Usualmente a determinação da temperatura e do período de tempo adotado na esterilização é resultado de experiências, de acordo com o tipo de microorganismo em estudo. Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de identificar e de prever o efeito da variação de temperatura e do tempo de esterilização. Segundo os autores Teixeira, Stumbo e Zahradnik (1975), o estudo sobre a melhora na qualidade do alimento poderia ser obtida com variações na temperatura e no tempo do processo de esterilização, porém esse procedimento foi, por muito tempo, desconsiderado devido às dificuldades experimentais e aos erros que estariam envolvidos.

### **2.1.1. Cinética da destruição térmica de microorganismos**

É a velocidade de destruição de um determinado microorganismo, presente em um dado meio a uma temperatura superior à temperatura mínima letal. A cinética de inativação térmica de microorganismos e de vírus pode ser aproximada conforme um modelo de primeira ordem:

$$\frac{dN}{dt} = -K \cdot N \quad \text{Equação 1}$$

Sendo  $N$  o número de microorganismos vivos existentes no meio após um tempo  $t$  de aquecimento do sistema a uma dada temperatura estável. A constante  $K$  é denominada constante de velocidade de destruição térmica do microorganismo, ou taxa de reação, que representa a velocidade com a qual a reação ocorre em determinada temperatura.

Separando-se as variáveis, podemos chegar à seguinte expressão:

$$\frac{dN}{N} = -K \cdot dt \quad \text{Equação 2}$$

Integrando a Equação 2 com os limites iniciais,  $N_I = N_0$  e  $t_I = 0$ , e os limites finais,  $N_F = N$  e  $t_F = t$ , temos:

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \int_0^t -K \cdot dt \quad \text{Equação 3}$$

Resultando em:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -K \cdot t \quad \text{Equação 4}$$

Que equivale a:

$$\ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = K \cdot t \quad \text{Equação 5}$$

A Equação 5 é graficamente ilustrada na Figura 5, em que o coeficiente angular das curvas é numericamente equacionado para determinar a constante de velocidade de destruição térmica ( $K$ ) específica para cada temperatura de manutenção.

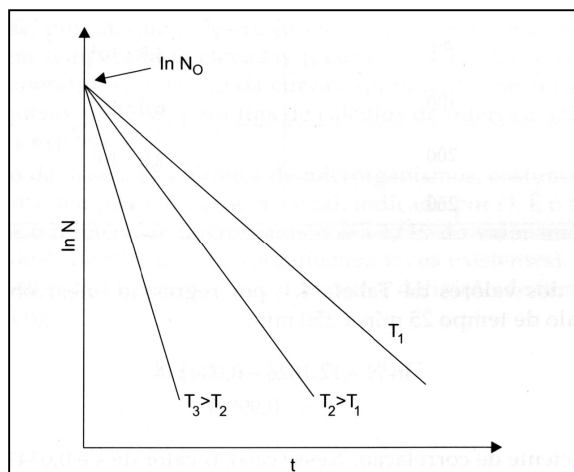


Figura 5 – Representação esquemática do número de microorganismos vivos ( $N$ ), após um tempo  $t$  de manutenção do meio a uma temperatura letal ( $T_i$ ) (BORZANI et al., 2001).

Na Equação 5 a constante de inativação térmica  $K$  depende dos fatores: microorganismo (gênero, espécie, linhagem, idade da cultura, existência ou não de esporos), meio (composição, pH, presença de sólidos em suspensão) e da temperatura (BORZANI et al., 2001).

Considerando-se um único meio e microorganismo, o valor de  $K$  dependerá apenas da temperatura. Esta proposta de modelagem, conhecido como equação de Arrhenius, data de 1889, cujo autor o cientista sueco, Svante August Arrhenius, recebeu o terceiro prêmio Nobel de Química da história, em 1902, pela teoria da dissociação eletrolítica (BRASIL et al., 2010):

$$K = k_o \cdot \exp\left(\frac{-\Delta E}{R \cdot T}\right) \quad \text{Equação 6}$$

Onde  $k_o$  é uma constante empírica,  $R$  é a constante universal dos gases ideais ( $1,9872 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  equivalente a,  $8,3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta e  $\Delta E$  é a denominada energia de ativação de destruição térmica do microorganismo.

Outro modelo utilizado para determinar a constante  $K$  foi proposto pelo pesquisador Bigelow, conhecida como equação de Bigelow:

$$K = A' \cdot \exp(B' \cdot T') \quad \text{Equação 7}$$

Onde  $A'$  e  $B'$  são constantes empíricas e  $T'$  é a temperatura medida em °C.

Para melhor fundamentação teórica nos cálculos de esterilização proposto nesse trabalho será adotada a equação de Arrhenius.

Supondo que na esterilização descontínua de um determinado meio, como demonstrado na curva da Figura 6, o meio sofre uma variação da temperatura com o tempo, com isso, tanto no aquecimento ( $t_1$  a  $t_2$ ) quanto no resfriamento ( $t_3$  a  $t_4$ ), o valor de  $K$  varia como consequência da variação da temperatura.

Nesses casos é possível interpretar o processo como uma soma de efeitos sucessivos de inativação, nas etapas de aquecimento, esterilização e resfriamento:



$$\ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = \int_{t_1}^{t_4} K \cdot dt$$

Equação 8

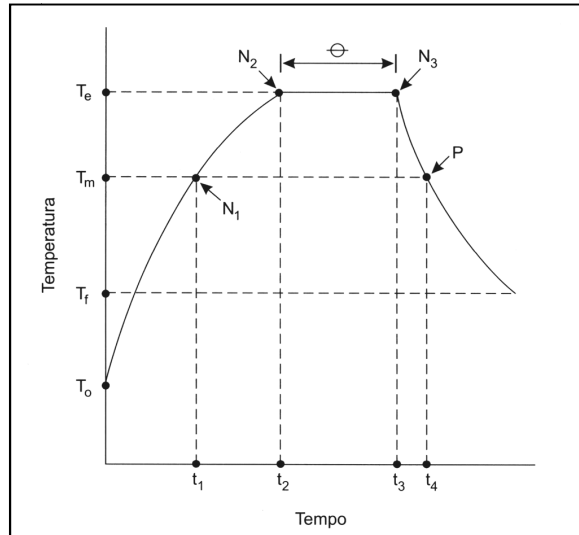


Figura 6 – Variação da temperatura do meio com o tempo durante a esterilização (BORZANI et al., 2001).

Aplicando a equação de Arrhenius (Equação 6), é possível reescrever a Equação 8 de forma a calcular a destruição térmica em função da variação da temperatura no decorrer do tempo ( $T_t$ ).

$$\ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = k_o \cdot \int_0^t \exp\left(\frac{-\Delta E}{R \cdot T_t}\right) dt$$

Equação 9

O nível da destruição térmica descrita na Equação 9 indica a quantidade de microorganismo destruídos da totalidade inicial ( $N_0$ ), em função da temperatura e do tempo.

### 2.1.2. Nível de esterilização

Em algumas referências a necessidade da destruição térmica é representada, por exemplo, por um valor na ordem exponencial de  $10^{-6}$  (CAMARGO, 1995) ou como um valor logarítmico de 6log, ou seis ciclos logarítmicos (BRASIL, 2005), mas em ambos os casos indica que a população de microorganismos foi reduzida na proporção de um milhão ( $10^6$ ) para apenas um, por exemplo.

Caso deseje transformar a Equação 9 para expressar a redução em log decimal, a mudança da base pode ser calculada da seguinte forma:

$$\log_{10}\left(\frac{No}{N}\right) = \left[ \frac{\ln\left(\frac{No}{N}\right)}{\ln 10} \right] \quad \text{Equação 10}$$

$$\log_{10}\left(\frac{No}{N}\right) = \left[ \frac{k_0 \cdot \int_0^t \exp\left(\frac{-\Delta E}{R \cdot T(t)}\right) dt}{\ln 10} \right] \quad \text{Equação 11}$$

Sendo o resultado de 6log o mesmo que:

$$\log_{10}\left(\frac{No}{N}\right) = \log_{10}\left(\frac{10^6}{1}\right) = \log_{10}10^6 = 6\log_{10}10 = 6 \quad \text{Equação 12}$$

No primeiro caso em que o nível de esterilização é indicado na ordem exponencial de  $10^{-6}$ , corresponde ao número final ( $N$ ) de esporos sobreviventes por unidade de produto, assumindo população inicial unitária,  $No = 1$  UFC (Unidade Formadora de Colônia). Por exemplo, sugerem uma população sobrevivente de *Clostridium botulinum* de  $N = 10^{-12}$  UFC equivalente a 12 ciclos reduzidos (MAZZOLA, 2006; SANTOS FILHO e PENNA, 2003).

Há dois termos bastante conhecido entre as publicações que quantifique o nível de esterilização, o PUNE (Probabilidade de Unidades Não Estéreis) e o SAL (*Sterility Assurance Level*), ambos representam o mesmo resultado na ordem exponencial. Por exemplo, o PUNE menor que  $10^{-6}$  para alimentos esterilizados é um critério que descreve a probabilidade aceitável para produtos esterilizados como menos que uma unidade não estéril em  $10^6$  unidades de produtos esterilizadas ( $PUNE < 10^{-6}$  ou  $SAL < 10^{-6}$ ) (CAMARGO, 1995; PENNA, 2003).

### 2.1.2.1. Valores para a constante de inativação térmica (K)

A determinação do valor de  $K$  depende da espécie do microorganismo a ser destruída. Na prática encontram-se microorganismos vivos pertencentes a diferentes gêneros e

espécies, alguns esporulados e outros não, que devem ser exterminados para assegurar a inexistência de contaminantes. Este problema é contornado utilizando um Indicador Biológico (IB), com um microorganismo de referência conhecido, altamente resistente ao calor, e admite-se que todos os microorganismos existentes no meio a ser esterilizados apresentem uma resistência à destruição térmica igual, ou menor, à do microorganismo de referência.

Para o processamento térmico de alimentos, duas categorias gerais são reconhecidas pela *National Cannery Association* (NCA) do ponto de vista de saúde pública e segurança. Existem os alimentos ácidos,  $\text{pH} < 4,6$ , que podem permitir o crescimento de organismos deterioradores, e os alimentos de baixa e média acidez ( $\text{pH} > 4,6$  e  $a_w^1 > 0,85$ ) que, além de suportarem o crescimento de organismos deterioradores, possibilitam o desenvolvimento e proliferação de esporos de *Clostridium botulinum*. Assim, o processamento térmico mínimo para alimentos enlatados de baixa e média acidez é para inativar esporos de *C.botulinum* (NCA, 1975; CAMARGO, 1995; GOLDONI et al., 2001).

Para atingir o objetivo do monitoramento da esterilização foi adotado nesse experimento como microorganismo de referência o *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953) esporulado, devido à disponibilidade do material no laboratório e por ser normalmente adotado no monitoramento de esterilizações a vapor, além de possuir uma resistência térmica próxima do *C.botulinum* (TADINI, SAKUMA e FREITAS, 1998).

Os valores para a constante cinética de inativação do *G. stearothermophilus* mediante calor úmido variam acentuadamente conforme a variação da temperatura de manutenção do processo. Valores típicos de **K** para *G. stearothermophilus* podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Constantes cinéticas da inativação de *Geobacillus stearothermophilus*.

Temperatura (°C)	K (min <sup>-1</sup> )
100	0,02
110	0,21
120	2,0
130	17,5
140	136
150	956

Fonte: (BLANCH e CLARK, 1997, pág. 417)

<sup>1</sup>  $a_w$  (do inglês: Activity of Water) denominado como atividade de água, define-se como a relação entre a pressão de vapor de um alimento em relação com a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura e varia de 0 a 1. É um parâmetro que permite determinar sua capacidade de conservação e de propagação microbiana.

No entanto, para o propósito de corrigir a cinética de inativação conforme o tempo transcorre e a temperatura muda, precisar-se-á dos valores da constante dos parâmetros que são usados para representar a cinética da reação segundo as leis de Arrhenius, que são a Energia de ativação ( $\Delta E$ ), a qual representa a barreira energética em excesso que o sistema deve vencer para se iniciar a reação de inativação térmica, normalmente é expressa em unidades ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), e a constante de referência ( $k_o$ ), conhecida também como fator pré-exponencial, normalmente é expressa na unidade ( $\text{min}^{-1}$ ). Diferentes autores apresentam valores parecidos para  $k_o$  e  $\Delta E$ , como pode ser percebido na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de constante de referência e energia de ativação.

Referência Bibliográfica	$k_o(\text{min}^{-1})$	$\Delta E (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
(STANBURY, WHITAKER e HALL, 1995, pág. 126)	$9,509*10^{37}$	283,26
(BLANCH e CLARK, 1997, pág. 417)	$8,73512*10^{37}$	283,25
(SHULER e KARGI, 2002, pág. 300)	NC	292,88
(AIBA, HUMPHREY e MILLIS, 1973, pág. 255)	$7,94*10^{38}$	287,44

Observação: NC corresponde a Não Consta na bibliografia citada.

Neste trabalho foram adotadas as constantes de referência de energia de ativação descritas em uma das bibliografias (AIBA, HUMPHREY e MILLIS, 1973) para servir de partida, sendo necessária a confirmação destes valores após o processo de validação do modelo. Os valores adotados ( $k_o = 7,94*10^{38} [\text{min}^{-1}]$  e  $\Delta E = 287,44 [\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}]$ ) foram usados como ponto de partida para os testes dose-resposta para quantificar a resistência dos esporos *G. stearothermophilus*.

Para se ter uma idéia prática do que estes valores significam, na Tabela 3 estão descritos os tempos de manutenção necessários, em diferentes temperaturas, para obter o mesmo efeito que o obtido para  $140^\circ\text{C}$  durante 50min (valores utilizados no procedimento de esterilização da Nossa Sopa), utilizando os valores de  $k_o$  e  $\Delta E$ , para os esporos do *G. stearothermophilus*, aplicando a equação de Arrhenius (Equação 6).

Tabela 3 – Valores para tempo de manutenção em diferentes temperaturas para obter a mesma ordem de letalidade.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>
140	50
135	167
130	479
120	4248
110	42238

Fonte: Autor

### 2.1.3. Monitorização do processo de esterilização

A monitorização de um processo de esterilização proporciona maior confiança e segurança no processo que foi aplicado ao produto. Para a maior parte dos processos empregados hoje em dia, existem métodos químicos, físicos e biológicos de monitorização.

O monitor é um dispositivo utilizado para supervisionar processos ou as condições em que estes são realizados. Na esterilização, monitores podem se utilizados nos procedimentos de controle de processos, fornecendo informações sobre a capacidade dos processos de esterilização, produzindo ou não um determinado efeito sobre a carga contaminante do produto a ser esterilizado. Os monitores devem ser construídos, de tal forma que possam determinar o efeito do agente esterilizante sobre toda extensão do produto a ser esterilizado, uma vez que os parâmetros que contribuem para o efeito de destruição do microorganismo atingem seus níveis pré-determinados de forma gradual. O monitor deve ser capaz de integrar estas quantias parciais e, ao mesmo tempo, levar em consideração as inter-relações entre todos os parâmetros envolvidos no ciclo (exemplo: temperatura, tempo, concentração, umidade relativa e outros) (CAMARGO, 1995).

Devido à preocupação com a esterilidade, surgem nas primeiras décadas do século XX estudos envolvendo dispositivos físico-químicos para monitorar o processo de esterilização. Este material é utilizado para alterar visivelmente suas formas físico-químicas quando expostos à esterilização por vapor saturado sob pressão, sendo denominado na época de “*Diack*”, conforme descrito em Martinho (2007). Atualmente este tipo de controle é denominado monitoramento dos ciclos de esterilização e são realizados com auxílios de indicadores.

Os indicadores de esterilização são recomendados para validar ciclos de esterilização e as condições de processamento. Existem três classes de indicadores de esterilização; químico, físico e biológico.

Os **indicadores químicos** são fitas de papel impregnadas com uma tinta termocrômica que mudam de cor quando expostas a temperatura elevada por certo tempo (Figura 7). Elas podem apenas indicar a exposição ao calor (indicadores específicos de temperatura) ou ainda indicar a ação de diferentes componentes como tempo, temperatura e vapor (integradores). Os indicadores químicos, na forma de tiras de celulose ou fita adesiva, são utilizados apenas para diferenciar os pacotes que passaram pelo processo de esterilização. Seu emprego deve ser considerado como um auxiliar ao programa de monitoramento biológico, uma vez que essas fitas apenas asseguram os parâmetros de temperatura e presença de vapor (PELISSER et al., 2008).

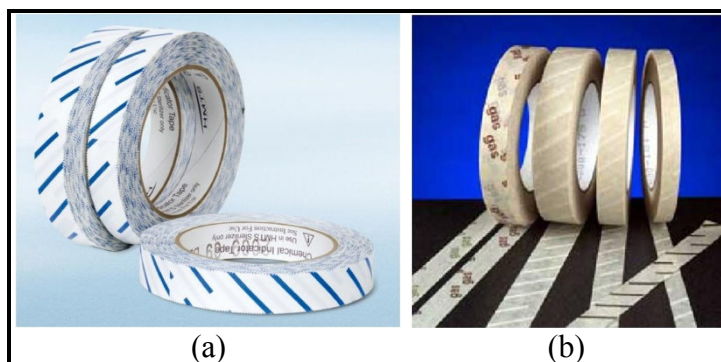


Figura 7 – Indicadores Químicos, fita auto-adesiva: (a) Muda de coloração de azul para rosa em presença de peróxido de hidrogênio; (b) A cor muda de branco para preto em esterilização a vapor saturado (CATÁLOGO HOSPITALAR, 2010).

Os **indicadores físicos** são termopares conectados a um registrador de temperatura, podendo ser distribuídos em diferentes pontos da câmara e da carga, para medir a distribuição do calor, indicando os pontos frios (PENNA e MACHOSVILI, 1997).

Os **indicadores biológicos (IB)** são compostos por microorganismos resistentes ao agente esterilizante, e são utilizados para verificar se as medidas físicas garantem o nível de esterilidade estabelecido. Sendo os esporos bacterianos altamente resistentes às condições ambientes adversas, eles são amplamente usados como indicadores biológicos na avaliação do nível de esterilidade atingido, e como indicadores de possíveis falhas operacionais (PENNA e MACHOSVILI, 1997).

Uma abordagem largamente empregada na monitoração biológica de processos de esterilização é o uso de esporos bacterianos caracterizados e com resistência conhecida a agentes esterilizantes. O uso de tais estruturas celulares como indicadores biológicos

fundamenta-se no fato de que estas são capazes de responder a pequenas variações de condições ambientais.

### **2.1.3.1. Indicador Biológico (IB)**

A aplicação dos indicadores biológicos (também chamado de microorganismo indicador), na indústria de alimentos centra-se no fornecimento de dados para o cálculo do valor de esterilização aplicado ao produto, bem como na verificação da eficiência de um processo que assegure a esterilidade comercial ou a aplicação de processos mínimos (PACHECO, 2001).

Os esporos de *Geobacillus stearothermophilus* são considerados convenientes indicadores biológicos na esterilização pelo calor úmido, particularmente à temperatura de referência de 121°C. Os esporos de *Bacillus subtilis* são empregados nos processos de esterilização pelo calor seco e pelo óxido de etileno e os esporos de *Bacillus pumilus* indicados para validar processos cujo agente esterilizante é a radiação iônica (PENNA e MACHOSVILI, 1997).

Pesquisas também relatam o uso de *B. subtilis* (ATCC 5230) e *B. coagulans* para esterilização em calor úmido e *B. subtilis* (ATCC 5230) e *B. stearothermophilus* para calor seco (ODLAUG e PFLUG, 1986 apud PACHECO, 2001).

Como a função do monitor é registrar a eficácia do agente esterilizante em toda sua extensão do item a ser esterilizado, para que o IB seja realmente um monitor, ele deve ser colocado dentro ou na superfície de um produto de modo a simular as piores condições possíveis a serem encontradas pelo agente esterilizante. Dessa forma o monitor biológico consiste, em geral, de microorganismos inoculados em carregadores e de uma proteção.

Os carregadores são os objetos utilizados como suporte para os IBs, possibilitando o manuseio dos microorganismos indicadores. Para garantir que os monitores biológicos estejam em contato com todos os parâmetros envolvidos no processo de esterilização, normalmente são preparadas suspensões aquosas dos microorganismos indicadores e estas são secas na superfície ou distribuídas no volume do carregador.

Existe uma variedade de materiais, tamanho e formas que os carregadores podem apresentar. A maioria é composta de materiais sólidos como papel filtro, vidro, grãos de solo (de areia ou de sílica), folha de plástico ou de alumínio e fios de algodão. Em certos casos a deposição de microorganismo indicador sobre os produtos (exemplo a deposição de suspensão

de esporo no interior da carga antes do processo para validar o ciclo) ou homogeneizados no produto (exemplo uma inoculação de suspensão de esporos termorresistentes em uma lata de sopa de vegetais como na técnica de embalagens inoculadas) faz com que estes funcionem como carregadores (CAMARGO, 1995).

Após a exposição ao agente esterilizante, os carregadores com os indicadores biológicos devem ser submetidos ao procedimento de detecção da presença/ausência de organismos capazes de se multiplicar, ou de contagem dos mesmos. Conseqüentemente, estes devem ser protegidos de qualquer contaminação acidental, ou disseminação no ambiente até que eles tenham sido sujeitos à pesquisa de sobreviventes. Em alguns modelos de IBs no qual as suspensões de organismos indicadores não são impregnadas sobre a superfície dos carregadores, o sistema requer, além do veículo onde os organismos indicadores são dispersos, uma proteção à prova de vazamentos para evitar contato do organismo indicador com o meio externo e vice-versa. Porém é fundamental que esta proteção permita que o agente esterilizante atinja os organismos indicadores, sem oferecer resistência ao contato ao agente esterilizante, para não mascarar ou retardar seu efeito letal (CAMARGO, 1995).

Nesse contexto os indicadores biológicos podem ser de dois tipos: o **carregado** e o **inoculado**.

- **Tipo carregado.** Nesse tipo os carregadores podem ser usados de duas formas:
  1. Os organismos indicadores em suspensão são depositados de forma homogênea na superfície de carregadores que podem variar largamente quanto ao material de constituição, tamanho e forma.
  2. Os organismos indicadores em suspensão são depositados no interior dos carregadores que neste caso funcionam como cápsula. Neste tipo os carregadores podem ser ampolas, bulbos ou tubos capilares de vidro, bastões de plástico, de alumínio ou de plástico-alumínio. Em alguns tipos os organismos indicadores são suspensos em água, solução tampão, ou em caldos de cultura (Figura 9).
- **Tipo produto inoculado.** Os organismos indicadores são depositados no interior de uma amostra ou em uma simulação do material a ser esterilizado. Na área alimentar, os produtos inoculados podem ser utilizados para controlar a população inicial, através da observação da deterioração do produto após ou



durante o período de incubação, ou podem ser utilizados para determinar a relação entre o número inicial ( $N_o$ ) e final ( $N$ ) dos sobreviventes em função da cinética de destruição térmica do microorganismo indicador no produto, avaliando assim o nível de esterilização pela letalidade integrada do processo.

Nos indicadores tipo produto inoculado, quando um número pré-determinado de esporos ( $N_o$ ) é submetido numa faixa de tempo de esterilização ( $\theta$ ) a um agente esterilizante, como o vapor úmido, a morte dos esporos acontecerá de uma forma previsível. Dependendo da severidade do tratamento, após o ciclo de esterilização (sub-letal), uma determinada porcentagem dos esporos utilizados como teste terá sido destruída. Quando o número de sobreviventes é determinado, através de técnicas convencionais, obtém-se uma medida razoável da severidade do processo aplicado ao produto. Este método de monitoramento assume que a taxa de morte dos microorganismos contaminantes do produto, que estão dentro do recipiente, será aproximadamente a mesma que a dos organismos indicadores, utilizados no preparo da amostra monitor (CAMARGO, 1995).

Os indicadores biológicos também podem ser classificados quanto à rapidez na obtenção dos resultados. Existem assim três gerações de acordo com a ordem crescente de velocidade da obtenção dos resultados.

- Os de **primeira geração** ou convencionais consistem em tiras de papel contendo esporos dessecados que, após serem expostos ao ciclo de esterilização, são incubados e inoculados através do Método da Turbidimetria (Figura 8). Após dois dias, é feita a análise, para verificar-se a presença ou não de crescimento bacteriano.



Figura 8 – IB Primeira Geração. Frascos com o meio de cultura e envelopes contendo tiras de papel impregnadas com esporos. (DLUGOKENSKI, 2008)

- Os indicadores biológicos de **segunda geração**, ou auto-contidos, com tempo de resposta de no máximo 48 horas, são compostos por uma tira de papel contendo esporos dessecados. Esta tira é armazenada em uma ampola plástica que também acondiciona uma ampola de vidro contendo um caldo nutriente próprio para o cultivo de micro-organismos.

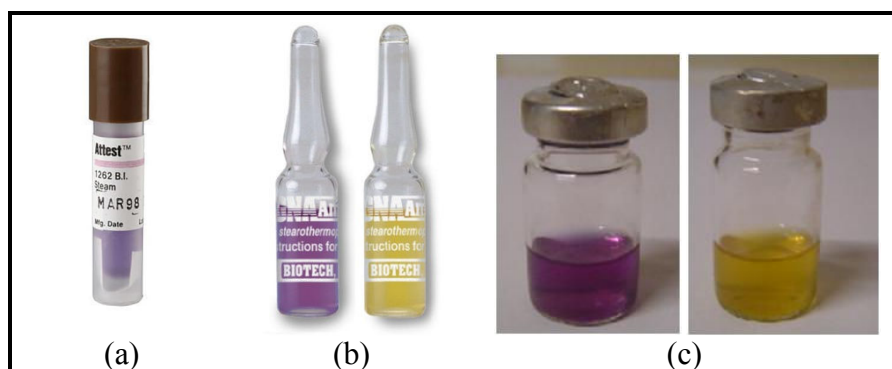


Figura 9 – Indicadores Biológico, auto-contido, Segunda Geração: (a) ATTEST 3M; B) BIOTECH; C) ESTERITESTE-CPPI. (DLUGOKENSKI, 2008)

- Os indicadores biológicos de **terceira geração**, também auto-contidos, possuem tempo de resposta de no máximo três horas, por método de fluorescência. Ao meio de cultura, é acrescido um substrato que fornece um produto fluorescente, facilmente detectável quando nele se incide uma luz ultravioleta (Figura 10) (PELISSER et al., 2008).



Figura 10 – Incubadora para IB Terceira Geração. (DLUGOKENSKI, 2008)

O resultado dos testes nos indicadores biológicos de segunda geração, contendo meio de cultivo, é fundamentado na sobrevivência ou não dos esporos resistentes ao processo de esterilização. A leitura é visual, ou seja, com mudança na coloração do meio de cultivo.

Quando o ciclo de esterilização não foi eficiente para destruir os esporos contidos no IB, os sobreviventes irão germinar e se reproduzir, quando em contato com nutrientes e temperatura adequados. O metabolismo dos componentes do meio de cultura irá gerar metabólitos que alterarão o pH do meio. Portanto, a presença de um indicador de pH no meio para a germinação dos esporos nos IB autocontidos permite a fácil visualização da germinação pela mudança de coloração. Geralmente o púrpura de bromocresol é indicado, pois mantém o meio na coloração violeta em soluções alcalinas ou levemente ácidas (pH 6,0 a 8,0) e adquire a coloração amarela em pH ácidos (abaixo de 5,5) (Figura 9 b, c) (DLUGOKENSKI, 2008).

#### **2.1.4. O *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953)**

O *Bacillus stearothermophilus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 7953 classificado por Donk em 1920, foi renomeado como *Geobacillus stearothermophilus* por Nazina et al. em 2001, para reclassificar as espécies de *Bacillus* caracteristicamente termófilas. Caracteriza-se por ser um bacilo gram positivo, apatogênico, que apresenta reações de catalase e hidrólise do amido positiva e reação de Voges - Proskauer negativa, fermenta a glicose sem a formação de gás (SILVA, 2007). Nazina e colaboradores (2001) afirmam que o mesmo ocorre com a frutose, maltose, manose e sucrose. Segundo Silva (2007) a maioria hidrolisa a gelatina, a caseína (proteolíticos) e, também o amido.

As células são móveis e produzem esporos com dilatação do esporângio. Os esporos são extremamente resistentes ao calor. Segundo Silva (2007) a sobrevivência, em pequenos números, é considerada normal nos alimentos de baixa acidez, comercialmente estéreis, porque multiplicação só ocorre se o produto for mantido em temperaturas acima de 37°C. Entretanto já foi identificado também como causador da deterioração de creme de milho, ervilhas enlatadas, leite e outros produtos de baixa acidez. Geralmente a causa é o resfriamento lento ou a estocagem dos produtos em temperaturas altas, ou ainda a combinação dos dois.

O *G. stearothermophilus* são termófilos estritos, com temperatura ótima entre 60 a 65°C, máxima de 70°C e mínima de 37°C, portanto está dentro da classificação de microorganismos termofílicos (SILVA, 2007). Não é acidúrico, ou seja, não cresce em um ambiente ácido, o pH de crescimento varia entre 5,5 e 8,5, com ótimo entre 6,2 e 7,5, sendo portanto considerado um microorganismo neutrófilo (DLUGOKENSKI, 2008). Algumas cepas são aeróbias estritas e outras anaeróbias facultativas, Silva (2007) relata uma

possibilidade entre 11 e 99% das cepas serem anaeróbias facultativas. Não exigem vitaminas nem fatores de crescimento e produzem ácido, mas não gás a partir de carboidratos (SILVA, 2007).

Devido à capacidade do *G. stearothermophilus* de formar esporos termorresistentes, estes são comumente usados como organismos para o preparo de indicadores biológicos (IB), na validação e monitoramento dos processos de esterilização, pelo calor úmido sob pressão nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e serviços de atendimento à saúde em geral, por apresentarem resistência aos ciclos de autoclavação (DLUGOKENSKI, 2008).

Neste trabalho, os esporos do *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953) foram adotados como microorganismo para o monitoramento das esterilizações por autoclave, devido a características como tolerância a meios ácidos, alta resistência ao processo de esterilização pelo calor úmido e devido à disponibilidade do material no laboratório.

#### **2.1.5. O *Clostridium botulinum***

O *Clostridium botulinum* é um bacilo gram positivo, que se desenvolve em meio anaeróbio, produtor de esporos, encontrado com frequência no solo, em legumes, verduras, frutas, sedimentos aquáticos e fezes humanas. O agente aparece também como habitante normal do trato intestinal de eqüinos, bovinos e aves, onde se multiplica e é excretado em grandes quantidades nas fezes por mais de oito semanas após a primoinfecção (CERESER 2008).

A principal preocupação, em termos de saúde pública, com alimentos de baixa acidez (pH acima de 4,5), como no caso das carnes envasadas, é a formação toxina botulínica. Esta toxina, ou veneno, é produzida por um microorganismo resistente ao calor denominado de *C. botulinum*, sendo a doença produzida por essa toxina chamada de botulismo. Um grama de toxina botulínica é suficiente para matar 30 milhões de camundongos (SCARCELLI e PIATTI, 2002). A dose letal da toxina botulínica para o ser humano não é conhecida, mas pode ser estimada extrapolando-se os resultados encontrados para primatas. Tem-se, por exemplo, uma dose letal para toxina tipo A em um homem de 70kg igual a 70µg por via oral (CERESER, 2008).

Portanto, como exigência mínima de esterilização ou como ponto de referência para a avaliação do tratamento térmico, no caso de produtos de baixa acidez, tais como a

carne, é utilizado o *C. botulinum* que apresenta capacidade de formar esporo (FERREIRA, JARDIM e MIGUEL, 2005).

Os esporos do *C. botulinum* são as formas mais resistentes que se têm encontrado entre os agentes bacterianos patogênicos, podendo sobreviver por mais de 30 anos em meio líquido e, provavelmente, mais tempo ainda em estado seco. São descritos sete tipos de *C. botulinum* (de A a G), que se distinguem pelas características antigênicas da neurotoxina que produzem. Os esporos do tipo E são capazes de germinar em temperaturas inferiores a 3°C e freqüentemente estão associados com frutos do mar refrigerados (CERESER 2008).

A fim de evitar a contaminação por *C. botulinum*, Goldoni (2001) recomenda que os esporos do microorganismo anaeróbio *Clostridium sporogenes* (PA3679) sejam utilizados como o indicador biológico. Esse microorganismo não é tóxico, é mais termorresistente e tem as mesmas necessidades fisiológicas do *C. botulinum*. Assim, os esporos *Clostridium sporogenes* (PA3679) são amplamente utilizados nos estudos designados para avaliar a adequação do processamento térmico empregado ao alimento de baixa e média acidez.

Segundo Camargo (1995) a seleção de esporos do *C. sporogenes* (PA3679) é fundamentada em fatores como:

1. Evita-se contaminação dos equipamentos com *C. botulinum*;
2. Sua resistência térmica nos alimentos é maior que a de *C. botulinum*;
3. Não é produtor de toxina;
4. Possui os mesmos requerimentos fisiológicos que o *C. botulinum*.

#### **2.1.6. Método de contagem dos sobreviventes a partir dos Indicadores Biológicos**

De acordo com Pacheco (2001), na indústria de alimentos, os primeiros esforços de validação biológica foram em estudos de embalagens com indicadores biológicos do tipo inoculados, onde amostras do produto foram inoculadas com altas concentrações de esporos termoresistentes, e incubadas após o processamento, a fim de se estabelecer a relação entre a fração do produto deteriorado e o número de esporos sobreviventes ao processo.

A partir dos primeiros trabalhos de YAWGER (1978, apud PACHECO, 2001), a utilização desta técnica, juntamente com o método de redução de contagem, ampliou as informações fornecidas nestes ensaios, chegando à uma medida biológica da severidade do processo aplicado.

As formas de analisar as informações fornecidas pelos indicadores biológicos podem ser divididas em dois métodos básicos: **enumeração direta dos sobreviventes e sobrevivência-morte** – que incluem os métodos de análise da fração negativa ou análise da morte total.

- 1) No método de contagem dos sobreviventes, ou análise da enumeração direta avalia-se o número de esporos sobreviventes depois da aplicação do processo. Este é um método simples e direto em conceitos. Para determinar o nível de esterilização de um processo, o número de células recuperadas após um ciclo de do processo de esterilização é determinado por contagem de colônias em placas, e pode estar susceptíveis a interferência de uma variedade de fatores como a diluição, erro de pipetagem, manipulação (falta de treinamento/qualificação do operador), o meio de cultura utilizado e o número de colônias formadas por placa, sendo aceitável entre 30 e 300 UFC (DLUGOKENSKI, 2008). Este resultado do número de sobreviventes ( $N$ ) é relacionado com o número inicial de microorganismo ( $N_0$ ) do IB e obtido o nível de esterilização em números de log, conforme a Equação 12.
- 2.a) Método da fração negativa, chamado também de quantal ou análise do número mais provável (MPN). É um método estatístico, nos quais os resultados são obtidos pela observação do número de IB que apresentaram crescimento ou não. As replicatas dos IBs são expostas aos processos de esterilização e são, em seguida, incubadas para resultados positivos ou negativos, para crescimento de sobreviventes. Existem três resultados possíveis: todas as replicatas positivas; todas negativas; ou resultados dúbios em que ocorrem resultados positivos e resultados negativos. Neste último caso, os resultados podem ser analisados utilizando o procedimento de resposta quantal ou análise da fração negativa, e os resultados são comparados com processos padrão. O número dos sobreviventes pode ser também determinado a partir da fração negativa (CAMARGO 1995).
- 2.b) No método da análise da morte total, as replicatas dos IBs são igualmente submetidas ao processo térmico desejado, sendo posteriormente incubadas para se obter o resultado. Quando o resultado é negativo para o crescimento indica a eficiência do processo, ou seja, a carga está livre de contaminação, porém não

informa quanto acima do mínimo necessário está o processo aplicado, isto é, a resposta deste tipo de análise é somente qualitativa e não quantitativa.

As pequenas tiras ou discos de esporos bem como os IBs auto-contidos são exemplos do uso de indicadores projetados para análise de morte total, ou fração negativa. Camargo (1995) sugere que para a obtenção de resultados confiáveis, o IB deve ser utilizado com o método de análise para o qual foi projetado. IB projetado para o método de ponto final, não devem ser empregados em métodos de redução de contagem, e vice-versa. A quantidade de informações geradas quando um sistema com IB é usado para determinar o número efetivo de sobreviventes, através do método de redução de contagens, é muito maior do que a quantidade obtida quando se utiliza o método sobrevivência ou morte (CAMARGO, 1995).

A Figura 11 demonstra as áreas de medidas que se estendem para cada método, de acordo com o número de sobreviventes, por unidade (mL ou g), após exposição ao processo de esterilização. A enumeração direta dos sobreviventes permite contar até 1 sobrevivente por unidade esterilizada. Já a faixa de medida para o método de fração negativa se estende de 5 até 0,01 sobreviventes por unidade e, abaixo deste valor, sobreviventes entre 0,01 e 0,001 serão determinados somente a partir do método de análise de morte total.

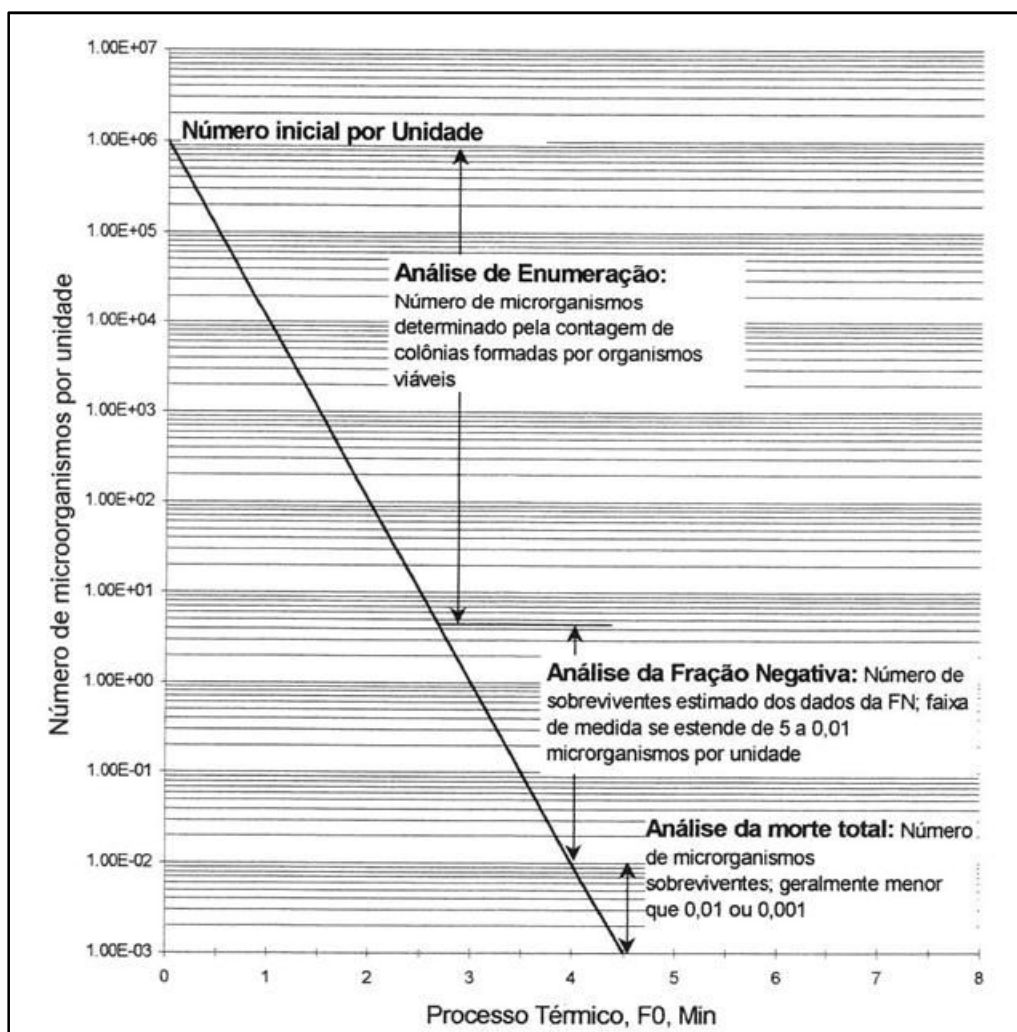


Figura 11 – Áreas de medidas biológicas em função do número de sobreviventes ao processo por unidade. (PFLUG, 1990 apud PACHECO, 2001)

## 2.2. MODELO MATEMÁTICO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR

Um modelo de transferência de calor para a simulação do aquecimento de um corpo sólido, tal como acontece na esterilização de alimentos enlatados, é uma equação matemática capaz de prever a temperatura interna ao longo do tempo em resposta a mudanças de temperatura aplicadas à superfície do corpo (ALVES e GARCIA, 2005). Para a aplicação em processos de esterilização de alimentos enlatados, este modelo é uma equação diferencial de derivadas parciais de 2ª ordem a duas dimensões que descreve a transferência de calor por condução em um cilindro finito (Equação 13).



$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \left[ \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial h^2} \right]$$

Equação 13

Onde:

T = temperatura dos pontos internos do produto em qualquer instante de tempo;

t = tempo de processamento;

r = cota na direção radial no cilindro;

h = cota na direção vertical no cilindro;

$\alpha$  = difusividade térmica do alimento.

As condições de contorno são a temperatura inicial do alimento (ao ser colocado na autoclave) e a equação  $T_{contorno} = T_R(t)$ , sendo  $T_R(t)$  a temperatura da autoclave.

Os perfis de temperaturas no interior do produto alimentício são então obtidos a partir da integração da Equação 13. É necessária a solução numérica da equação de transferência de calor seguida de integração numérica desta solução ao longo do tempo de processamento. Esta discretização do sistema é alcançada por meio do uso da técnica das diferenças finitas aplicadas a elementos finitos de volume, supostos isotérmicos e de temperatura (**T<sub>i</sub>**). A cada nó do sistema é associada uma capacitância térmica, relacionada à inércia térmica do nó analisado.

Assim construído, o sistema nodalizado permite que o i-ésimo nó de volume troque energia com um conjunto de nós imediatamente vizinhos. Este fluxo de calor trocado entre o i-ésimo nó e seus vizinhos resulta em uma malha de conexões entre os nós, geralmente representada por condutâncias térmicas. Dessa forma, a condutância térmica (**G<sub>ij</sub>**), entre cada nó, representa o grau de facilidade com que o calor flui de um nó para o nó vizinho. A Figura 12 ilustra uma nodalização típica onde ainda são vistas as conexões do i-ésimo nó com seus nós vizinhos.

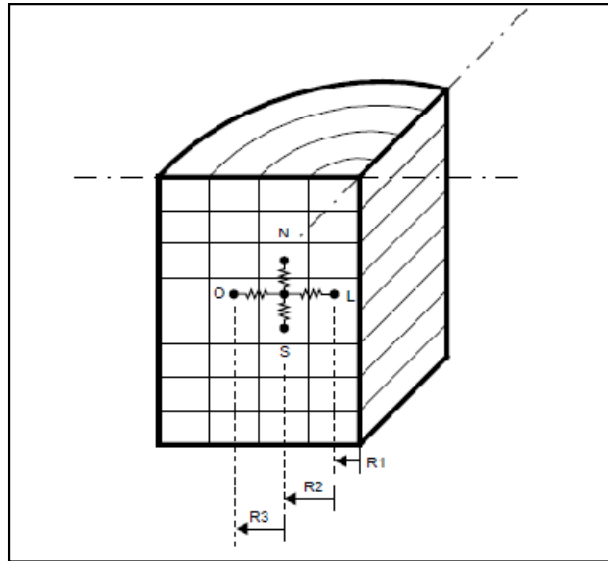


Figura 12 – Nodalização típica de um sistema embalagem cilíndrica (ALVES e GARCIA, 2005).

Cristianini (1998) cita como principais vantagens do Método de Elementos Finitos (MEF):

- ✓ Método pode ser aplicado a corpos compostos de vários materiais, uma vez que as propriedades de cada elemento podem ser variadas;
- ✓ Pode ser aplicado a corpos de superfícies irregulares, tanto pela aproximação do contorno por segmentos de linhas como empregando elementos com superfícies curvas;
- ✓ Tamanho dos elementos pode ser variado. Isto permite o uso de malhas mais finas em regiões onde ocorram gradientes mais ou menos elevados;
- ✓ Superfícies descontínuas podem ser facilmente resolvidas;
- ✓ Método é bastante adequado para problemas não lineares;
- ✓ Combinações de condições de contorno variadas são facilmente manuseadas.

Como desvantagem, Cristianini (1998) menciona a complexidade matemática do método, quando comparado com as equações do método de diferenças finitas, o que acaba por requerer maior tempo e memórias durante a execução em computadores.

A grande desvantagem do método MEF é a enorme quantidade de cálculos envolvidos, o que torna difícil a execução manual do mesmo, exigindo o emprego de programas de computador, mesmo para pequenos problemas.

O interesse da literatura científica no uso do Método de Elementos Finitos voltado para o processamento de alimentos tem aumentado nos últimos anos. Os alimentos formam sistemas complexos que apresenta formas irregulares, propriedades freqüentemente não

uniformes e tornam a modelagem matemática um desafio difícil. O método MEF tem se tornado uma ferramenta analítica muito importante, uma vez que muitas das simplificações e considerações, normalmente adotadas com relação às propriedades físicas dos alimentos, podem ser eliminadas com o seu uso (PINHO, 2003).

### **2.3. INCERTEZA DAS MEDIÇÕES**

Os sempre presentes erros de medição não impedem que informações confiáveis sejam obtidas sobre o processo de medição.

O processo de medição é um conjunto de métodos e de sistemas utilizados para medir um mensurando. Além do mensurando e do sistema de medição, fazem parte do processo: o operador, os procedimentos de medição utilizados e as condições em que as mesmas são efetuadas.

O mensurando é definido como a grandeza que se pretende medir enquanto que o sistema de medição é o conjunto de um ou mais instrumentos de medição e, freqüentemente, outros dispositivos compreendendo, se necessário, reagentes e insumos montado e adaptado para fornecer informações destinadas à obtenção dos valores medidos, dentro de intervalos especificados para grandezas de tipos especificados (BIPM et al., 2008b).

A grande maioria dos sistemas de medição que operam pelo princípio da indicação, ou seja, indica um valor proporcional ao valor do mensurando, apresenta quatro módulos funcionais. São eles: o sensor, o transdutor, a unidade de tratamento do sinal e o dispositivo mostrador (ou registrador). Cada um desses módulos pode constituir uma unidade independente, ou podem estar fisicamente interligados ao sistema de medição, conforme mostra a Figura 13.

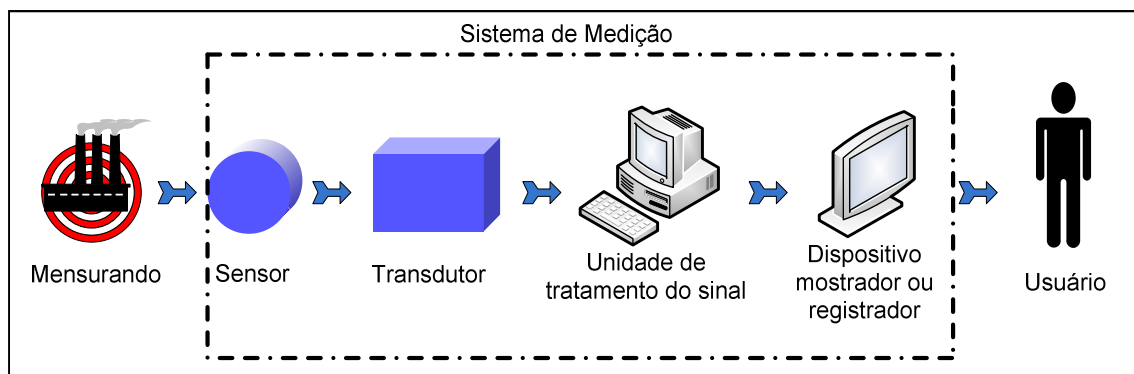


Figura 13 – Sistema de medição. Figura modificada (ALBERTAZZI JR. e SOUSA, 2008).

O sensor é o módulo do sistema que está em contato com o mensurando, enviando o sinal (mecânico, elétrico ou de outra natureza) ao transdutor que, por sua vez, transforma o efeito físico em outro mais conveniente para ser medido, que normalmente é um sinal de baixa energia. A unidade de tratamento do sinal processa o sinal de medição do transdutor e normalmente amplifica sua potência. O dispositivo mostrador é o módulo do sistema de medição que torna o sinal de medição perceptível para o usuário.

Em qualquer procedimento de medição de uma grandeza física o resultado será uma estimativa do valor verdadeiro desta grandeza, dessa forma uma indicação quantitativa da qualidade desta estimativa é necessária para avaliar a confiança no resultado medido. O conceito metrológico que aborda tal assunto é a incerteza de medição.

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (BIPM et al., 2008b) a incerteza de medição “é um parâmetro não-negativo que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas”. De forma simplificada Albertazzi Jr. (2008) define a incerteza da medição como a parcela da dúvida associada à medição.

Em pesquisas que envolvem medições de mensurandos, os resultados dessas medidas devem ser informados acompanhados de suas respectivas incertezas, para se saber o quão confiável é o resultado da medição.

Artigos (MENDES et al., 2010; MARTINS, AMARO et al., 2010) demonstram a importância e a aplicação da incerteza de medições em processos produtivos, auxiliando na tomada de decisões mais consistentes.

A metodologia utilizada neste trabalho para estimativa da incerteza foi baseado no Guia para a Expressão da Incerteza de Medição publicada pela Organização Internacional de

Normalização (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement/ International Organization for Standardization – GUM*) (BIPM et al., 2008a).

O GUM (BIPM et al., 2008a) é mundialmente reconhecido pelas organizações de acreditação metrológica, como base para o tratamento de incertezas, e define o procedimento que deve ser adotado em toda medição, isto é, fornece a base para expressar o resultado de medição e sua respectiva incerteza de medição. De acordo com o GUM as incertezas de medição devem ser obrigatoriamente expressas como incertezas padrão (em termos de desvios-padrão) e complementarmente como incertezas expandidas.

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia – VIM (BIPM et al., 2008b), a incerteza de medição compreende, em geral, muitos componentes. Alguns destes podem ser estimados com base na distribuição estatística dos resultados das séries de medições e podem ser caracterizados por desvios padrão experimentais (Tipo A). Os outros componentes, que também podem ser caracterizados por desvios padrão, são avaliados por meio de distribuição de probabilidade assumidas baseadas na calibração do sistema de medição ou em outras informações (Tipo B). Segundo Martins (2010), a avaliação do Tipo A é baseado em conceitos estatísticos da abordagem frequencialista, ao passo que a avaliação do Tipo B é de abordagem bayesiana. A incerteza do Tipo A considera a variabilidade do processo, enquanto que a incerteza do Tipo B incorpora a dispersão causada pelo aparato de medição.

### **2.3.1. Medição de Incerteza em contagem de placa**

Assim como são realizados cálculos de incerteza para medições de temperaturas também deve ser calculada a incerteza em ensaios de contagens microbiológicas. Os ensaios de contagens microbiológicas geralmente seguem os procedimentos básicos em: filtração por membrana, tubos múltiplos e Pour Plate (placa). Neste trabalho será analisada a incerteza na contagem em pratos.

Morel (2006) comenta sobre a necessidade que os laboratórios tem de demonstrar a confiabilidade dos resultados de ensaios biológicos, para a implementação de sistemas da qualidade, em especial a ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2001) que inclui esse como um dos requisitos o cálculo da incerteza dos resultados dos ensaios. O autor declara também o quanto é difícil estimar a incerteza de ensaios que utilizam organismos.

Em ensaios químicos, os estudos de repetitividade e de reprodutibilidade feitos na validação são úteis nos cálculos de incertezas, sendo com frequência a principal causa de

incerteza. Já nos ensaios microbiológicos as principais causas de incertezas inviabilizam o uso de repetitividade e são:

- a) Imprevisibilidade do número de colônias, que varia muito de caso a caso e que normalmente é a principal fonte de incertezas;
- b) Instabilidade das amostras. As amostras são suspensões que contêm microorganismos que podem se multiplicar, morrerem ou se estagnar.

Segundo Oliveira (2005) a incerteza do ensaio depende muito de condições que na maioria das vezes não se repetem. O autor relata cinco tipos de incertezas associadas a ensaios de contagens microbiológicas:

**Incerteza da leitura ( $w_L$ ):** Depende de olho e mente humana. Uma pessoa com frequência mostrará resultados diferentes para contagens lidas repetidas vezes. Em situações “fáceis”, as pessoas geralmente erram na ordem de alguns pontos percentuais (1%, 3% ....). Em amostras “difíceis” (populações misturadas, métodos mais difíceis, junção de colônias etc.), os erros podem ser bem maiores.

**Dispersão de Poisson ( $w_z$ ):** Considerando a heterogeneidade da suspensão em análise, com unidades formadoras de colônias, a incerteza  $u$  pode ser dada por pela Equação 14. A incerteza relativa pode ser dada pela Equação 15, onde  $z$  é a contagem.

$$u = \sqrt{\frac{1}{z}} \quad \text{Equação 14}$$

$$w = \sqrt{\frac{1}{z} \cdot \frac{100}{z}} \quad \text{Equação 15}$$

**Incertezas das medições volumétricas e diluições ( $w_v$  e  $w_F$ ):** Cálculos de Medições e diluições volumétricas em geral, que dependem de erros de leitura, variações de temperatura e de incertezas de calibração das vidrarias. No

APÊNDICE A constam as tabelas que mostram incertezas padronizadas típicas para vidrarias e diluições em um laboratório de microbiologia. As fórmulas para cálculos de incertezas de diluição, por adição de dois volumes, são dadas pelas equações abaixo:

$$F = \frac{(b + a)}{a} \quad \text{Equação 16}$$

$$w_f = \sqrt{\frac{(u_b^2 + b^2 w_a^2)}{(a + b)^2}}$$

Equação 17

Onde: **F** = Fator de diluição, **w<sub>f</sub>** = Incerteza de uma diluição, **a** = Volume de Amostra, **b** = Volume de Branco, **u<sub>b</sub>** = Incerteza de b, **w<sub>a</sub>** = incerteza relativa de **a**.

Se várias diluições iguais são feitas, onde **k<sub>F</sub>** é o número de diluições, a incerteza final (**w<sub>F</sub>**) é dada pela Equação 18.

$$w_F = k_F \cdot w_f$$

Equação 18

Incerteza da confirmação (**wp**): algumas colônias (**n**) podem ser testadas para confirmação (**k** = confirmadas), gerando um fator de correção para o resultado (**p**), conforme Equação 28.  $p = k/n$ . Para uma distribuição binomial a incerteza relativa (**w**) é dada pela Equação 29. Segundo Oliveira (2005) esta incerteza também pode ser calculada por “Poisson-binomial” e por “quadrado de RSD”, mas com resultados semelhantes.

$$p = \frac{k}{n}$$

Equação 19

$$w_p = \sqrt{\frac{(n - k)}{k \cdot n}} \cdot 100$$

Equação 20

O resultado para contagem em membrana e *Pour Plate* é dado pela Equação 21.

$$y = \frac{F \cdot z \cdot p}{v}$$

Equação 21

Onde **y** é o resultado, **F** o fator de diluição da amostra, **z** a contagem, **v** o volume da porção de teste e **p** o fator de contagem, caso haja teste de contagem.

A incerteza padronizada relativa (**w**) é dada por:

$$w = \sqrt{(w_F^2 + w_z^2 + w_v^2 + w_p^2 + w_L^2)}$$

Equação 22

Depois de obtida a incerteza ( $w$ ), esta deve ser convertida em valor absoluto, multiplicando pela contagem da amostra e por um fator de abrangência ( $k_a$ ), a fim de gerar a incerteza expandida do resultado.