**TERMORRESISTÊNCIA DE ESPOROS DE *Clostridium sporogenes*
PA 3679 FRENTE A VAPOR SUPERAQUECIDO COM
ATIVIDADE DE ÁGUA MENOR QUE 1,00**

FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES DO NASCIMENTO
Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Nascimento, Francisco das Chagas Alves do

Termoresistência de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 frente a vapor superaquecido com atividade de água menor que 1,00 / Francisco das Chagas Alves do Nascimento. - - Piracicaba, 1999.

113 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Bactéria Gram-positiva 2. Bactéria patogênica 3. Composição de alimento
4. Esporo 5. Estresse 6. Fisiologia microbiana 7. Microbiologia de alimento 8.
Microrganismo 9. Microscopia eletrônica 10. Resistência térmica I. Título

CDD ~~598.9~~
589.9

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

DEDICATÓRIA

A DEUS, que através dos entes espirituais,
orientou-me e deu-me forças
para que eu cumprisse mais
esta tarefa.

Aos meus pais Waldemar e Nazaré
pelo amor e exemplo de vida.

À minha avó Francisca, minhas Tias
e aos meus queridos irmãos Áurea,
Lourdes, Antônio, Raimundo, José
Maria, Lucimar, Ana, Lúcia,
Valdemar, Elizabete e Syntia pelo
carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho pela oportunidade, confiança, sábia orientação, ensinamentos e amizade, o meu agradecimento especial.
- À Universidade Federal do Pará pelo licenciamento e apoio financeiro.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade a mim conferida.
- Ao Prof. Elliot Watanabe Kitajima, Coordenador do NAPME- Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica.
- À Profª Marília Oetterer pelos ensinamentos e amizade.
- Às bibliotecárias Beatriz Helena Giongo, Eliana M. G. Sabino e Midian Gustinelli pela presteza.
- À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa do PICDT.
- A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Atividade de água.....	4
2.2 Calor seco.....	5
2.3 Calor seco: vapor superaquecido.....	6
2.4 Gênero <i>Clostridium</i>	7
2.5 Biologia de esporos bacterianos.....	9
2.5.1 Esporos endógenos.....	9
2.6 Estrutura do esporo.....	11
2.6.1 Protoplasto.....	12
2.6.2 Córtex.....	13
2.6.3 Capas do esporo.....	14
2.6.4 Esporulação.....	14
2.6.5 Estágios do processo de esporulação.....	15
2.6.6 Ativação, germinação e crescimento.....	16

2.6.6.1 Ativação.....	16
2.6.6.2 Germinação.....	17
2.4.6.3 Crescimento.....	18
2.7 Fisiologia da esporulação de <i>Clostridium</i>	18
2.8 Alterações morfológicas durante a esporulação.....	19
2.9 Esporulação <i>In vitro</i>	19
2.10 Regulação molecular da esporulação.....	21
2.11 Resistência térmica do esporo bacteriano.....	22
2.12 Avaliação da termorresistência.....	25
2.13 Tratamentos térmicos.....	25
2.14 Desenvolvimento de um indicador biológico.....	27
2.15 Estudos sobre termoresistência em condições de $A_a < 1,00$	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Material.....	38
3.1.1 Microrganismo	38
3.1.2 Meios de cultura para produção dos esporos, e para contagem das UFC mL ⁻¹ pós-tratamento térmico.....	38
3.1.3 Equipamento para tratamento térmico dos esporos.....	39
3.1.4 Controladores da umidade no ambiente de acondicionamento.....	39
3.2 Métodos.....	42
3.2.1 Produção de esporos.....	42
3.2.2 Preparo de amostras para tratamento térmico.....	43
3.2.3 Acondicionamento das amostras.....	43

3.2.4	Manuseio e tratamento térmico das amostras para determinação da temperatura de maior resistência térmica dos esporos.....	45
3.2.5	Avaliação da resistência térmica.....	46
3.2.6	Determinação do tempo máximo de sobrevivência de esporos acondicionados, na temperatura de resistência máxima.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5	CONCLUSÕES.....	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
	APÊNDICES.....	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema geral do equipamento de tratamento térmico de esporos.....	40
2 Esquema da câmara de tratamento.....	41
3 Recipiente plástico contendo solução saturada de cloreto de cobre.....	44
4 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 100 °C a uma Aa média = 0,95.....	53
5 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 110 °C a uma Aa média = 0,67.....	53
6 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 120 °C a uma Aa média = 0,48.....	54
7 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 130 °C a uma Aa média = 0,33.....	54
8 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	55
9 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 150 °C a uma Aa média = 0,20.....	55
10 Curva de sobreviventes de <i>Closridium sporogenes</i> PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 160 °Ca uma Aa média = 0,15.....	56
11 Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 acondicionados a 30 °C em Aa = 0,00, durante 30 dias tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	58

12	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	59
13	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	59
14	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	60
15	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	60
16	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	61
17	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	65
18	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	65
19	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	66
20	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	66
21	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	67

22	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	67
23	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 30 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	68
24	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 60 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	69
25	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 90 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	69
26	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 30 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	70
27	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 60 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	70
28	Curva de sobreviventes de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 90 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	71
29	Micrografias de esporos de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679 obtidas através de microscopia eletrônica de varredura. (A) esporos sem acondicionamento. (B) esporos acondicionados por 90 dias a 30 °C, em Aa = 0,00. (C) esporos acondicionados por 90 dias a 30 °C, em Aa = 0,67. (D) esporos armazenados em suspensão aquosa por 70 semanas.....	80

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Cálculo do valor D dos esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 não acondicionados, tratados em diferentes temperaturas.....	48
2 Cálculo do valor D dos esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 acondicionados durante 30, 60 e 90 dias a 30 °C tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	49
3 Cálculo do valor D dos esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados durante 30, 60 e 90 dias a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	50
4 Cálculo do valor D dos esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C, acondicionados durante 30, 60 e 90 dias a 30 °C, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	51
5 Médias do Log UFC mL ⁻¹ nas temperaturas de maior termorresistência dos esporos não acondicionados.....	57
6 Médias do Log UFC mL ⁻¹ de esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 acondicionados a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	62
7 Médias do Log UFC mL ⁻¹ de esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 não acondicionados e acondicionados em Aa = 0,00, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	63
8 Médias do Log UFC mL ⁻¹ de esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 não acondicionados e condicionados em Aa = 0,67 a 30 °C tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	63
9 Médias do Log UFC mL ⁻¹ de esporos de <i>C. sporogenes</i> PA 3679 armazenado sem suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas acondicionados em diferentes Aa, a 30 °C e tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.....	73

- 10 Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas acondicionados em diferentes Aa a 30 °C, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias e tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26..... 74
- 11 Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa=0,00, a 30 °C tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26, bem como os armazenados por 70 semanas a 4 °C e acondicionados..... 75
- 12 Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67, a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26, bem como os armazenados por 70 semanas a 4 °C e acondicionados..... 76
- 13 Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados por 70 semanas a 4 °C, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, bem como os armazenados por 70 semanas a mesma temperatura e acondicionamento e posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26..... 77
- 14 médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados por 70 semanas a 4 °C, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, bem como os armazenados por 70 semanas a mesma temperatura e acondicionamento e posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,264..... 78

TERMORRESISTÊNCIA DE ESPOROS DE *Clostridium sporogenes* PA 3679 FRENTE A VAPOR SUPERAQUECIDO COM ATIVIDADE DE ÁGUA MENOR QUE 1,00

Autor: FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES DO NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

RESUMO

Dentro de quaisquer sistemas a umidade relativa (UR) ou atividade de água (Aa) é um fator que condiciona a atividade biológica. Nos alimentos, o metabolismo e o crescimento microbiano exigem a presença de água em uma forma disponível, e a atividade de água é um índice desta disponibilidade para a ocorrência de reações físico-químicas e biológicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência térmica de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 frente a vapor superaquecido com atividade de água menor que 1,00. Na primeira fase do estudo utilizou-se as temperaturas de 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 °C com atividades de água médias respectivas de 0,95, 0,67, 0,48, 0,35, 0,26, 0,20 e 0,15, e, determinou-se que a temperatura de maior termorresistência dos esporos tratados situava-se a 140 °C por um tempo máximo de 120 minutos. Posteriormente, utilizando esporos previamente acondicionados em Aa = 0,00 e Aa = 0,67 por 30, 60 e 90 dias, avaliou-se a termorresistência destes esporos armazenados por 70 semanas em suspensão aquosa a 4 °C, os quais sofreram o mesmo acondicionamento supracitado, sendo estes mantidos

por 15 dias em UR = 95%, e submetidos a tratamento térmico de 140 °C por um tempo máximo de 180 minutos. Avaliou-se visualmente a superfície dos esporos através de microscopia eletrônica de varredura. Comparando os resultados da termorresistência de esporos acondicionados nas diferentes Aa, a maior resistência foi observada em esporos acondicionados em Aa = 0,00 por 90 dias a um tempo de tratamento de 150 minutos. Observou-se que o armazenamento dos esporos por 70 semanas em suspensão aquosa a 4 °C em diferentes Aa e a manutenção posterior em UR = 95% não influenciaram na termorresistência dos mesmos. Verificou-se que o acondicionamento promove um aumento da resistência dos esporos quando submetidos ao estresse térmico. Não foi observada nenhuma alteração física na capa dos esporos analisados por microscopia eletrônica de varredura.

THERMORESISTANCE OF *Clostridium sporogenes* PA 3679 SPORES WITH OVERHEATED VAPOUR WATER ACTIVITY LESS THAN 1.00

Author: FRANCISCO DAS CHAGAS ALVES DO NASCIMENTO

Adviser: Prof. Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

SUMMARY

Inside of any system relative humidity (RH) or the water activity (a_w) is a factor that conditions the biological activity. In foods, metabolism and the microbial growth requires the presence of water in an available form, and water activity is a reliable measure of this readiness for physical, chemical or biological reactions. The aim of this work was to evaluate the thermoresistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores using overheated vapour with $a_w < 1.00$. The first phase of study included temperatures of 100, 110, 120, 130, 140 150, 160 °C with mean water activities of 0.95, 0.67, 0.48, 0.35, 0.26, 0.20 and 0.15, respectively. Maximum thermoresistance for *C. sporogenes* PA 3679 spores occurred at 140 °C for up to 120 minutes. Later on, spores previously conditioned in $a_w = 0.00$ and $a_w = 0.67$ for 30, 60 and 90 days, were stored 70 weeks (4 °C) and for thermoresistance evaluated. There spores were conditioned being maintained by 15 days in RH = 95%, submited these to thermal treatment of 140 °C for a maximum time of 180 minutes. Spores were examined and evaluated visually the surface of the spore werw observed usin scanning electron microscopy.

The results show that termoresistance of spores conditioned at $a_w = 0.00$ for 90 days for 150 minutes was maximum. Storage of the spores for 70 weeks in aqueous solution at 4 °C in different a_w and subsequent maintenance at RH = 95% did not influence termoresistance. Conditioning promotes an increase of the resistance of the spores later submitted to thermal stress. No physical alteration was observed in the spore outer layer as analyzed by scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A umidade relativa (UR) ou a atividade de água (Aa) de quaisquer sistemas é um fator que condiciona a atividade biológica. Nos alimentos, o metabolismo e o crescimento microbiano exigem a presença de água em uma forma disponível, e a Aa é um índice desta disponibilidade para a ocorrência de reações físico-químicas e biológicas. A atividade de água é definida como a relação entre a pressão de vapor da água de um sistema (P1) e a pressão de vapor da água livre (Po) à mesma temperatura. A disponibilidade da água em um sistema, ou em um alimento, pode ser, também expressa, como umidade relativa ($Aa = P1/Po$, $Aa \times 100 = UR\%$).

Os microrganismos apresentam um comportamento bastante diverso em relação à Aa para o seu desenvolvimento, pois seu crescimento e metabolismo exigem a presença de água em uma forma disponível, sendo a Aa um índice desta disponibilidade (Leitão 1979; Uboldi Eiroa, 1981). Com a diminuição da atividade de água do sistema, esporos bacterianos apresentam maior resistência térmica. Na maioria das espécies a resistência térmica máxima dos esporos situa-se no intervalo de $Aa = 0,20$ a $Aa = 0,40$ (Murrel & Scott, 1966).

A sanitização a elevadas temperaturas por curto período de tempo, é amplamente conhecida, e usada atualmente. A estimativa exata do tempo de sanitização completa depende do conhecimento do comportamento dos microrganismos frente ao binômio tempo-temperatura. Entretanto, quando o calor é seco ($Aa < 1,00$), a inativação de esporos deixa de ser uma relação simples binômio

tempo-temperatura, intervindo no processo de inativação, fatores como ativação e inativação simultâneas e/ou sequenciais (Prado Filho & Grisotto, 1994).

No desenvolvimento de pesquisas sobre a resistência térmica de microrganismos em ambientes de $Aa < 1,00$, vários processos podem ser utilizados para controlar a Aa do ambiente; sendo que o mais comumente empregado é o de soluções saturadas de sais que apresentam atividade de água definida, na temperatura em que se deseja fazer o tratamento térmico (Smith, 1971).

Em experimentos de termorresistência de esporos bacterianos é desejável um pré-acondicionamento destes, e as condições deste pré-acondicionamento devem ser o mais próximo possível daquelas em que se encontram os materiais a serem tratados. O acondicionamento sob condições diversas, faz com que os mesmos esporos tratados sob as mesmas condições experimentais apresentem resistências diferentes (Fox & Pflug, 1968; Kooiman & Jacob, 1976; Soper & Davies, 1973).

No processo de descontaminação total ou parcial de materiais, instrumentos, embalagens, máquinas e equipamentos, onde não é aplicável a autoclavagem, são empregados outros métodos de descontaminação. Dentre esses destacam-se o uso de vapor superaquecido, de vapor fluente, e de vapor com tratamento prévio, ou simultâneo, dos objetos com produtos químicos.

O estudo da termorresistência de esporos bacterianos nas indústrias alimentícia e farmacêutica, é da extrema importância, assim como seu comportamento em alimentos e matérias-primas desidratados, e como estes esporos poderiam ser inativados, ou destruídos, sem o emprego de tratamentos térmicos por calor úmido. A importância do *Clostridium botulinum* nos aspectos tecnológicos e de Saúde Pública, aliada a inexistência de dados relativos a sua termorresistência frente a vapor superaquecido, levaram a execução do presente estudo.

Tem-se realizado pesquisas sobre a termorresistência de esporos bacterianos em ambiente com atividade de água menor que 1,00 nos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (Alder & Simpson, 1992), não havendo referência sobre a resistência térmica de *C. sporogenes* PA 3679 frente a vapor superaquecido.

Esporos de *C. sporogenes* PA 3679 são largamente usados para estudo na inoculação de embalagens para avaliar a adequação de processos térmicos. Para evitar contaminação na indústria alimentícia por *C. botulinum*, recomenda-se que esporos de PA 3679 sejam usados como organismo teste, pois este não é patogênico, sendo mais resistente ao calor e, uma vez que tem as mesmas exigências fisiológicas do *C. botulinum*.

Uma avaliação das características dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679, frente ao calor seco na forma de vapor superaquecido em diferentes condições de armazenamento, permite conhecer o quanto as associações da temperatura com a Aa podem influenciar na termorresistência do microrganismo.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a resistência térmica de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 frente a vapor superaquecido que, se constitui em um método físico de sanitização de equipamentos, de instalações industriais e, também, de embalagens alimentícias e farmacêuticas, o qual apresenta atividade de água menor que 1,00 quando comparado com vapor saturado à mesma temperatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Atividade de água (Aa)

Uma das propriedades mais importantes para o processamento, conservação e armazenamento de alimentos é a atividade de água. Esta quantifica o grau de ligação da água contida no produto e conseqüentemente sua disponibilidade para agir como solvente e participar das transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas (Labuza, 1977).

De acordo com Erickson (1982) a atividade de água é dada termodinamicamente pela relação de fugacidade e não apenas pelas relações de pressão de vapor. No entanto nas pressões normalmente encontradas em alimentos, a fugacidade é essencialmente igual a pressão de vapor de água em equilíbrio sobre o alimento e a pressão de vapor de água pura, à mesma temperatura.

A Aa em uma solução ideal pode ser descrita pela Lei de Raoult, ou seja, quando um soluto é dissolvido em água, por causa da competição pelas moléculas deste volume, a pressão relativa de vapor de água é obtida pela relação entre o número de moles de água e a soma de moles de água e soluto (Christian, 1980).

Bobbio & Bobbio (1984) afirmam que para soluções não ideais, as interações entre as moléculas presentes, bem como a dissociação do soluto causam um desvio considerável no valor da atividade de água calculada pela Lei de Raoult. A medida deste valor está fundamentada no fato de que a pressão do vapor de água

sobre um alimento após atingir o equilíbrio a uma certa temperatura, corresponde à percentagem de umidade relativa de equilíbrio do alimento.

Tem-se como máximo de Aa o valor 1,00, que corresponde à Aa da água pura. Pode-se, assim, afirmar que a Aa de uma solução, ou de um alimento é sempre inferior à unidade.

Para Quast & Teixeira (1975) a água é um dos principais componentes da maioria dos alimentos e pode exercer diversas funções importantes para suas características físicas e químicas.

Quando em valores de $Aa < 0,40$, a água encontra-se fortemente ligada e geralmente não disponível para as reações de deterioração, com exceção da oxidação química dos lipídios que é fortemente incrementada em valores de $Aa < 0,20$ devido a maior exposição dos grupos reativos. Quando $Aa > 0,60$, pequenas alterações na Aa correspondem, na maioria dos casos, a um considerável aumento na velocidade de algumas destas transformações (Labuza, 1977).

Quanto ao crescimento de microrganismos frente a Aa, observa-se que os fungos são mais tolerantes a um decréscimo da Aa que as leveduras e, estas mais que as bactérias. Muitas bactérias não se desenvolvem em Aa menores que 0,91 e muitos fungos não se multiplicam em Aa menores que 0,80. Em geral considera-se 0,60 como o limite mínimo para o desenvolvimento de microrganismos (Uboldi Eiroa, 1996).

2.2 Calor seco

A efetividade do calor como método de esterilização depende da temperatura e do tempo de exposição. Todos os microrganismos são susceptíveis, em diferentes níveis, a ação do calor. O calor promove a desnaturação de proteínas, fusão e desorganização das membranas celulares, bem como processos oxidativos irreversíveis nos microrganismos.

O calor seco produz dessecação da célula, causando efeito tóxico pelo aumento dos eletrólitos, que ocorre pela transferência de calor dos materiais aos microrganismos que estão em contato com estes. A ação destrutiva do calor sobre as proteínas e lipídios requer maior temperatura quando o material está seco em função da atividade de água do meio ser baixa. Isto porque as proteínas se estabilizam mediante uniões de pontes de hidrogênio intramoleculares que são mais difíceis de romper pelo calor seco.

O calor seco apresenta a vantagem, em relação ao calor úmido, de não ser corrosivo para materiais e instrumentos metálicos, permite a esterilização de substâncias em pó e não aquosas, e de substâncias viscosas não voláteis. Apresenta a desvantagem de requerer maior tempo de esterilização, devido a baixa penetração do calor, e à maior resistência térmica dos microrganismos.

2.3 Calor seco: vapor superaquecido

De acordo com Prado Filho (1997) considera-se como vapor superaquecido aquele que tem pressão igual a do ambiente onde é superaquecido, apresentando temperatura maior que a da ebulição da água na pressão desse ambiente. Este vapor tem menor atividade de água (A_a) que o vapor saturado à mesma temperatura, sendo sua A_a dada pela relação: $A_a = P_{sup.} / P_{sat.}$, onde:

$P_{sup.}$ = pressão do vapor superaquecido à temperatura T , na pressão ambiental.

$P_{sat.}$ = pressão do vapor saturado à temperatura T , em equipamento com pressão maior que a do ambiente (autoclaves, caldeiras).

2.4 Gênero *Clostridium*

De acordo com Bergey's (1994), as espécies pertencentes a este gênero são bactérias em forma de bastonetes, 0,3-2,0 x 1,5-20,0 μm , Gram-positivas, usualmente móveis com flagelos peritríquios, frequentemente arranjadas aos pares ou em pequenas cadeias, anaeróbias obrigatórias, sendo algumas espécies capazes de crescimento microaerófilo. A maioria das espécies são mesófilas, mas algumas são termófilas. São organismos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados principalmente no solo, poeira e ar.

Pela definição global da espécie, as diferentes cepas de *C. botulinum*, podem apresentar características culturais, fisiológicas, bioquímicas e sorológicas diversas. Através dos caracteres sorológicos são distinguidos sete tipos, denominados de A, B, C, D, E, F e G, sendo causadores de botulismo no homem os tipos A, B e F (Franco & Landgraf, 1996).

De acordo com o tipo de toxina produzida e a atividade sobre proteínas e açúcares, as cepas de *C. botulinum* são classificadas nos grupos I, II, III e IV. As cepas produtoras de neurotoxina tipo A e as cepas proteolíticas produtoras das toxinas B e F, pertencem ao grupo I; as cepas produtoras de toxina tipo E e as cepas não proteolíticas produtoras de toxinas B e F pertencem ao grupo II; no grupo III estão compreendidas as cepas C e D e no grupo IV estão aquelas produtoras de toxina G (Hauschild & Dodds, 1993).

Este gênero tem importância em alimentos devido ao fato de que as espécies como *C. botulinum* e *C. perfringens* são capazes de causar toxinfecção veiculada pelos mesmos. Também, as espécies *C. sporogenes*, *C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. thermosaccharolyticum* e *Desulfotomaculum nigrificans* são importantes agentes de deterioração de alimentos enlatados.

O *C. sporogenes* apresenta esporos bastante resistentes, está frequentemente envolvido na deterioração de pescado enlatado, sendo causador de proteólise. O *D. nigrificans*, antes denominado de *C. nigrificans* é levemente proteolítico, produz H_2S , causando geralmente problemas em milho e ervilha. Já o *C. pasteurianum* e *C. butyricum* são importantes em produtos ácidos (pH 4,0-4,6), são sacarolíticos, causando problemas geralmente em batatas e néctares de frutas (Fraizer & Westhoff, 1993; Jay, 1996).

As bactérias do gênero *Clostridium* são agentes ativos de deterioração de alimentos devido à diversidade metabólica que apresentam, com utilização de substratos bastante variados. Entre as patogênicas, destaque maior é dado ao *C. botulinum*, pois, sua presença em conservas reveste-se de extrema importância, não apenas pela elevada resistência de seus esporos, mas, principalmente, em decorrência do fato de elaborar a mais potente toxina de origem bacteriana conhecida (ICMSF, 1978). Um outro aspecto de extrema importância no gênero *Clostridium* reside na capacidade de formação de esporos, sempre com elevada resistência térmica, embora variáveis nas diferentes espécies ou linhagens (Leitão, 1988).

As bactérias patogênicas se encontram com frequência em alimentos contaminados, sendo indesejáveis sob o aspecto de Saúde Pública. Em relação a etiologia, as doenças de origem alimentar causadas por bactérias classificam-se como intoxicações ou infecções, apresentando níveis variáveis de gravidade (Associação Brasileira de Refeições Coletivas, 1990; Beckers, 1988; Eley, 1994; Troller, 1993).

Embora o botulismo de origem alimentar seja o mais difundido, sabe-se que o *C. botulinum* pode ser responsável pelo botulismo infantil, pelo botulismo por lesão e ainda botulismo de origem indeterminada, o que ressalta ainda mais sua importância sob o aspecto de Saúde Pública (Center... 1978).

A intoxicação provocada pelo *C. botulinum* é classificada como neurotóxica e, é estabelecida pela ingestão de toxina pré-formada no alimento, produzida quando o *C. botulinum* encontra condições favoráveis para se multiplicar. Após uma fase inicial onde podem ocorrer dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreias, aparecem os sintomas neurológicos, os quais caracterizam a doença. Dentre

estes, incluem-se diplopia, perda dos reflexos à luz, disfagia, disfonia, dificuldade de deglutição e paralisia respiratória, que podem levar à morte. A sintomatologia do botulismo alimentar aparece, em média, de 12 a 36 horas após a ingestão do alimento contendo a toxina. Normalmente, este tempo é maior do que para outras intoxicações, pois no botulismo a toxina penetra, também, na corrente sangüínea, atuando no sistema nervoso central, após atingir o trato intestinal (Banwart, 1989; Bryan, 1988; Cliver, 1990).

A espécie *C. sporogenes* PA 3679 é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, não apresentando citocromos, citocromo oxidase, catalase e peroxidase, de forma que meios com baixo potencial de oxirredução são ideais para seu desenvolvimento (Goldoni et al., 1980).

2.5 Biologia de esporos bacterianos

2.5.1 Esporos endógenos

O termo endósporo, derivado de esporos endógenos, refere-se a esporos formados endogenamente, os quais possuem capas com multicamadas, córtex e, citoplasma e núcleo, capaz de resistir a altas temperaturas e doses de radiação normalmente letais para as células vegetativas (Cross, 1970).

Quando há um esgotamento dos nutrientes, ou quando não há disponibilidade de água, algumas bactérias Gram-positivas como as pertencentes ao gênero *Clostridium* formam células especializadas latentes chamadas esporos. Estes são células desidratadas envoltas por espessa parede, o córtex e, por camadas adicionais ou capas. Os esporos são formados no interior da membrana celular e são liberados no meio ambiente onde sobrevivem a extremos de temperaturas, ausência de água e exposição a muitos compostos tóxicos e radiações (Tortora et al., 1993).

A formação de um endósporo bacteriano é um complexo e sofisticado processo de diferenciação estrutural, responsável pelas propriedades de resistência e dormência do esporo (Errington, 1993). No entanto, o sucesso desta estratégia para sobrevivência é dependente da presença no esporo de um mecanismo eficiente, capaz de levar o organismo ao estado vegetativo, seguido de crescimento e multiplicação, quando nutrientes estão disponíveis (Moir et al., 1994).

Geralmente o esporo é esférico, altamente refringente, composto de várias camadas concêntricas (Gombas, 1983). Os esporos são impermeáveis a vários corantes e, caracteristicamente resistentes aos efeitos da temperatura, dessecação, desinfecção química e radiação. Os esporos bacterianos são ímpares quanto a resistência térmica: podem sobreviver à fervura por uma hora, ou mais, sendo destruídos apenas com temperaturas de cerca de 120 °C. Com este nível de resistência, têm sua viabilidade grandemente preservada, há casos descritos de endósporos que permaneceram viáveis por 500 anos (Barbosa & Torres, 1999).

No processo de esporulação, o material genético da bactéria, juntamente com parte do citoplasma, é segregado e envolvido por camadas especiais. Uma informação genética específica e um ambiente fisiológico adequado, interno e externo, são essenciais para a formação do esporo. Determinadas substâncias químicas são também essenciais para que a esporulação se processe: glicose, certos aminoácidos, sais minerais (cálcio, manganês, fosfato e bicarbonato) e fatores de crescimento como vitaminas. Em virtude destas exigências fica evidente que a esporulação não pode ser induzida por qualquer carência ambiental (Barbosa & Torres, 1999).

De acordo com Setlow (1992) normalmente o DNA de uma célula procariótica sofre danos espontâneos devido a despurinização, desaninação, alquilação e oxidação dos nucleotídeos. No entanto, nas células vegetativas estes danos são rapidamente reparados pelos efetivos sistemas enzimáticos. Como os esporos bacterianos não apresentam atividade enzimática, desenvolveram estratégias que evitam o acúmulo de danos potencialmente letais no seu DNA durante o estado de latência, que são:

a- o baixo conteúdo de água retarda as reações químicas que afetam o DNA. Este menor conteúdo de água diminui a taxa de despurinização e reações fotoquímicas do DNA causadas pelos raios ultravioletas (UV), quando comparados com as células vegetativas. A radiação UV não gera dímeros de timina no DNA de um esporo, se não um produto denominado SP (*Spore Photoproduct*) que é um composto similar a timinil-timina;

b- o DNA do esporo se encontra unido a proteínas denominadas alfa/beta-SASP (*small acid soluble proteins*) que diminuem o dano térmico do DNA, evitando a despurinização e alteram a reatividade fotoquímica do DNA frente a UV formando os SP. Estas proteínas se encontram altamente conservadas nos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* e são sintetizadas durante a esporulação e degradadas durante a germinação;

c- o DNA alterado durante a latência é reparado nos primeiros momentos da germinação.

2.6 Estrutura do esporo

Didaticamente a estrutura típica do esporo bacteriano é descrita como organismo mais complexo do que as células vegetativas. A célula germinativa e suas paredes são envoltas pelo córtex, que por sua vez é revestido por capas, sendo a mais densa destas a externa.

Em esporos de *B. cereus* e *B. polymyxa* pode ser encontrada uma camada adicional, o exosporo, envolvendo externamente as capas do esporo, apresentando o interior dos esporos bacterianos essencialmente a mesma constituição. Assim, a maior diferença entre as várias espécies consiste de variações na organização do número e forma das capas dos mesmos (Russel, 1982).

O protoplasto apresenta-se envolto por diversas camadas, sendo o córtex responsável pelo controle da resistência térmica dos esporos. As capas subsequentes

estão envolvidas na resistência a agentes antibacterianos de natureza enzimática e/ou química (Setlow, 1992).

Os esporos bacterianos apresentam como principais constituintes químicos o ácido dipicolínico (DPA, ácido 2,6-dicarboxílico piridina) e o peptideoglicano (mucopeptídeo): hexoses conjugadas cetônicas e carboxílicas, como o ácido diaminopimélico, o ácido 1,5-diamino-dicarboxílico e ácido dipicolínico (Russel, 1982).

2.6.1 Protoplasto

O cerne do esporo é constituído pelo protoplasto. Contém um núcleo completo, todos os componentes do aparelho de síntese de proteínas e é um sistema gerador de energia baseado na glicólise. Os citocromos estão ausentes até mesmo nas espécies aeróbias, cujos esporos dependem de uma via “encurtada” de transporte de elétrons envolvendo flavoproteínas. Algumas enzimas das células vegetativas como alanina-racemase são encontradas em concentrações aumentadas, e verifica-se a formação de várias enzimas exclusivas como a dipicolínico-sintase ácida (Jawetz, 1998).

O núcleo do esporo apresenta a maioria das enzimas, DNA, RNA, íons (cálcio, potássio, magnésio e fósforo). Os constituintes macromoleculares desse núcleo, são relativamente iguais ao de uma célula vegetativa. Isso mostra que as enzimas dos esporos são semelhantes às enzimas das células vegetativas, apresentando, também, os esporos, composição química lipídica similar às das células vegetativas (Russel, 1982).

A localização do DPA no esporo tem sido alvo de diversas investigações. Ensaio de microanálise de raios-X de esporos de *B. cereus* e *B. megaterium* QM b1551 mostraram que o cálcio está distribuído por todo o esporo, acumulando-se principalmente na região central correspondente ao protoplasto. Tendo-se como hipótese que a maioria do DPA está associada de forma quelante com o cálcio, sendo

que essas investigações levam à evidência indireta da localização do DPA principalmente no núcleo ao invés do córtex (Russel, 1982).

Tem-se, também, evidências de que o DPA está em maior quantidade no protoplasto do esporo em relação ao córtex, apresentando o núcleo dos esporos de *B. megaterium* os maiores teores de cálcio, potássio, magnésio, manganês e fósforo. O fato da maior porção de íons metálicos divalentes poder se associar ao DPA, constitui uma evidência adicional para uma localização de DPA no núcleo (Russel, 1982).

2.6.2 Córtex

O córtex é a camada mais espessa do envoltório do esporo. Contém um tipo incomum de peptideoglicano com número reduzido de ligações cruzadas em comparação com as encontradas no peptideoglicano da parede celular. O peptideoglicano do córtex é extremamente sensível à lisozima, e sua autólise desempenha um papel na germinação do esporo (Jawetz, 1998).

A região localizada entre o protoplasto, o núcleo e as capas do esporo é denominada de córtex. A camada interna mais densa (parede primária da célula-mãe, denominada membrana cortical e, parede da célula germinativa) desenvolve a parede da célula emergente quando o córtex é lisado durante a germinação do esporo ativado (Jawetz, 1998; Russel, 1982).

O córtex é amplamente constituído de peptideoglicano (mucopeptídeo ou mureína), que é similar, mas, não idêntico àquele encontrado nas células vegetativas. No córtex, cerca de 45 a 60% do ácido murâmico residual não possui qualquer peptídeo, ou N-acetil substituinte. No entanto forma uma amida interna conhecida como lactâmico murâmico. Considerando que as paredes da célula esporoformadora diferem entre gênero e espécie, a estrutura do córtex parece ser constante (Russel, 1982).

2.6.3 Capas do esporo

Denominadas também de camadas externas laminadas, as capas do esporo compreendem a maior parte dele, ocupando cerca de 50% do seu volume. As capas são constituídas principalmente de proteína, apresentando teores menores de carboidratos complexos e lipídios, sendo ricas em fósforo (Driks, 1999).

Estudos realizados por Russel (1982) sobre a formação e estrutura das camadas do esporo mostram que “esporos extraídos”, ou seja, aqueles onde as capas foram removidas, retêm seu DPA e a refratibilidade, permanecendo, igualmente, resistentes ao calor e à radiação, indicando que as capas não desempenham qualquer função na resistência dos esporos frente a agentes físicos. De forma inversa, tais esporos apresentam maior sensibilidade à lisozima e ao octanol.

2.6.4 Esporulação

A esporulação envolve a produção de muitas estruturas novas, enzimas e metabólitos, juntamente com o aparecimento de muitos componentes celulares da forma vegetativa. Estas alterações representam um verdadeiro processo de diferenciação: ocorre ativação de uma série de genes cujos produtos determinam a formação e a composição final do esporo, enquanto outra série de genes envolvidos na função da célula vegetativa é inativada. Estas alterações envolvem modificações na especificidade de transcrição da RNA-polimerase, determinada pela associação da proteína central da polimerase com uma outra proteína específica promotora, denominada sigma (Errington, 1993; Jawetz, 1998).

2.6.5 Estágios no processo de esporulação

O processo de esporulação é multifásico, cujos estágios ocorrem de maneira sincronizada. Este processo envolve, essencialmente o desenvolvimento de uma célula refratária seguida da síntese de DPA, com posterior desenvolvimento da termorresistência dos esporos. A formação de DPA em *C. roseum* é seguida do aparecimento de corpos refratários (pré-esporo). Uma hora após a quantidade máxima de DPA ter sido produzida, os esporos maduros desenvolvendo resistência térmica começam a ser formados. Essas informações levam a hipótese de que o DPA está diretamente envolvido na resistência térmica do esporo, apesar de que, a despeito de muitas pesquisas, seu papel no esporo ainda permanecer não muito esclarecido (Setlow, 1992).

De acordo com Russel (1982) a esporulação desenvolve-se em sete estágios (I-VII). O tempo final da fase logarítmica de crescimento da cultura da célula vegetativa representa o estágio 0 (zero). Provavelmente, o início da esporulação seja dependente de um estágio específico de duplicação do DNA e RNA, seguido do acúmulo de sais minerais no núcleo da célula. Estes estágios estão assim descritos:

- o estágio pré-septação, quando o material nuclear da célula do bacilo se apresenta na forma de um filamento axial, caracteriza o estágio I;
- quando inicia-se uma fissão assimétrica na célula-mãe, acompanhada da síntese da membrana do pré-esporo e da compartimentalização do DNA, tem-se o estágio II;
- no estágio III, o protoplasto do pré-esporo é envolvido por duas membranas (interna e externa) e grânulos do ácido poli- β -hidróxibutírico são freqüentemente vistos no citoplasma das células vegetativas. Tais membranas dão origem à membrana citoplasmática da forma vegetativa no esporo em germinação;
- no estágio IV, tem-se a síntese do córtex, que é necessário para refratabilidade do esporo e para acúmulo de DPA. Nesta fase, o peptideoglicano é

depositado entre as membranas interna e externa. Há um acúmulo de DPA e captação de íons cálcio que migram para o córtex. Os cátions de cálcio, quelados pelo DPA, são os íons mais importantes no controle da resistência térmica do esporo;

- no estágio V, após obter refratibilidade, mas antes do desenvolvimento da resistência térmica, há o desenvolvimento da resistência ao octanol;

- a maturação do esporo ocorre no estágio VI. Aqui, o material da capa se torna aparentemente mais denso, a refratibilidade do esporo aumenta e é desenvolvida a resistência;

- no estágio VII, ocorre a liberação do esporo após lise da célula-mãe.

2.6.6 Ativação, germinação e crescimento

O processo de transformação de esporos dormentes em células vegetativas é tão complexo quanto a esporogênese, e se dá envolvendo três processos sequenciais: ativação, germinação e crescimento.

2.6.6.1 Ativação

A maioria dos endósporos é incapaz de germinar imediatamente após sua formação. Entretanto, podem germinar após permanecerem em repouso por vários dias, ou inicialmente serem ativados em meio rico, por um agente capaz de lisar a capa do esporo (Jawetz, 1998). Na ativação ocorre a quebra da permeabilidade das barreiras por ativação de enzimas líticas, a ruptura química da capa, do córtex e a ativação do metabolismo de carboidratos (Barbosa & Torres, 1999).

O tratamento dado ao esporo para acelerar seu processo de germinação é denominado de ativação. É um processo responsável pela quebra da dormência no esporo, podendo ser reversível.

2.6.6.2 Germinação

É uma mudança de esporos ativados a partir de um esporo dormente para um metabolicamente ativo, sendo este um processo irreversível. É caracterizada pelo intumescimento do esporo, com formação de um sulco na capa do mesmo que pode servir para a entrada de água e nutrientes (Barbosa & Torres, 1999).

Uma vez ativado, o esporo iniciará o processo de germinação se as condições ambientais forem favoráveis. Diferentes espécies elaboram receptores que reconhecem diferentes efetores como sinalizadores do meio rico. Por conseguinte, a iniciação é deflagrada pela L-alanina numa espécie e pela adenosina em outra. A ligação do efector ativa uma autolisina que rapidamente degrada o peptideoglicano do córtex. A água é captada, ocorre liberação de dipicolinato de cálcio, e verifica-se a degradação de uma variedade de componentes do esporo por enzimas hidrolíticas (Jawetz, 1998).

Experimentalmente, a germinação tem sido determinada de várias maneiras, quais sejam: perda da resistência térmica; perda da resistência térmica acompanhada por variações nas propriedades de coloração, diminuição do índice de refratabilidade e diminuição no peso seco; diminuição da densidade e liberação do DPA (Russel, 1982).

Durante a germinação, a alteração da estrutura do esporo está associada a perda da impermeabilidade, ocorrendo a hidratação de sua estrutura, ativação de enzimas líticas, degradação do córtex e finalmente a liberação de mucopeptídeo (peptideoglicano) e dipicolinato de cálcio. Nesse estágio de diferenciação, o esporo torna-se sensível à altas temperaturas e à altas doses de radiação (Russel, 1982).

2.6.6.3 Crescimento

A partir do fim da germinação é necessário um meio de cultura completo para que a célula germinada possa multiplicar-se. A degradação do córtex e das camadas externas resulta no aparecimento de uma nova célula vegetativa constituída pelo protoplasto do esporo com sua parede circundante. Segue-se um período de biossíntese ativa, sendo que este período termina com a divisão celular (Jawetz, 1998).

No processo pós-germinativo são reconhecidos quatro estágios: inicialmente tem-se o intumescimento, seguido da capa emergente do esporo, alongação do organismo emergente e divisão do organismo alongado.

2.7 Fisiologia da esporulação de *Clostridium*

A exposição de *Clostridium* a condições de depleção de nutrientes ativa uma via metabólica alternativa. A esporulação é a resposta a esta adaptação, a qual se inicia na fase estacionária. Diferente da maioria das respostas adaptativas, a esporulação bacteriana envolve várias vias metabólicas associadas com alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e pode afetar produtos finais associados com o metabolismo energético. Várias alterações envolvem metabólitos associados com a fase estacionária e esporulação. Estudos do processo de esporulação em nível molecular, se iniciaram no gênero *Clostridium*, mas se estenderam a casos de esporoformadores aeróbios, em particular *Bacillus subtilis* (Rood et al., 1997).

Concomitante às modificações morfológicas, ocorrem alterações bioquímicas como diminuição do número de ribossomas, e do teor de RNA

mensageiro, ao mesmo tempo que são sintetizadas novas proteínas e lipídios que formam o envoltório do esporo (Junqueira & Carneiro, 1997).

2.8 Alterações morfológicas durante a esporulação

Os eventos morfológicos durante a esporulação de espécies de *Clostridium* são similares aos ocorridas durante a esporulação de espécies de *Bacillus*. Baseados em estudos de microscopia eletrônica, associados com a determinação de propriedades físicas e bioquímicas, verificou-se que o processo de esporulação apresenta sete estágios (Johnstone & Holland, 1977; Labbé & Rufner, 1980; Long et al., 1983; Shakhbanov, 1980). O sétimo estágio está associado com a autólise do esporângio e liberação do esporo maduro. O processo de esporulação, embora seja induzido por privação de nutrientes, causa uma diminuição no “pool” de guanosina trifosfato (GTP) (Johnstone & Holland, 1977).

Células vegetativas e em esporulação, da mesma espécie de *Clostridium* exibem freqüentemente formas distintas. Por exemplo, em meio rico em glicose, na fase estacionária células de *C. perfringens* são relativamente pequenas, ao passo que em meio de esporulação rico em amido, estas são longas. Embora este não seja o caso de todos os clostrídios, as alterações morfológicas fornecem uma ferramenta útil para observação em laboratório. A esporulação é também fundamental na classificação de *Clostridium*. No caso da espécie *C. perfringens*, uma enterotoxina é produzida durante o processo de esporulação (Rood et al., 1997).

2.9 Esporulação *In vitro*

Embora a esporulação geralmente seja iniciada por uma falta de nutrientes, clostrídios necessitam de uma fonte de energia para a síntese macromolecular durante

a esporulação e as células podem morrer se um ou mais nutrientes estiverem completamente ausentes. No entanto, nem todas as espécies de *Clostridium* podem esporular bem em meio de laboratório em função de sua esporulação ser altamente específica (Rood et al., 1997).

Altos níveis de esporulação de certas espécies de *Clostridium*, tal como *C. perfringens*, são notoriamente difíceis de serem encontrados, o que tem resultado em numerosas modificações para se definir um meio complexo. Diversos reagentes tais como cafeína e isobutilmetilxantina têm sido apontados como responsáveis pelo aumento da esporulação em clostrídios, embora seus efeitos sejam um tanto espécie-específico e concentração-dependente. O efeito da esporulação aumentada por esses compostos é caracterizado pela redução do crescimento e por sua habilidade em inibir a síntese macromolecular (Sacks & Thompson, 1977). Por serem os compostos da família metilxantina análogos aos das purinas Setlow & Sacks (1983) relacionaram seus mecanismos de ação aos da privação de purina em *B. subtilis*, isto é, uma diminuição no “pool” de GTP. Verificou-se que guanossina (1mM) pode suprir a esporulação e aumentar o crescimento vegetativo em espécies de *Clostridium*, embora, uma quantidade excessiva de sais de bile humana possa resultar em um pobre crescimento e também em pobre esporulação (Heredia et al., 1992).

Carboidrato rapidamente metabolizável tal como a glicose é geralmente evitado no meio de esporulação por ser vigorosamente fermentado por certas espécies sacarolíticas de *Clostridium*, resultando em considerável produção de ácido (Labbé & Rey, 1979). Neste caso a melhora da esporulação de *C. perfringens* tem sido feita pelo ajuste do valor do pH inicial do meio de esporulação para 7,8 com carbonato de sódio, o qual contribui para a capacidade tampão do meio (Harmon & Kautter, 1986).

A composição de carboidratos específicos no meio de esporulação também afeta a habilidade para a esporulação. A esporulação de *C. perfringens* é inibida por altas concentrações (> 15mM) de glicose, maltose, manose, lactose, sacarose e frutose (Shih & Labbé, 1996). No caso de *C. botulinum* um nível de 270 mM de glicose diminui a esporulação de 80 para 30%. No entanto, algumas cepas de *C. botulinum* exigem glicose para crescimento (Witmer & Johson, 1988). Uma alta concentração de

glicose também inibe a esporulação de *C. thermosaccharolyticum*, mas estimula a esporulação em *C. acetobutylicum* (Long et al., 1984). Ababouch & Busta (1985) relataram que um aumento na concentração de glicose (de 0,2 a 1%) retarda o começo da esporulação em *C. sporogenes* e, resulta num aumento no número de esporos.

Suplementação do meio de esporulação com Mn^{+2} e Zn^{+2} 1 mM aumenta a esporulação de *C. botulinum* e resulta em aumento dos esporos. No entanto, Fe^{+2} é menos efetivo na mesma concentração (Kihm et al., 1990) e, menos esporulação de *C. botulinum* é observada se Cu^{+2} (0,5-1,0 mM) está presente no meio contendo Zn^{+2} (Kihm et al., 1988).

2.10 Regulação molecular da esporulação

Tem-se sugerido que os processos de esporulação em *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.* apresentam mecanismos moleculares semelhantes. Todavia pouca atenção tem sido dada às análises genéticas deste último, apesar de sua considerável importância biotecnológica.

Em *Bacillus spp.* a fosforilação da proteína regulatória Spo0A controla a iniciação da esporulação e, também, a alteração na expressão de genes que ocorrem durante a transição na fase estacionária (Perego et al., 1989). Homólogos spo0A de *B. subtilis* e genes IVB tem sido identificados em seis espécies de *Clostridium* apresentando três regiões altamente conservadas dentro do domínio efector. Tais homólogos estão ausentes em várias bactérias não formadoras de esporos altamente relacionadas com *B. subtilis* (Brown et al., 1994).

RNA citoplasmático (scRNA) é um estável e abundante RNA de aproximadamente 270 nucleotídeos de *B. subtilis* (Struck et al., 1988). Este é um dos constituintes da partícula de reconhecimento de sinal (SRP) e consiste de quatro domínios, baseados na estrutura secundária, sendo os domínios I e II necessários para

a formação da resistência térmica dos esporos (Nishiguchi et al., 1994). Recentes evidências indicam que um scRNA de *C. perfringens*, de um tamanho similar ao scRNA de *B. subtilis*, apresenta 70% de homologia na sequência primária (Nakamura et al., 1995).

É evidente que algumas características do complexo regulatório em *B. subtilis* estão conservadas em *C. acetobutylicum*. Inserções de transposons podem ocorrer em 12, ou mais, sítios cromossômicos nos quais normalmente expressam os sinais, onde induzem a produção de solvente e a esporulação. Uma variedade de classes de solventes observados em tais mutantes sugere vários níveis de controle de solventogênese em *C. acetobutylicum*. Em *B. subtilis* quatro fatores sigma específicos da esporulação σ^E , σ^F , σ^G e σ^K estão envolvidos no processo. Genes homólogos à esses fatores sigma estão presentes em *C. acetobutylicum* e, têm sido clonados e sequenciados. Análises de hibridização indicam a presença de σ^H , σ^D e homólogos spoIID e, outra vez, indicam a conservação evolucionária do mecanismo molecular de esporulação nos membros dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (Sauer et al., 1994; Wong et al., 1995).

2.11 Resistência térmica do endósporo bacteriano

A resistência térmica microbiana é afetada por vários fatores, tais como a temperatura de esporulação (Beaman & Gerhardt, 1986; Sala et al., 1994), pH e composição do meio de esporulação (López et al., 1996; Mazas et al., 1995). Outros fenômenos que influenciam a resistência térmica de esporos bacterianos foram investigados por Etoa & Michieli (1988) os quais encontraram uma “resistência induzida pelo calor” após tratamento térmico de esporos a temperaturas subletais.

A termorresistência dos esporos bacterianos é afetada pela desmineralização para esporos protonados e remineralização para esporos calcificados. Foi verificado que o aumento da mineralização provoca redução no conteúdo de água do

protoplasto, o que foi relacionado com o aumento da resistência térmica (Beaman & Gerhardt, 1986).

Mallidis & Scholefield (1987) observaram que existe uma relação entre a quantidade de ácido dipicolínico e cálcio presente no esporo e a resistência térmica. A resistência térmica dos esporos pode estar relacionada com o aumento da desidratação do protoplasto (Beaman et al., 1982; Nakashio & Gerhardt, 1985).

De acordo com Mallidis & Scholefield (1985) existe uma relação entre a velocidade de morte do esporo e a velocidade de liberação de ácido dipicolínico. Eles concluíram que o ácido dipicolínico exerce vital importância no mecanismo de resistência térmica.

A resistência térmica de esporos bacterianos ao calor, tem sido estudada por microbiologistas por mais de um século, apresentando grande importância prática em relação a desinfecção e esterilização. Microrganismos altamente resistentes ao calor representam sério problema no processamento de alimentos, devido à exigência de severo tratamento térmico para eliminá-los. Tal tratamento pode afetar a qualidade do alimento processado. Fatores que afetam a resistência de bactérias e esporos bacterianos no processamento incluem agentes físicos e químicos, número e tipo de bactéria e natureza do meio de suspensão. Esporos e células vegetativas são geralmente mais resistentes em lípides que em sistemas aquosos (Shansuzzaman & Lucht, 1993).

A termorresistência dos esporos bacterianos é de grande interesse na conservação de alimentos pelo calor. Acredita-se que a termorresistência dos esporos é devido a três fatores: a desidratação do protoplasto, mineralização e adaptação ao calor (Jay, 1996). O protoplasto do esporo é rico em Ca^{+2} e ácido dipicolínico, que reagem e formam dipicolinato de cálcio. Acredita-se que o conteúdo de água do protoplasto determina o grau de termorresistência de um esporo (Beaman et al., 1982; Nakashio & Gerhardt, 1985).

A resistência térmica de endósporos bacterianos é tradicionalmente estabelecida pelo aquecimento em meio laboratorial e algumas vezes em alimentos, mas subsequente sua habilidade para crescer é determinada em um meio de

cultivo sob condições ótimas, quanto ao pH, Aa e temperatura de incubação (Quintavalla et. al., 1994).

A habilidade de esporos bacterianos para sobreviver ao tratamento térmico (80-121⁰C) é usualmente medida pela subsequente presença de unidades formadoras de colônias (UFC). Para ser considerado viável, um esporo deve sofrer germinação, emergir, alongar e posteriormente apresentar divisão celular. Eventos pós-tratamento térmico influem na recuperação devido à injúria térmica. Tais eventos incluem controle genético, reparo do DNA danificado, presença de fatores nutricionais e compostos inibitórios (Hutton, 1991).

De acordo com Beaman & Gerhardt (1986), os esporos de uma determinada espécie, formados a temperatura máxima são mais termorresistentes que os formados a baixas temperaturas. Parece que o conteúdo de água do protoplasto é diminuído por sua adaptação ao calor, formando esporos mais termorresistentes. Os esporos das cepas bacterianas causadoras de intoxicações alimentares diferem quanto à resistência térmica, sendo que alguns apresentam termorresistência igual aos esporos das bactérias termófilas, enquanto outros são ainda mais resistentes (Weiss & Strong, 1967).

A termorresistência dos esporos bacterianos pode ser estimada conhecendo-se os parâmetros: temperatura ótima de crescimento, temperatura de esporulação, conteúdo de água no protoplasto, conteúdo mineral total e específico do esporo e espessura do córtex (Marquis & Sim, 1994).

Esporos bacterianos formados em temperaturas de incubação elevadas, porém aceitáveis para o crescimento ótimo das formas vegetativas, geralmente são desidratados, tornando-se mais termorresistentes (Beaman & Gerhardt, 1986). O córtex mantém o estado de desidratação no protoplasto, adquirido no início da esporulação (Marquis & Sim, 1994).

Modernas teorias do mecanismo de dormência do esporo propõem que fatores relativos a desidratação do protoplasto central, devido ao peptideoglicano circundante que o envolve e mantém o protoplasto com baixo estado de água. No entanto, o exato mecanismo pelo qual isso ocorre, não está claro. Tem-se sugerido

que a contração do córtex comprima a água no protoplasto. Alternativamente, ele pode funcionar como uma organela osmoreguladora (Gould & Dring, 1975) atuando pela expansão do córtex (Alderton & Snell, 1963), ou cresce radialmente de forma que comprime a água no protoplasto, essencialmente pela osmose reversa. Isso reduz a efetiva atividade de água dentro do protoplasto para valores próximos de 0,75, o qual poderá ser suficientemente baixo para levar a resistência térmica de enzimas no seu interior (Algie, 1980).

2.12 Avaliação da termorresistência

A avaliação da termorresistência de células vegetativas e de esporos é baseada na determinação do valor “D” (Russel, 1982; Stumbo, 1973). De acordo com Stumbo (1973) o valor D corresponde ao tempo em minutos, em uma determinada temperatura, capaz de reduzir em 90% o número de células ou esporos presentes em um meio considerado.

No que se refere ao tratamento térmico aplicado à população microbiana homogênea, em condições padronizadas, o número de microrganismos sobreviventes representa o efeito deste processo. A sobrevivência dos bioindicadores, após serem submetidos aos processos de higienização segundo os códigos oficiais, é determinada mediante semeadura e incubação em condições favoráveis (United... 1995).

2.13 Tratamentos térmicos

A mais importante causa de deterioração dos alimentos, manifesta-se através dos microrganismos, que durante seu crescimento apresentam atividade metabólica (Leitão, 1988).

De acordo com Mossel & Moreno-Garcia (1993), os processos de conservação de alimentos baseiam-se na inibição e/ou destruição dos microrganismos patogênicos e/ou deterioradores. Portanto, processos de modificação do ambiente, inibidores ou destruidores da microbiota contaminante do alimento são empregados.

A forma mais antiga, segura e confiável de esterilização é por calor úmido na forma de vapor saturado. Vapor úmido não é tóxico, pode ser facilmente controlado e é relativamente barato. É universalmente conhecido como método de preferência, exceto, para itens susceptíveis à danificação pelo calor úmido, utilizando-se assim o calor seco (Pflug & Odlaug, 1986; Young, 1993).

Os métodos de esterilização tem por finalidade destruir todas as formas de vida, animal ou vegetal, macroscópica ou microscópica, saprófitas ou não, presentes no produto considerado, sem garantir a inativação completa de toxinas ou enzimas nas células (Farmacopéia... 1988).

De acordo com Graham & Boris (1993) o termo estéril significa a ausência total de microrganismos e o termo esterilizar refere-se ao efeito do processo químico, ou físico, utilizado para destruir as formas de vida presentes em um material.

Para Lee et al. (1979) a esterilidade absoluta (100% de morte) teoricamente não existe, devido a natureza logarítmica da cinética de morte microbiana.

O tratamento dos alimentos pelo calor é o processo mais eficiente e, mais utilizado, apresentando a grande vantagem de ser inócuo ao consumidor. Portanto, o estudo da resistência térmica dos microrganismos é de extraordinário interesse prático (Tortora et al., 1993).

A esterilização pelo calor seco é considerada um processo de oxidação dos constituintes químicos dos microrganismos, que são desidratados antes que a temperatura cause a denaturação protéica (Young, 1993).

2.14 Desenvolvimento de um indicador biológico

Com o propósito de dar segurança ao processo de esterilização executado, utiliza-se bioindicadores de conhecidos níveis de população microbiana (Reich et al., 1979).

De acordo com Vessoni-Penna et al. (1994), o indicador biológico é representado por esporos de microrganismos que apresentam máxima resistência ao agente destrutivo ao qual será submetido o produto que deve ser conservado. Se toda a população de esporos presentes no indicador biológico foi destruída, há que se considerar que todos os microrganismos presentes no produto tratado foram destruídos, havendo segurança e garantia de conservação do produto no prazo estipulado para seu consumo.

Para Rampal et al. (1984), um indicador biológico satisfatório deve apresentar maior termorresistência ao processo de esterilização do que os microrganismos originalmente presentes no material a ser esterilizado.

As culturas de microrganismos viáveis, resistentes ao processo de esterilização podem ser usadas na forma de suspensão, ou impregnadas em veículos como por exemplo fitas de papel de filtro, sendo imprescindível não haver interferência do veículo na resistência do microrganismo (United... 1995).

Quando os bioindicadores são usados na forma de suspensão, estes são adicionados à unidades representativas da carga a ser esterilizada e quando impregnados em veículos deverão ser colocados em posições estratégicas, garantindo uma homogeneidade de ação em todo os pontos da câmara esterilizante (Farmacopéia... 1988; United... 1995).

De acordo com Vessoni-Penna (1994), o bioindicador é o parâmetro escolhido para certificar-se de que o nível de esterilidade estabelecido para o produto é alcançado, conferindo a certeza de esterilidade frente à margem de segurança mínima definida de apenas 1 unidade contaminada em 10^6 unidades de produto processado.

2.15 Estudos sobre termorresistência em condições de $A_a < 1,00$

Bruch & Smith (1968) utilizaram esporos de *B. subtilis* var *niger* inoculados em pedaços de filmes de Kapton e Teflon e demonstraram que ocorriam diferenças nos valores Z (corresponde ao intervalo de temperatura necessário para que a curva da destruição térmica atravessasse um ciclo logarítmico) e D , apresentando $Z = 29,1^\circ\text{C}$ para Kapton e $Z = 139^\circ\text{C}$ para os esporos inoculados em Teflon. Essa diferença observada estaria relacionada com a A_a reinante no ambiente em que os esporos se encontravam, pois o Kapton é permeável ao vapor d'água formado durante o processo, enquanto que o Teflon, por ser impermeável, permitiu um aquecimento dos esporos em ambiente de A_a intermediária, apresentando assim, esporos com alta termorresistência.

Utilizando o método descrito pela "National Cannery Association" King Junior et al. (1969) avaliaram a resistência térmica de *Byssoschlamys fulva*. A termorresistência era determinada em suco de uva reconstituído e suco de uva concentrado. Encontraram valores $Z = 6,1^\circ\text{C}$ no experimento com suco reconstituído e $Z = 6,7^\circ\text{C}$ para o experimento com suco concentrado. Para as diferentes cepas obtidas de coleções de culturas, os valores D encontrados a $87,8^\circ\text{C}$ oscilaram entre 48 e 8,5 minutos, enquanto que para a cepa original do suco o valor D encontrado foi de 11,3 minutos.

Um equipamento experimental para avaliar o emprego da radiação infravermelha na esterilização por calor seco foi desenvolvido por Molin & Östlund (1975). Eles utilizaram como indicador biológico esporos de *B. subtilis* ATCC 6333 inoculados em laminulas de microscopia, sendo estas posteriormente equilibradas por 3 a 10 dias a uma umidade relativa de 79% a 21°C . Nas temperaturas estudadas (130 e 180°C) a A_a variou de 0,001 a 0,005. Nos valores baixos de A_a reinantes, a resistência foi função apenas da temperatura, tendo sido detectada em todas as

temperaturas uma fração da população com maior resistência. Esta diferença na resistência térmica foi atribuída a fatores fisiológicos dos esporos no momento da coleta.

Estudando o efeito sinérgico do tratamento térmico com calor úmido e seco conjugados com radiação, Fisher & Pflug (1977) submeteram esporos de *B. subtilis* a doses de radiação de 5,10 e 20 Krad/h, com temperaturas que oscilaram entre 76 e 125 °C e Aa variando de 0,25 a 0,82 nos tratamentos por calor seco. Os esporos foram inoculados em plaquetas de aço de 127x127 mm e equilibrados em Aa = 0,50 por 2 horas. Os esporos irradiados a 110 °C apresentaram maior valor D no intervalo de Aa de 0,30 a 0,40. Estes pesquisadores estabeleceram um coeficiente de sinergismo (SI), o qual demonstrou que maiores efeitos sinérgicos são obtidos com o binômio calor seco-radiação (SI = 0,25) do que com binômio calor úmido-radiação (SI = 1,50).

Avaliando a termorresistência de esporos de *B. subtilis* var *niger* em sistema fechado, visando a descontaminação de espaçonaves, Peeler et al. (1977) inocularam esporos em cadinho de aço inoxidável, os quais foram fechados em latas de 57,2 x 73 mm com P₂O₅ ou água em quantidade necessária para se obter Aa diferentes no ambiente. Em experimentos preliminares nas temperaturas de 113 °C e 125 °C onde a Aa variou de 0,00 a 1,00, mas nos experimentos definitivos as temperaturas oscilaram de 85 a 120 °C, apresentando Aa menor que 0,01 e igual 1,00. O aquecimento foi feito em banho de silicone, havendo necessidade de correção do tempo de aquecimento e resfriamento das latas. Os resultados obtidos, por contagem dos sobreviventes em placas, não se adaptaram a modelos matemáticos ou mecânicos, o que levou esses pesquisadores a determinar a resistência térmica pelo método do número mais provável (NMP).

Molin (1977b) estudou comparativamente a resistência térmica de esporos de *B. cereus* NCTB 9372, *B. coagulan* NCTB 9365, *B. megaterium* NCTB 9376, *B. polymyxa* NCTB 8185, *B. pumilus* NCTB 10337, *B. stearothermophilus* ATCC 7953, *B. stearothermophilus* NCTB 10339, *B. subtilis* NCTB 8054 e *B. subtilis* var *niger*

ATCC 9372 ao calor seco, empregando equipamento de radiação infravermelho. Os esporos foram acondicionados a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $Aa = 0,33$ por um período de 3 a 10 dias, submetidos a tratamento térmico com temperaturas variando de 90 a 180°C . Neste intervalo de temperatura, os esporos de *B. subtilis* var *niger* ATCC 9372 apresentaram um valor D maior que os demais microrganismos.

Neste mesmo ano Molin (1977a) estudou a variação do valor Z de esporos de *B. subtilis* var *niger* e *B. stearothermophilus* frente a calor seco, tendo sido empregado o equipamento de radiação infravermelho (Molin & Östlund, 1975). Para *B. stearothermophilus* o gráfico do valor D foi linear entre 150 e 180°C com $Z = 29^{\circ}\text{C}$, mas desviou-se da linearidade em temperaturas mais baixas, com decréscimo do valor Z, enquanto que para *B. subtilis* var *niger* o gráfico foi linear em intervalos de 37 a 190°C com valor $Z = 23^{\circ}\text{C}$.

Srimani & Loncin (1980) avaliaram a termorresistência de esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* nas temperaturas de 115 a 148°C . Os autores observaram que os valores D permaneceram constantes em temperaturas acima de 135°C . Os valores Z determinados para *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* foram 3,3 e $6,4^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Contiero (1984) estudou a termorresistência de conidiosporos de *Aspergillus parasiticus* 403, produtor de aflatoxina B1 e G1, estocados em suspensão aquosa a 5°C . Antes de serem submetidos ao tratamento térmico com ar superaquecido, os conidiosporos eram secos a vácuo, sendo acondicionados em ambiente com $Aa = 0,75$ por 48 horas. As temperaturas de tratamento oscilaram de 50 a 120°C e os valores D encontrados foram de 24 minutos a 100°C e $Aa = 0,0332$; 22,5 minutos a 105°C e $Aa = 0,027$; 11,5 minutos a 110°C e $Aa = 0,024$ e 9,0 minutos a 115°C e $Aa = 0,019$.

Roemer (1975) ressalta que nas indústrias que usam mais amplamente o calor seco, não há ainda uma norma definida de aplicação geral, mesmo sendo a aplicação de calor seco mais restrita que a do calor úmido, que é melhor bactericida, havendo a necessidade de estudos complementares, pois, existem equipamentos e produtos, em cuja esterilização não pode ser usado o calor úmido.

A falta de dados precisos sobre a resistência de microrganismos tratados por vapor superaquecido está explicitamente caracterizada no artigo publicado por Collier & Townsend (1955). Estes pesquisadores estudaram o comportamento de esporos de *B. stearothermophilus* 1518 e *B. polimyxa* em um sistema de enlatamento asséptico fabricado pela indústria James Dole Engineering Company, o qual difundia-se na indústria de alimentos. Neste trabalho evidenciou-se a variação de resistência de *B. polimyxa* e de *B. stearothermophilus* 1518 em função da umidade do meio de tratamento. Desde então, o interesse pelo comportamento de microrganismos sob tratamento térmico em ambiente de atividade de água menor que 1,00 ampliou-se.

Murrell & Scott (1966), em trabalho clássico na área, utilizaram esporos liofilizados de *B. megaterium*, *B. stearothermophilus* ATCC 7953, *B. coagulans*, *C. botulinum* E ATCC 9564, *C. botulinum* B ATCC 7949 e *C. bifermentans* acondicionados na presença de soluções controladoras da Aa, mas sem contato físico entre ambos. Eles evidenciaram que a resistência térmica dos esporos testados era máxima no intervalo de atividade de água de 0,20 a 0,40. O tratamento térmico feito com as mesmas suspensões de esporos comprovou uma total desvinculação entre resistência térmica ao calor úmido ($Aa = 1,00$) e a resistência ao calor seco ($Aa < 1,00$).

Hoffman et al. (1968) utilizaram uma placa de aquecimento com esporos de *B. subtilis* var *niger* inoculados em lâminas de aço de 13x13x0,3 mm para avaliar a resistência térmica destes acondicionados antes do tratamento a 25 °C por 48 horas em ambientes com 11%, 33% e 85% de umidade relativa. A disposição do equipamento utilizado caracterizou um sistema aberto, o que nas temperaturas de tratamento (125 °C, 135 °C e 164 °C) correspondia a uma Aa menor que 0,03. Estes pesquisadores determinaram que a Aa não teve influência sobre a termorresistência durante o tratamento, por conseguinte, a Aa do acondicionamento teve influência marcante, apresentando os esporos mais úmidos maior termorresistência.

Para desenvolver sua teoria sobre a não linearidade da resistência térmica de esporos, Toda (1970) utilizou esporos de *B. subtilis*, e propôs uma ativação em estágios múltiplos sucessivos, com a possibilidade dos esporos passarem de um estágio de ativação para o seguinte, ou diretamente, para o estágio “não viável”. Concluiu que a não homogeneidade é função da temperatura e que a dependência de Z é muito complexa.

Estudando a ação conjugada de radiação e calor seco na inativação de esporos, Emborg (1974) utilizou esporos de *B. subtilis*, *B. globigii* ATCC 9372 e *B. sphaericus* que eram inoculados em folha de polietileno e acondicionados em umidade relativa de 30% por 12 horas, sendo em seguida, tratados simultaneamente por radiação (25 a 75 Krad/h) e calor seco a 100 °C. O pesquisador verificou que nas condições testadas o *B. sphaericus* mostrou-se mais resistente.

Estudando a elevação da resistência térmica de várias cepas de *C. sporogenes* após choque térmico Alcock (1984) verificou que, usando tampão de ácido dimetil glutárico/NaOH, o choque térmico tem um efeito máximo sobre a resistência térmica, e que o choque térmico a 80 ou 100 °C aumenta a resistência aparente ao aquecimento a 121,1 °C.

Com a finalidade de estudar o efeito de gases (ar, He, N₂, O₂ e CO₂) sobre a inativação térmica por calor seco nos esporos de *B. subtilis* 5230 e *C. sporogenes* PA 3679-45, Pheil et al. (1967) inocularam esporos em cadinho de estanho (11 x 8 mm) e após a secagem a vácuo a 25 °C por 25 horas, dez unidades eram fechadas em latas especiais "TDT cans" (64 x 8 mm). Em atmosfera dos gases em estudo, procedendo o tratamento térmico em autoclave a 121,1 °C, 132,3 °C, 143,3 °C, 148,9 °C, 154,5 °C e 160 °C. Pelos resultados obtidos, estes autores verificaram que a resistência de *B. subtilis* 5230 foi maior a temperaturas abaixo de 143,3 °C, com todos os gases; entre 143,3 °C e 148,9 °C as resistências se equivalem, apresentando *C. sporogenes* PA 3679-45 a maior resistência acima de 148,9 °C, em função de seu valor Z maior. Os valores D são maiores em He e N₂ para ambos os microrganismos,

não influenciando o peso molecular dos gases na distribuição energética, nem mostrando o oxigênio, especial efeito inativador, como anteriormente era suposto.

Mallidis & Scholefield (1985), desenvolveram uma técnica simples e precisa para a determinação da resistência térmica de esporos. Esta técnica consiste na combinação de um tubo capilar modificado com um sólido aquecido. O microrganismo utilizado para obtenção de resultados experimentais foi *B. stearothermophilus* e, a temperatura utilizada foi de 120 °C. Os resultados mostraram precisão e reprodutibilidade.

Prado Filho e Kiefer (1974), publicaram artigo apresentando o esquema de construção de um equipamento para tratamento térmico de esporos de bactérias em correntes de gases, à pressão atmosférica, na qual a Aa podia ser parcialmente controlada em temperaturas entre 100 °C e 200 °C.

Uma câmara de tratamento térmico de esporos de microrganismos frente a vapor superaquecido foi apresentado por Grisotto (1992), no qual utilizou como organismo-teste esporos de *B. subtilis* var *niger* ATCC 9372 utilizando temperaturas de 128 °C, 137 °C, 143 °C e 150 °C, correspondendo respectivamente as Aa médias de 0,40, 0,30, 0,25 e 0,20, nas condições dos experimentos. Prado Filho & Grisotto (1994) pesquisaram os parâmetros técnicos do equipamento acima citado, obtendo valores D médios de 242, 14,60, 32,86 e 9, 72 minutos, respectivamente, à 128 °C, 143 °C, 137 °C e 150 °C.

Resultados de pesquisas sobre a inativação por calor seco, com esporos isolados do solo das dependências do Centro Espacial do Cabo Kennedy, foram publicadas por Reynolds et al. (1974). O equipamento utilizado foi uma estufa com volume de 0,016 m³ e circulação de ar, que a 25 °C tinha UR = 30 ± 1%, empregando temperaturas entre 105 e 125 °C, com e sem tratamento dos esporos por radiação. Foi detectada uma fração da população com D = 29 h a 125 °C, sendo este valor D maior que o valor de *B. subtilis* var *niger* tomado como padrão de resistência ao calor seco. Em todas as temperaturas foram evidenciadas duas frações distintas da população, sendo que a mais resistente representava apenas cerca de 1% do total.

Para estudar a cinética de inativação de esporos de *C. sporogenes* PA 3679, Rodrigo et al. (1993), usaram uma versão modificada de um termorresistor controlado por computador. Os pesquisadores utilizaram tampão fosfato e extrato de cogumelo acidificado com ácido cítrico em temperaturas variando entre 121 e 143 °C e determinaram que os valores D diminuíram exponencialmente quando a temperatura aumentava, mas, a acidificação não reduziu a resistência a altas temperaturas.

Lynch & Potter (1988) estudaram os efeitos dos ácidos málico, acético, cítrico, láctico e clorídrico sobre a inativação térmica de *B. coagulans* e *B. stearothermophilus* em salsichas do tipo “frankfurter”. Os resultados mostraram que para *B. coagulans* a 105 °C e a 110 °C em pH = 4,5 não houve diferenças na ativação dos esporos entre os tratamentos com os cinco ácidos. No entanto nas mesmas temperaturas em pH = 4,2 houve rápida inativação. Com *B. stearothermophilus* a 121 °C em pH = 5,2 não observaram diferenças nas taxas de morte térmica, mas em pH = 4,6 houve aumento na inativação dos esporos quando, usados os ácidos acético, cítrico e láctico.

Esporos de *B. stearothermophilus* CNCH 5781 suspensos em água destilada foram submetidos a temperaturas subletais de 63 e 110 °C para ativação térmica de germinação. Após este choque térmico, os esporos foram submetidos a um tratamento à 121 °C, apresentando um valor D = 3,5 minutos (Etoa & Mitchiels, 1988).

Maggi et al. (1996), estudando a possibilidade de preservação de alimentos de baixa acidez por tratamento de alta pressão combinado com tratamento térmico, avaliaram a inativação de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 em 3 meios líquidos (caldo de carne, caldo de cenoura e tampão fosfato), todos com pH = 7,0 a uma pressão de 600-1500 Mpa e temperaturas de 20, 60, 80 e 90 °C. A 1500 Mpa e temperatura de 20 °C, por cinco minutos não houve efeito nos esporos; já com uma pressão de 1500 Mpa a 60 °C os esporos foram totalmente inativados. A uma pressão de 800 Mpa e temperatura de 80-90 °C, em caldo de carne e de cenoura, a concentração de 10^5 de esporos foi totalmente esterilizada.

Ocio et al. (1994) avaliaram o papel do pH, tipo de ácido e substrato nas características de resistência térmica de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 em cogumelos enlatados. Determinaram a resistência térmica dos esporos em temperaturas de 110 e 121 °C em extrato de cogumelos acidificados e não acidificados, usando tampão fosfato como meio de referência. Em extratos acidificados, a resistência térmica (valor D) foi dependente do pH; os valores D aumentaram em meios não acidificados. Diferenças em valores D em ambos os substratos foram dependentes da temperatura, chegando os autores a conclusão de que o pH e a natureza do substrato afetam a resistência dos esporos.

Estudando a resistência térmica de esporos de *C. botulinum* 62 A e 213 B em vários meios de aquecimento, incluindo alimentos de baixa acidez, Alderton et al. (1976) constataram que a resistência térmica dos esporos pode ser aumentada ou diminuída mudando-se os meios de germinação dos esporos, ou seja, da forma resistente calcificada (germinação na presença de Ca), para a forma sensível hidrogenada (germinação na presença de HCl). Quando a resistência é medida em ervilhas e aspargos, ambos os esporos advindos da cultura pura apresentaram uma fração potencialmente mais resistente. Os esporos tanto do *Clostridium botulinum* 62 como o 213 B, quando presentes em alimentos de baixa acidez, podem ser sensibilizados no pH normal do alimento.

Alderton et al. (1980) realizaram pesquisas a respeito da resistência térmica de *C. botulinum* G 2A, onde esporos liofilizados foram submetidos a temperaturas de 125 a 160 °C, em ambientes com atividade de água variando de 0,00 a 0,90. Os métodos utilizados foram os mesmos descritos por Alderton & Snell (1970). Os pesquisadores verificaram que com a diminuição da umidade ambiente, a resistência dos esporos cresce, apresentando a 130 °C e $A_a = 0,40$ um $D = 24,2$ minutos.

A resistência térmica de *B. subtilis* var *niger* ATCC 9372, *B. stearothermophilus* 1518, *C. sporogenes* ATCC 19404 ao calor seco (120 °C com $A_a < 0,012$) e ao vapor superaquecido (120 °C, $A_a = 0,51$), com e sem tratamento prévio com ácido peracético ou água oxigenada foi estudada por Han (1977). Os esporos foram previamente deixados por 48 horas em ambiente cujas

atividades de água apresentaram valores de 1,00, 0,76, 0,33, 0,00. O pesquisador utilizou o equipamento descrito por Prado Filho & Kiefer (1974), com entrada adicional de vapor fluente. Em ar com atividade de água baixa (120°C , $A_a < 0,012$) esporos de *B. subtilis* ATCC 9372 apresentaram maior resistência que esporos de *B. stearothermophilus* 1518. Em vapor superaquecido (120°C , $A_a = 0,51$) a situação inverteu-se, porém a diferença foi muito menor. Em ambas as condições o *C. sporogenes* apresentou menor resistência, cerca de dez vezes inferior a de *B. subtilis* var niger ATCC 9372.

Esporos de *C. perfringens* NTCC 8798 apresentaram aumento da sensibilidade ao cloreto de sódio e a mistura de polimixina e neomicina, quando aquecidos a temperaturas de 70 a 100°C . Isto é provocado por esses agentes porque o coeficiente de temperatura induz danos celulares que conduziram ao aumento da sensibilidade. Já na ausência desses agentes, os esporos recuperam a resistência quase ao mesmo tempo, e as combinações desses agentes inibidores apresentam menor efeito sobre os esporos, do que cada um empregado individualmente (Chumney & Adams, 1980).

Quast et al. (1977) utilizaram um equipamento asséptico marca DOLE para estudar a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* 1518 frente a calor seco. Nas temperaturas estudadas (152°C , $155,6^{\circ}\text{C}$ e 159°C) a atividade de água teria variado entre 0,15 e 0,20. Com base nos valores D obtidos nessas temperaturas, os autores calcularam um valor $Z=7^{\circ}\text{C}$ e por extrapolação concluíram que 6,3 minutos a 170°C é suficiente para causar uma redução de 10 potências na população de *B. stearothermophilus*, sendo essa recomendação segura também para o *C. botulinum*, considerado 10 vezes menos resistente que o organismo pesquisado.

Um banco de dados sobre a resistência térmica de esporos bacterianos, esporulação, aquecimento, recuperação de esporos e tempo de redução decimal a diferentes temperaturas foi publicado por Brown (1988). Este permite uma rápida

manipulação de uma grande quantidade de análises de informações relativas a resistência térmica de esporos bacterianos.

Morton et al. (1990) determinaram a resistência térmica de esporos de *C. butyricum* toxigênicos e não toxigênicos e verificaram que as cepas toxigênicas apresentam um valor D a 212 °F (100 °C) de 4,7 minutos, e valor D a 170 °F (76,7°C) de 2,3 a 2,5 minutos para as cepas não toxigênicas em pH 7,0.

Tapia Tapia (1997) avaliou a termorresistência de esporos de *B. cereus* IAL 2599 frente a vapor superaquecido utilizando temperaturas de 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 °C, que correspondem respectivamente às Aa médias de 0,95, 0,67, 0,48, 0,35, 0,26, 0,20 e 0,15 . O autor obteve valores D médios de 10, 30, 50, 20, 20, 10 e 5 minutos respectivamente, a 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Microrganismo

Cepas de *C. sporogenes* PA 3679 da coleção de culturas da Fundação de Pesquisas Tropicais "André Toselo"- Campinas, São Paulo, foram utilizados como organismo teste.

3.1.2 Meios de cultura para produção dos esporos, e para contagem das UFC mL⁻¹ pós-tratamento térmico

Para ativação dos esporos liofilizados e posterior esporulação dos mesmos foi utilizado 50g do meio de "Beef heart Infusion" DIFCO, acrescido de 10g de triptona, 5g de dextrose, 3g de citrato de sódio, 1g de extrato de levedura e 5g de caseína, em um litro de água destilada. Para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹), pós-tratamento térmico, foi usada a composição supracitada adicionando-se 1,5% de ágar-ágar. Após preparo dos meios de cultura, o pH era ajustado para 7,8 com NaOH 0,5%, estes foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

3.1.3 Equipamento para tratamento térmico dos esporos

Para tratamento térmico dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679 com vapor superaquecido foi utilizado o equipamento experimental descrito por Prado Filho & Grisotto (1994). Este é constituído de um gerador de vapor de água à pressão ambiente, de uma seção tubular de ajuste da temperatura do vapor gerado e, portanto, da atividade de água do mesmo e, de uma câmara de tratamento de esporos (Figura 1 e Figura 2).

Para que os esporos fossem submetidos ao tratamento térmico, estes eram inoculados em lâminas de alumínio fixadas em um suporte feito de níquel-cromo (Grisotto, 1992).

3.1.4 Controladores da umidade no ambiente de acondicionamento

Para controlar a umidade ambiental durante o período de acondicionamento, foram utilizados solução de cloreto de cobre a uma $A_w = 0,67$ e sílica gel a $A_w = 0,00$ mantidos em estufa a 30 °C.

Figura 1 - Esquema geral do equipamento de tratamento térmico de esporos (Prado Filho 1987a).

Figura 2 - Esquema da câmara de tratamento (Grisotto 1992).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Produção de esporos

A produção de esporos de *C. sporogenes* PA 3679, foi realizada segundo o método recomendado por Goldoni et al. (1980). Para promover anaerobiose utilizou-se uma jarra de anaerobiose com capacidade de 3 litros e um gerador de atmosfera, ambos da marca Probac.

Completada a esporulação, o meio contendo os esporos foi centrifugado a 2.500 gravidades por 15 minutos, separando-se a massa de esporos. Esta foi ressuspensa em água destilada esterilizada e novamente centrifugada, sendo esta operação repetida por mais cinco vezes. Após a última centrifugação, os esporos foram transferidos para um tubo de ensaio com 20 mL de água destilada estéril e estocados a 4 °C, constituindo a suspensão estoque.

Posteriormente esta suspensão sofreu diluições para contagem dos esporos em câmara de Neubauer, de acordo com a metodologia descrita por Collins & Lyne (1970). A suspensão estoque continha $2,05 \times 10^9$ esporos mL⁻¹, tendo sido diluída à $2,05 \times 10^7$ esporos mL⁻¹ para inoculação das lâminas portadoras de esporos.

3.2.2 Preparo de amostras para tratamento térmico

O preparo das amostras para o tratamento térmico seguiu o mesmo manejo utilizado por Prado Filho (1987b), utilizando-se lâminas de alumínio medindo 10x15x0,02 mm, fixadas em suportes de fio de níquel-cromo por mínima dobradura das extremidades. As lâminas portadoras de esporos eram colocadas em canaletas de alumínio dentro de placas de Petri, impedindo, assim, que rolassem. O conjunto era esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

As lâminas após serem esterilizadas, eram inoculadas com 25 µL da suspensão diluída, contendo cada lâmina inoculada $5,125 \times 10^6$ esporos mL⁻¹. As placas com as lâminas já inoculadas foram transferidas para um dessecador, onde promovia-se vácuo por 15 minutos, tempo este, suficiente para a evaporação da água contida no inóculo. Decorrido este período, permitia-se vagarosamente a entrada de ar filtrado por algodão.

3.2.3 Acondicionamento das amostras

Após a inoculação dos esporos como descrito no item 3.2.2, estes eram acondicionados em Aa = 0,00 e Aa = 0,67 por 90 dias, sendo que a cada 30 dias era feito um tratamento térmico frente a vapor superaquecido.

Para o acondicionamento foram utilizados recipientes plásticos de 1.500 mL, medindo 140 mm de altura e 110 mm de diâmetro, sendo estes previamente sanitizados com solução de hipoclorito e sódio a 1%. Nos recipientes contendo separadamente solução saturada de cloreto de cobre e sílica gel (Figura 3), foram ainda introduzidos suportes de cortiça e madeira, para evitar o contato direto das placas de Petri contendo as lâminas inoculadas com os controladores de Aa do ambiente (Murrel & Scott, 1966).

Figura 3 - Recipiente plástico contendo solução saturada de cloreto de cobre.

Os esporos que permaneceram em solução aquosa por 70 semanas a 4 °C, foram inoculados como descrito no item 3.2.2, acondicionados em $Aa = 0,00$ e $Aa = 0,67$, sendo o acondicionamento feito em recipiente plástico de 400 mL, apresentando este um orifício na parte superior, pelo qual media-se a umidade relativa reinante no ambiente.

Posteriormente, os recipientes contendo as placas de Petri foram vedados com fita gomada, evitando assim, que a umidade externa interviesse no ambiente interno. Depois de lacrados, estes foram mantidos em estufa, a uma temperatura de 30 °C.

3.2.4 Manuseio e tratamento térmico das amostras para determinação da temperatura de maior resistência térmica dos esporos

Tendo o equipamento utilizado para o tratamento térmico atingido a temperatura desejada, com o auxílio de uma pinça previamente flambada transferia-se o suporte contendo o inóculo para a câmara de tratamento, sendo este posicionado na horizontal com a face inoculada voltada para cima, fechando-se a gaveta da câmara de tratamento. Imediatamente um cronômetro elétrico era acionado para aferir o tempo de tratamento.

Após o tratamento o conjunto suporte-lâmina era retirado e colocado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de uma solução de Tween a 0,01%, tendo ainda 0,5g de areia lavada esterilizada, com granulação menor que 100 Tyler.

Para determinar a temperatura de maior resistência, utilizou-se esporos não acondicionados e, as temperaturas de tratamento com vapor superaquecido foram de 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 °C, que correspondem às atividades de água de 0,95, 0,67, 0,48, 0,35, 0,26, 0,20 e 0,15, respectivamente, nas pressões atmosféricas médias locais de 715 Torr, Piracicaba - SP. Os tempos de tratamentos foram de 10 a 180 minutos. Após a aplicação do estresse térmico, para determinação das UFC, as amostras foram manipuladas em duplicata em cada experimento. A temperatura de maior resistência térmica foi determinada experimentalmente, em função do número de

unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) passíveis de serem contadas após os tratamentos.

3.2.5 Avaliação da resistência térmica

Para avaliar previamente a termorresistência dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679 na temperaturas utilizadas no estudo, foi empregada a fórmula proposta por Stumbo (1973), $D = t / (\log a - \log b)$, onde:

D = tempo necessário para destruir 90% da população microbiana;

t = tempo total de tratamento da amostra escolhida;

a = número de esporos viáveis no início do tratamento;

b = número de esporos viáveis no final do tratamento.

3.2.6 Determinação do tempo máximo de sobrevivência de esporos acondicionados, na temperatura de resistência máxima

Em uma primeira fase de estudo foi determinada a temperatura em que os esporos apresentavam maior termorresistência. As condições prévias a que são expostos os esporos, entre a sua formação e sua eventual inativação térmica, influem fortemente na expressão da resistência térmica. Na segunda fase do estudo, os esporos foram expostos, entre a produção e o tratamento térmico, a um pré-acondicionamento em ambientes de Aa controlada, com vistas a determinar o nível de influência do acondicionamento na resistência térmica. Conforme descrito no item 3.2.4, esporos acondicionados por 30, 60 e 90 dias e esporos mantidos em suspensão aquosa por 70 semanas acondicionados como citado no item 3.2.3, bem como os armazenados e acondicionados da mesma maneira, foram posteriormente mantidos em UR = 95% e submetidos a tratamento térmico à 140 °C por 90, 120, 150 e 180 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações sobreviventes de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 expostas aos tratamentos térmicos estão representadas na forma de Tabelas e Figuras. Estas foram agrupadas em relação às temperaturas de tratamento térmico a que foram submetidos os esporos. Para os intervalos de tempo de exposição, à mesma temperatura letal e constante, foram calculadas as médias logarítmicas das populações sobreviventes.

Nas Tabelas de 1 a 4, têm-se os valores D obtidos segundo a fórmula proposta por Stumbo (1973), e pode-se observar que em todas as temperaturas os valores D crescem com o aumento do tempo de tratamento, o que indica que frações de resistência maior que a média são evidenciadas na população estudada, dependendo do número de esporos empregados na inoculação.

Observa-se ainda, valores D crescentes de forma descontínua em uma mesma temperatura. A ocorrência aleatória de valores D menores, em uma série de valores D crescentes com tempos de tratamento maiores, comprova o fenômeno de ativação de esporos não detectados em tempos de tratamento menores. Esta ocorrência é devida ao fato de mecanismos de ativação de esporos por calor seco serem diversos dos mecanismos de ativação por calor úmido (Berg & Sandine, 1970; Bond & Favero, 1971).

Apesar de já ter sido abordada e documentada por vários pesquisadores (Alderton & Snell, 1970; Prado Filho et al., 1996; Schull et al., 1963; Toda, 1970), a influências dos fenômenos de ativação-inativação simultâneos e/ou sequenciais e, da não homogeneidade de populações, devido a distribuição gaussiana normal, na termorresistência de esporos mostram-se complexas e, ainda são objeto de estudos.

Tabela 1 - Cálculo do valor D* dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679 não acondicionados, tratados em diferentes temperaturas.

Tempo (minutos)	Valor D (minutos)						
	100°C	110°C	120°C	130°C	140°C	150°C	160°C
	Aa=0,95	Aa=0,67	Aa=0,48	Aa=0,33	Aa=0,26	Aa=0,20	Aa=0,15
10	3,92	2,92	3,09	3,89	2,81	4,41	4,31
20	5,67	6,37	8,69	6,08	5,75	6,76	5,68
30	12,00	7,41	10,14	9,01	8,96	9,09	7,83
40	9,43	12,08	17,39	15,38	11,79	17,02	12,50
50	1,19	19,31	15,11	12,05	10,42	13,05	15,24
60	13,54	20,69	15,58	15,63	14,53	17,05	12,54
70	15,02	19,44	16,47	14,34	15,69	13,57	14,71
80	18,02	16,99	19,05	19,09	20,15	19,32	14,92
90	20,74	20,18	21,53	21,33	18,67	21,48	16,69
120	17,88	17,88	22,77	23,21	24,95	22,47	17,88
150	22,35	22,35	22,35	22,35	22,35	22,35	22,35
180	26,83	26,83	26,83	26,83	26,83	26,83	26,83

* calculado através da fórmula de Stumbo (1973) $D = t / (\log a - \log b)$.

Tabela 2 Cálculo do valor D^* dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679 acondicionados durante 30, 60 e 90 dias a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo de Tratamento (minutos)	Valor D (minutos)	
		Aa = 0,00	Aa = 0,67
30	90	32,49	27,61
	120	63,16	38,71
	150	35,89	32,89
	180	26,83	26,83
60	90	23,94	22,50
	120	53,89	44,61
	150	37,31	26,41
	180	26,83	26,83
90	90	30,61	23,44
	120	62,50	36,81
	150	39,16	28,19
	180	26,83	26,83

* calculado através da fórmula de Stumbo (1973) $D = t / (\log a - \log b)$.

Tabela 3 Cálculo do valor D^* dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados durante 30, 60 e 90 dias a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo de Tratamento (minutos)	Valor D (minutos)	
		Aa = 0,00	Aa = 0,67
30	90	32,14	27,27
	120	62,50	38,22
	150	35,29	33,19
	180	26,83	26,83
60	90	23,75	22,22
	120	53,33	45,28
	150	36,86	26,79
	180	26,83	26,83
90	90	30,51	23,32
	120	60,00	37,15
	150	38,86	27,88
	180	26,83	26,83

* calculado através da fórmula de Stumbo (1973) $D = t / (\log a - \log b)$.

Tabela 4 - Cálculo do valor D^* dos esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C, acondicionados durante 30, 60 e 90 dias a 30 °C; posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo de Tratamento (minutos)	Valor D (minutos)	
		Aa = 0,00	Aa = 0,67
30	90	32,03	27,02
	120	59,11	38,09
	150	34,97	33,41
	180	26,83	26,83
60	90	23,68	22,11
	120	52,40	44,94
	150	36,59	26,83
	180	26,83	26,83
90	90	30,82	23,19
	120	59,11	28,81
	150	39,83	27,78
	180	26,83	26,83

* calculado através da fórmula de Stumbo (1973) $D = t / (\log a - \log b)$.

Os resultados foram utilizados para a construção das curvas de sobreviventes referentes a cada temperatura de tratamento. Estas foram obtidas da relação entre o $\log \text{UFC mL}^{-1}$ e o tempo de exposição à temperatura letal mantida constante. Através da curva foram obtidos os parâmetros de termorresistência do microrganismo.

Primeiramente determinou-se a resistência dos esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 frente a vapor superaquecido. Esses apresentaram maior termorresistência à 140 °C, correspondendo a uma atividade de água média de 0,26. A ativação de alguns esporos, enquanto, no mesmo período, outros estão sendo inativados, torna a aplicação da fórmula de Stumbo (1973) imprecisa em estudos de inativação por vapor superaquecido em A_a menor que 1,00.

Na determinação da temperatura de maior termorresistência dos esporos estudados, observou-se que em todos os tratamentos a inativação térmica não seguiu uma equação de primeira ordem. No entanto, Tapia-Tapia (1997) tratando esporos de *Bacillus cereus* Ial 2599 frente a vapor superaquecido determinou como 140 °C a temperatura de maior resistência, apresentando estes, uma curva de sobrevivência logarítmica.

Nas Figuras de 4 a 10 podem-se observar as curvas de inativação térmica dos esporos sem acondicionamento, verificando-se os fenômenos de ativação-inativação de esporos dormentes com o aumento do tempo de tratamento, em cada uma das temperaturas estudadas.

Nos tratamentos sem acondicionamento, nas diferentes temperaturas a um tempo de 120 minutos, verificou-se uma fração de esporos resistentes, isto em função da distribuição gaussiana normal da resistência numa população de esporos, sendo a probabilidade de detectá-los tanto maior quanto maior o número de esporos no inóculo inicial.

No presente estudo, a fórmula de Stumbo (1973) foi utilizada como indicadora da maior resistência no âmbito das temperaturas estudadas, e, confirma que esporos bacterianos apresentam sua maior resistência entre $A_a = 0,20$ e $A_a = 0,40$ (Murrel & Scott, 1966; Prado Filho, 1987b; Tapia-Tapia, 1997).

Figura 4 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 100 °C a uma Aa média = 0,95.

Figura 5 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 110 °C a uma Aa média = 0,67.

Figura 6 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 120 °C a uma Aa média = 0,48.

Figura 7 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 130 °C a uma Aa média = 0,33.

Figura 8 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 9 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 150 °C a uma Aa média = 0,20.

Figura 10 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 sem acondicionamento, tratados a 160 °C a uma Aa média = 0,15.

Pelos dados apresentados na Tabela 5 verifica-se que os esporos tratados a temperatura de 140 °C a um tempo de 90 minutos diferem significativamente dos demais. Observa-se também que a 120 minutos de tratamento térmico nas temperaturas de 120, 130, 140 e 150 °C, estes diferem estatisticamente entre si. Determinou-se a temperatura de 140 °C a de maior resistência térmica dos esporos, apresentando esta no período de 120 minutos o maior número de sobreviventes.

Tabela 5 - Médias do Log UFC mL⁻¹ nas temperaturas de maior termorresistência dos esporos não acondicionados.

Temperatura (°C)	Tempo de 90 minutos (média Log UFC)*	Tempo de 120 minutos (média Log UFC)*
120	2,53 b	1,44 bc
130	2,49 b	1,54 b
140	1,89 a	1,90 a
150	2,52 b	1,37 c

* médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Nas Figuras de 11 a 16 observa-se o transcurso da inativação térmica de esporos acondicionados a $A_a = 0,00$ e $A_a = 0,67$ por 30, 60 e 90 dias, podendo-se observar que no tratamento de 150 minutos a 140 °C a uma A_a média = 0,26 os esporos acondicionados à $A_a = 0,00$, em qualquer dos períodos de acondicionamento, mostram maior resistência térmica que os acondicionados à $A_a = 0,67$, sendo o número de UFC mL⁻¹ viáveis dos primeiros, cerca de uma potência de dez superior ao número dos segundos. Ainda, pode-se observar que independente do tempo de acondicionamento em atividades de água diferentes, tem-se ausência de UFC após o tratamento térmico de 180 minutos, ou seja, esterilização completa.

Comparando-se as Figuras 13 e 16 é possível notar que ambos os acondicionamentos, $A_a = 0,00$ e $A_a = 0,67$ quando mantidos por 90 dias, conferem maior resistência aos esporos acondicionados, que em acondicionamentos mais curtos. Isto é mostrado pelo número médio de UFC mL⁻¹ a 150 minutos de tratamento térmico (Apêndices 1 a 13).

A ocorrência de ativação, com 150 minutos sob estresse térmico, indica que com 120 minutos de tratamento as UFC mL⁻¹ detectadas como viáveis não correspondem a todos os esporos que sobreviveram ao tratamento, embora, não detectados como tal, nas condições experimentais, o número desses esporos ainda dormentes, não pode ser avaliado com a metodologia experimental empregada.

Figura 11 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 12 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 13 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 14 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 15 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 16 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Pela análise dos dados da Tabela 6 verifica-se que os esporos acondicionados por 30, 60 e 90 dias em Aa = 0,00 e Aa = 0,67, a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26 por 90 e 120 minutos são significativamente diferentes a nível de 95% de confiança, apresentando em Aa = 0,00 num tempo de 150 minutos o maior número de sobreviventes.

Tabela 6 - Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	Aa = 0,00 (médias Log UFC) *	Aa = 0,67 (médias Log UFC) *
30	90	3,94 a	3,45 b
	120	4,81 a	3,61 b
	150	2,53 a	2,15 b
60	90	2,95 a	2,71 b
	120	4,45 a	4,12 b
	150	2,69 a	1,03 b
90	90	3,77 a	2,87 b
	120	4,79 a	3,45 b
	150	2,88 a	1,39 b

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Através da comparação estatística entre o número de UFC mL⁻¹ médio nos tratamentos de 140 °C por 90 e 120 minutos dos esporos não acondicionados e dos acondicionados em Aa = 0,00 e Aa = 0,67, a 30 °C, por 30, 60 e 90 dias, verifica-se que estes são estatisticamente diferentes a nível de 95% de confiança (Tabela 7 e Tabela 8).

Tabela 7 - Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos não acondicionados e acondicionados em Aa = 0,00, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	Não acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)	Acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	1,89 a	3,94 b
	120	1,90 a	4,81 b
60	90	1,89 a	2,95 b
	120	1,90 a	4,45 b
90	90	1,89 a	3,77 b
	120	1,90 a	4,79 b

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Tabela 8 - Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos não acondicionados e acondicionados em Aa = 0,67, a 30 °C tratados a 140 °C.

Dias	Tempo (minutos)	Não acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)	Acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	1,89 a	3,45 b
	120	1,90 a	3,61b
60	90	1,89 a	2,71 b
	120	1,90 a	4,12 b
90	90	1,89 a	2,87 b
	120	1,90 a	3,45 b

*médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

O processo de ativação-inativação térmica simultâneos e/ou sequenciais de esporos armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados a $A_a = 0,00$ e $A_a = 0,67$ por 30, 60 e 90 dias a 30 °C, tratados a 140 °C a uma A_a média = 0,26, pode ser observado nas Figuras 17 a 22.

Levinson & Hyatt (1971) discordaram do fenômeno de ativação-inativação simultâneos, atribuindo as variações na determinação do tempo de redução decimal apenas à distribuição log-normal da resistência. Tal conceito, é baseado no trabalho de Vaz & Proszt (1957), no entanto, não teve repercussão significativa.

Avaliando o efeito das condições de armazenamento na resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* Cook & Gilbert (1968) verificaram que a termorresistência dos esporos avaliados apresentou-se inalterada em esporos armazenados por 52 semanas a 4 °C ou 65 semanas a 16 °C.

Figura 17 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4°C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 18 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4°C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 19 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 20 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4°C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 30 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 21 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 60 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 22 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 90 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

As curvas de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 30 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26, podem ser observados nas Figuras de 23 a 28.

Figura 23 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 30 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 24 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4°C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30°C, durante 60 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma média = 0,26.

Figura 25 - Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, durante 90 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 26 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 30 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa = 0,26.

Figura 27 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 60 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Figura 28 – Curva de sobreviventes de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, durante 90 dias, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Pelos resultados das Tabelas 9 e 10, observa-se que nos diferentes acondicionamentos não houve diferenças estatisticamente detectáveis ao nível de 95% de confiança.

Comparando-se as médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos acondicionados em Aa = 0,00 e Aa = 0,67, a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26 bem como, os armazenados por 70 semanas em suspensão aquosa a 4 °C e acondicionados (Tabelas 11 e 12) verifica-se que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança, mostrando que, independente do período de armazenamento, os esporos mantiveram a mesma termoresistência, devendo-se isto ao acondicionamento que promove aos esporos um estado de maior resistência quando submetidos ao estresse térmico.

Na análise estatística das médias do Log de UFC mL⁻¹ de esporos armazenados por 70 semanas acondicionados por 30, 60 e 90 dias em Aa = 0,00 e Aa = 0,67, a 30 °C, e os armazenados e acondicionados nas mesmas condições, sendo estes posteriormente mantidos por 15 dias em UR = 95% (Tabelas 13 e 14), verificou-se que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança. Isso mostra que após o acondicionamento nas diferentes Aa, este promoveu um aumento da termorresistência dos esporos e que, mesmo sendo estes transferidos para uma atmosfera de UR = 95% por 15 dias não foi possível promover a hidratação dos esporos, e assim, influenciar na sua sensibilidade ao ratamento térmico frente a vapor superaquecido.

Tabela 9 – Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas acondicionados em Aa diferentes, a 30 °C e tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	Aa = 0,00 (médias UFC mL ⁻¹)	Aa = 0,67 (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	3,91 a	3,41 b
	120	4,79 a	3,57 b
	150	2,46 a	2,19 b
60	90	2,92 a	2,66 b
	120	4,46 a	4,06 b
	150	2,64 a	1,11 b
90	90	3,76 a	2,85 b
	120	4,71 a	3,48 b
	150	2,85 a	1,33 b

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Tabela 10 - Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas acondicionados em diferentes Aa a 30 °C, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	Aa = 0,00 (médias UFC mL ⁻¹)	Aa = 0,67 (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	3,90 a	3,38 b
	120	4,68 a	3,56 b
	150	2,42 a	2,22 b
60	90	2,91 a	2,64 b
	120	4,42 a	4,04 b
	150	2,61 a	1,12 b
90	90	3,79 a	2,83 b
	120	4,68 a	3,45 b
	150	2,83 a	1,31 b

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Tabela 11 – Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00, a 30 °C tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26, bem como dos armazenados por 70 semanas em suspensão aquosa a 4 °C e acondicionados.

Dias	Tempo (minutos)	Acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)	Armazenados e acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	3,94 a	3,91 a
	120	4,81 a	4,79 a
	150	2,53 a	2,46 a
60	90	2,95 a	2,92 a
	120	4,45 a	4,46 a
	150	2,69 a	2,64 a
90	90	3,77 a	3,76 a
	120	4,79 a	4,71 a
	150	2,88 a	2,85 a

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Tabela 12 – Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,67, a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26, bem como dos armazenados por 70 semanas em suspensão aquosa a 4 °C e acondicionados.

Dias	Tempo (minutos)	Acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)	Armazenados e acondicionados (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	3,45 a	3,41 a
	120	3,61 a	3,57 a
	150	2,15 a	2,19 a
60	90	2,71 a	2,66 a
	120	4,12 a	4,06 a
	150	1,03 a	1,11 a
90	90	2,87 a	2,85 a
	120	3,45 a	3,48 a
	150	1,39 a	1,33 a

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Tabela 13 – Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa por 70 semanas a 4 °C, acondicionados em Aa = 0,00 a 30°C, bem como dos armazenados por 70 semanas nas mesmas condições, acondicionados e posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	Armazenados/70semanas (médias UFC mL ⁻¹)	Armazenados/70 semanas/UR=95% (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	3,91 a	3,90 a
	120	4,79 a	4,68 a
	150	2,46 a	2,42 a
60	90	2,92 a	2,91 a
	120	4,46 a	4,42 a
	150	2,64 a	2,61 a
90	90	3,76 a	3,79 a
	120	4,71 a	4,68 a
	150	2,85 a	2,83 a

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Tabela 14 – Médias do Log UFC mL⁻¹ de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa por 70 semanas a 4 °C, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, bem como dos armazenados por 70 semanas nas mesmas condições, acondicionados e posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	Armazenados/70semanas (médias UFC mL ⁻¹)	Armazenados/70 semanas/UR=95% (médias UFC mL ⁻¹)
30	90	3,41 a	3,38 a
	120	4,57 a	3,56 a
	150	2,19 a	2,22 a
60	90	2,66 a	2,64 a
	120	4,06 a	4,04 a
	150	1,11 a	1,12 a
90	90	2,85 a	2,83 a
	120	3,48 a	3,45 a
	150	1,33 a	1,31 a

* médias seguidas por letras distintas entre as colunas diferem entre si pela distribuição *t* de Student $p < 0,05$.

Observando as Figuras 4 a 28 verifica-se uma baixa correlação nos dados, isto em decorrência do processo de ativação e/ou inativação simultâneos observado quando se utiliza para tratamento térmico o calor seco com vapor superaquecido. Estas também mostrando que existe uma interação complexa entre os fatores tempo de tratamento-temperatura-atividade de água que não pode ser representada por uma reação de primeira ordem, como geralmente é admitido para a inativação térmica de esporos bacterianos em ambientes de calor úmido.

A dispersão dos resultados observados nas Figuras de número 4 a 28 é resultante da ação combinada de fenômenos de ativação/inativação simultâneos e aleatórios, dependendo dos tempos de tratamentos utilizados. Estes fenômenos foram observados por Quast et al. (1977) em pesquisa com esporos de *B. stearothermophilus* 1518 tratados por calor seco.

Através da análise visual das micrografias com aumento da ordem de 50.000 vezes (Figura 29), feitas através de microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar que não houve diferença física da capa dos esporos, as quais se apresentaram íntegras, ressaltando-se também, que o armazenamento e/ou acondicionamento não promovem alterações físicas visíveis nos esporos, garantindo assim, sua capacidade de manter a termorresistência.

Figura 29 - Micrografias de esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679 através de microscopia eletrônica de varredura. (A) esporos sem acondicionamento. (B) esporos acondicionados em Aa = 0,00 por 90 dias. (C) esporos acondicionados em Aa = 0,67 por 90 dias. (D) esporos armazenados em suspensão aquosa por 70 semanas.

Em trabalhos sobre resistência térmica de esporos, o aparecimento de queda rápida inicial, ou de “ombros”, está associado à variação da resposta de populações a um choque térmico, que teoricamente deveria ativar todos os esporos sem ter ação letal. Por conseguinte, esta total ativação nem sempre é encontrada na prática, sendo este fato explicado pela presença de mecanismos diversos de ativação pelo calor a baixas e a altas temperaturas (Berg & Sandine, 1970).

As equações das quais pode-se inferir um valor D para a inativação térmica, quando esta ocorre seguindo uma equação de primeira ordem, não são, aplicáveis a tratamentos térmicos com vapor superaquecido, com precisão satisfatória. Isto se deve ao fato de vários fatores agirem simultaneamente, sendo sua somatória um efeito complexo.

Pode-se determinar que uma maior heterogeneidade da população de esporos em função do modo de conservação da suspensão de esporos, contribui para um menor D da população não acondicionada. Isto porque a agitação de suspensões de esporos antes de seu uso fazia com que parte dos esporos ficassem aderidos às paredes do tubo de ensaio. Após o uso, o tubo de ensaio mantido em refrigerador conteria esporos em suspensão aquosa, e esporos em ambiente com Aa igual a 1,00, porém, sem contato com a água. No momento de uma nova utilização da suspensão, estes esporos aderidos às paredes do tubo de ensaio seriam trazidos à suspensão e, devido ao curto tempo decorrido entre o contato destes com a suspensão e o tratamento térmico, provavelmente estes não apresentassem o mesmo grau de hidratação do córtex. Resultados semelhantes foram observados por Reyes et al., (1981) com esporos de *B. subtilis* var *niger*, equilibrados a Aa = 1,00 em contato direto e sem contato com tampão fosfato.

A diferença da resistência térmica entre os esporos não acondicionados e acondicionados pode ser explicada pela teoria do córtex expandido formulada por pesquisadores como (Bhothipaksa & Busta, 1978; Gould, 1977 e 1978; Gould & Dring, 1975).

Os resultados obtidos nesta pesquisa com *C. sporogenes* PA 3679 são úteis para fornecer dados experimentais sobre o comportamento deste microrganismo frente a vapor superaquecido, em situações de variação de Aa, bem como mostrar que não se deve inferir que um aumento de temperatura signifique obrigatoriamente uma redução do valor D. Com exceção da temperatura de 100 °C, que deve ser considerada como tratamento úmido, as demais temperaturas fornecem algum subsídio para uma avaliação prévia limitada do conjunto tempo-custo-eficiência de uma esterilização com vapor superaquecido.

Em trabalhos de termorresistência com acondicionamento de esporos bacterianos, estes devem ser mantidos em condições de temperatura e umidade próximas àquelas em que se encontram as peças a esterilizar, ou descontaminar, garantindo uma maior exatidão e segurança do processo.

Quaisquer que tenham sido as modificações físicas, estruturais ou fisiológicas conferidas pelos acondicionamentos dos esporos, tais alterações não são eficazes frente a um tratamento térmico de 180 minutos, o qual inativa todos os esporos, resultando em contagem nula do número de UFC mL⁻¹. Neste aspecto, esporos de *C. sporogenes* PA 3679 mostram-se muito menos resistentes que esporos de *B. cereus*, os quais sobrevivem por um período de até 4,5 horas, sob estresse térmico similar (Carmo, 1997).

No presente estudo os coeficientes de correlação calculados, apresentados juntamente com as equações de regressão, Figuras 4 a 28, mostraram-se relativamente baixos. Este fato mostra que o tempo de tratamento (eixo X) tem pequena influência sobre o número de sobreviventes (eixo Y), mostrando, também, que o conceito de equação de primeira ordem é impreciso em experimentos de inativação por vapor superaquecido em Aa variável com a temperatura e pressão do ambiente.

O vapor superaquecido tem sua Aa variável conforme a temperatura de superaquecimento e, a mesma é, também, dependente da pressão ambiental. A ação do trinômio temperatura do vapor superaquecido-atividade de água - tempo de exposição

ao estresse térmico leva a um efeito final não previsível pelo método usual de cálculo do valor D .

Devido a alta resistência dos esporos bacterianos às condições ambientais adversas, estes são usados como indicadores biológicos na avaliação do nível de esterilidade atingido, e de possíveis falhas operacionais. Em quaisquer circunstâncias deve-se considerar que o emprego de bioindicadores não é uma simples aplicação de modelos matemáticos, e que o comportamento do microrganismo “in vivo” pode ser diferente daquele observado “in vitro”.

Em experimentos de descontaminação/esterilização com vapor superaquecido, é indispensável que os eventuais indicadores biológicos sejam expostos à condições similares àquelas das populações naturais que se deseja inativar e, que numa eventual transferência de resultados de laboratório para condições práticas, o vapor superaquecido apresente as mesmas propriedades físicas de temperatura, e Aa que aquelas empregadas no estudo. A ação estressante do vapor superaquecido não é extrapolável, por cálculo, de um temperatura para outra.

5 CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste trabalho foram as seguintes:

- Os esporos não acondicionados apresentaram maior termorresistência a temperatura de 140 °C por um tempo de 120 minutos.
- O acondicionamento em Aa = 0,00 e Aa = 0,67, aumenta a resistência térmica dos esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679.
- O armazenamento dos esporos por 70 semanas em suspensão aquosa, não influi na resistência térmica nos esporos de *C. sporogenes* PA 3679.
- A manutenção dos esporos acondicionados em Aa= 0,00 e Aa=0,67, a 30 °C, em UR = 95% por 15 dias, não influenciou na termoresistência dos mesmos.
- Os esporos visualizados através de microscopia eletrônica de varredura apresentaram suas capas externas íntegras, nos diferentes momentos da análise.
- A destruição da população homogênea de esporos de *C. sporogenes* PA 3679, não foi considerada logarítmica, equivalente à cinética química de uma reação de primeira ordem, ou seja, a representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes em relação ao tempo de exposição à temperatura constante não resultou em curva logarítmica decrescente.
- A fórmula tradicional para o cálculo de resistência térmica preconizada por Stumbo (1973) mostrou-se imprecisa para aplicação aos resultados numéricos encontrados em todas as temperaturas estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L.; BUSTA, F. F. Adaptation of biphasic culture technique to the sporulation of *Clostridium sporogenes* PA3679: Effect of glucose concentration on spore yield and heat resistance. **Food Microbiology**, v.2, p.107-114, 1985.
- ALCOCK, S. Evaluation of heat resistance of *Clostridium sporogenes* following heat shock. **Food Microbiology**, v.1, n.1 p.39-41, 1984.
- ALDER, V. G.; SIMPSON, R. A. . Heat sterilization : a sterilization and disinfection by heat methods. In: RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFE, G.A.T. **Principles and pratices of disinfection, preservation and sterilization**. Oxford: Blackwell Scientific, 1992. cap. 18, p.483-511.
- ALDERTON, G.; SNELL, N. Gas exchange and heat resistance in bacterial spores. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.10, p.139-143, 1963.
- ALDERTON, G.; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores heat resistance and its kinetics of intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, n.4, p.56-572, 1970.
- ALDERTON, G.; ITO, K, A.; CHEN, J. K. Chemical manipulation of the heat resistance of *Clostridium botulinum* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.31, p.492-498, 1976
- ALDERTON, G; CHEN, J. K.; ITO, K. A. Resistance forms of *Clostridium botulinum* 62 A spores over the water activity range 0 to 0.9. **Applied and Environmental Microbiology**, v.30, n.3, p. 51-55, 1980.

- ALGIE, J. E. The heat resistance of bacterial spores due their partial dehydration by reverse osmosis. **Current Microbiology**, v.3, p.287-290, 1980.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE REFEIÇÕES COLETIVAS. De olho no PAT. **Cozinha Industrial**, n.6, p.21-22, 1990.
- BANWART, G. J. **Basic food microbiology**. New York: Van Nostrand Reynold, 1989. 519 p.
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1999. 196p.
- BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.1242-1246, 1986.
- BEAMAN, T.C.; GREENAMYRE, J. T.; CORNER, T. R.; PANKRATZ, H. S.; GERHARDT, P. Bacterial spore resistance correlated with water content, density, and protoplast/sporoplast volume ratio. **Journal of Bacteriology**, v.150, p.870-877, 1982.
- BECKERS, H. J. Incidence of foodborne diseases in the Netherlands: annual summary 1982 and overview from 1972 to 1982. **Journal of Food Protection**, v.51, n.4, p.327-334, 1988.
- BERGY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 784 p.
- BERG, R. W.; SANDINE, N. E. Activation of bacterial spores. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v.33, p.435-441, 1970.
- BHOTHIPAKSA, K.; BUSTA, F. F. Osmotically induced increase in thermal resistance of heat-sensitive, dipicolinic acidless spores of *B. cereus* HT-8. **Applied and Environment Microbiology**, v.35, n.4, p. 800-808, 1978.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. **Química do processamento de alimentos**. Campinas: Fundação Cargill, 1984. 232p.
- BOND W. W.; FAVERO, M. S. Relative frequency distribution of D_{125} values for spores isoaltes from Mariner-Mars 1969 space craft. **Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.832-836, 1971.

- BRUCH, K. M; SMITH, W. F. Dry heat resistance of spores of *Bacillus subtilis* var *niger* on Kapton and Teflon film at high temperatures. **Applied Microbiology**, v.16, p.1842-1846, 1968.
- BRYAN, F. L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v.51, n.8, p.663-673, 1988.
- BROWN, D.; GANOVA-RAEVAL, L.; GREN, B.; WILKINSON, S.; YOUNG, M.; YOUNMAN, P. Characterization of Spo0A homologus in diverser *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a prolabbe DNA-biding domain. **Molecular Microbiology**, v.14, p.411-426, 1994.
- BROWN, K. L. Use of computer data file for storage of heat resistance data on bacterial spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.65, p.49-54 1988.
- CARMO, L. F. Resistência térmica de esporos de *Bacillus cereus* IAL 55 condicionados em diferentes atividades de água, frente a vapor superaquecido a 140 °C e atividade de água média = 0,264. Piracicaba, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. Botulism: California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, n.28, p.73-75, 1978.
- CHRISTIAN, J. H. B. Reduced water activity. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (Ed.). **Microbial ecology of foods: factores affecting life and death of microorganisms**. New York: Academic Press, 1980. v.1, p.70-91.
- CHUMNEY, R. K.; ADAMS, D. M. Relationship between the increased sensitivity of heat injured *Clostridium perfringens* spores to surface active antibiotics and sodium chloride and sodium nitrate. **Journal of Applied Bacteriology**, v.49, n.1, p.55-63, 1980.
- CLIVER, D. O. **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. 395p.
- COLLIER, C. P.; TOWNSEND, T. The resistance of bacterial spore to superheated steam. **Food Technology**, v.10, n.10, p. 477-481, 1955.

- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. **Microbiological methods**. Butterworths: Academic Press. 1970. 454p.
- CONTIERO, J. Resistência térmica de conidiósporos de *Aspergillus parasiticus* speare ao calor seco: Desenvolvimento de equipamentos e ensaios. Piracicaba 1984. 93p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- COOK, A. M.; GILBERT, R. J. The effect of storage on the heat resistance and heat activation response of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v.20, p.626-629, 1968.
- CROSS, T. D. The diversity of bacterial spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.33, p.95-102, 1970.
- DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63, n.1, p.1-20, 1999.
- ELEY, A. R. **Intoxicaciones alimentarias de etiologia microbiana**. Zaragoza: Acribia, 1994. 208p.
- EMBORG, C. Inactivation of dried bacteria and bacterial spores by means of gamma-irradiation at high temperature. **Applied Microbiology**, v.27, n.5, p.830-833, 1974.
- ERICKSON, L. E. Recent development in intermediate moisture foods. **Journal of Food Protection**, v.45, n.5, p.484-491, 1982.
- ERRINGTON, J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. **Microbiological Reviews**, v.1, p.1-33, 1993.
- ETOA, F. X.; MITCHIELS, L. Heat induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v.6, n.1, p.43-45, 1988.
- FARMACOPÉIA brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 2pt.
- FISHER, D. A.; PFLUG, I. J. Effect of combined and radiation on microbiology destruction. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.1170-1176, 1977.

- FOX, K.; PFLUG, I. J. Effect of temperature and gas velocity on the dry-heat destruction rate of bacterial spores. **Applied Microbiology**, v.12, n.2, p.343-348, 1968.
- FRAIZER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 181p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- GOLDONI, J. S.; KOJIMA, S.; LEONERD, S.; HEIL, R.J. Growing spores of PA 3679 in formulations of beef heart infusion broth. **Journal of Food Science**, v.45, p.467-470, 1980.
- GOMBAS, D. E. Bacterial spore resistance to heat. **Journal of Food Technology**, v.37, n.11, p.105-110, 1983.
- GOULD, G. W. Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.42, n.3, p. 297-309, 1977.
- GOULD, G. W. Practical implications of compartmentalization and osmotic control of water distribution in spores. In: CHAMBLISS, G.; VARY, J. C. (Ed.) **Spores VII**. Washington: American Society Microbiology, 1978. p.21-26.
- GOULD, G. W.; DRING, G. J. Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. **Nature**, n.258, p.402-405, 1975.
- GRAHAM, G. S.; BORIS, C. A. Chemical and biological indicators. In : MORRISSEY, R. F.; PHILLIPS, G. B. (Ed). **Sterilization technology: a practical guide for manufactures and users of health care products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. p.36-69.
- GRISOTTO, R. Construção e testes de câmara para tratamento térmico de esporos de microrganismos. Piracicaba, 1992. 73p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HAN, B. H. Thermal resistance of bacterial spores to dry heat. **Bulletin of the Korean Fisheries Society**, v.10, n.3, p.145-149, 1977.

- HARMON, S.; KAUTTER, S. Improved media for sporulation and enterotoxin production by *C. perfringens*. **Journal of Food Protection**, v.49, p.706-711, 1986.
- HAUSCHILD, A. H. W.; DODDS, K. L. *Clostridium botulinum*: ecology and control in foods. New York: . Marcel Dekker, 1993. 412p.
- HEREDIA, N. L.; LABBÉ, R. G.; RODRIGUEZ, M. A.; GARCIA-ALVARADO, J. S. Growth, sporulation and enterotoxin production by *C. perfringens* type A in the presence of human bile salts. **FEMS Microbiology Letters**, v.84, p.15-22, 1992.
- HOFFMAN, R. K.; GAMBILL, V. M.; BUCHANAN, L. M. Effect of cell moisture on the thermal inactivation rate of bacterial spores. **Applied Microbiology**, v.16, n.8, p.1240-1241, 1968.
- HUTTON, M. T. Interacting effects of pH and NaCl on heat resistance of bacterial spores. **Journal of Food Science**, v.56, n.3, p. 821-822, 1991.
- INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - **Microorganisms in foods**. 1. Their significance and methods of enumeration 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. 434p.
- JAWETZ, E. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. 524p.
- JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5 ed. New York: Capman & Hall, 1996. 661p.
- JOHNSTONE, K.; HOLLAND, K. T. Ultrastructural changes during sporulation of *Clostridium bifermentans*. **Journal of General Microbiology**, v.100, p.217-220, 1977.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular da célula**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1997. 260p.
- KIHM, D. J.; HUTTON, M. T.; HANLIN, J. H.; JOHNSON, E. A. Zinc stimulates sporulation in *Clostridium botulinum* 113B. **Current Microbiology**, v.17, p.193-198, 1988.

- KIHM, D. J.; HUTTON, M. T.; HANLIN, J. H.; JOHNSON, E. A. Influence of transition metals add during sporulation an heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.681-685, 1990.
- KING JUNIOR, A. D.; BAUNE, H. G.; ALDERTON, G. Non logarithmic death are calculation for *B. fulva* and other microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.596-600, 1969.
- KOOIMAN, W. J.; JACOB, R. P. W. M. The heat resistance of *B. subtilis* 1-12 in relation to the water activity during pre-equilibration and during exposure to heat. In: BARKER, A. N. (Ed.) **Spore research**. London: Academic Press, 1976. v.2, p.477-486.
- LABBÉ, R. G.; REY, D. K. Raffinose increased sporulation and enterotoxin production by *Closridium perfringens* type A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1196-1200, 1979.
- LABBÉ, R. G.; RUFNER, R. Ultrastructure of sporulating cells of *Closridium perfringens* type A growing in the presence of raffinose. **Canadian Journal of Microbiology**, v.26, p.1153-1157, 1980.
- LABUZA, T. P. The properties of water in relationship to water binding in food: a review. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.1, n.2, p.167-190, 1977.
- LEE, C. H.; MONTIVILLE, T. J.; SINSKEY, A. J. Comparison of the efficacy of steam sterilization indicators. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.6, p.1113-1117, 1979.
- LEITÃO, M. F. F. *Clostridium botulinum* e a indústria de alimentos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.16, n.2, p. 149-164, 1979.
- LEITÃO, M. F. F. Microbiologia de alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSO, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. v.1, p.5-81.

- LEVINSON, H. S.; HYATT, M. T. Distribution and correlation of events during thermal inactivation of *Bacillus megaterium* spores. **Journal of Bacteriology**, v.108, n.1, p.111-121, 1971.
- LONG, S.; JONES, D. T.; WOODS, D. R. Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.1389-1393, 1983.
- LONG, S.; JONES, D. T.; WOODS, D. R. Initiation of solvent production, clostridial stage formation and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.256-261, 1984.
- LÓPEZ, M.; GONZÁLES, I.; CONDÓN, S.; BERNARDO, A. Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Microbiology**, v.28, p.405-410, 1996.
- LYNCH, D. J.; POTTER, N. N. Effects of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in Frankfurter emulsion slurry. **Journal of Food Protection**, v.51, n.6, p.475-480, 1988.
- MAGGI, A.; GOLA, S.; ROVERE, P.; MIGLIOLI, L.; DALL'AGLIO, G.; LONNEBORG, N. G. Effects of combined high pressure-temperature treatments on *Clostridium sporogenes* spores in liquid media. **Industria-Conserve**, v.71, n.1, p.8-14, 1996.
- MALLIDIS, C. S.; SCHOLEFIELD, J. Determination of the resistance of spores using a solid heating block system. **Journal of Applied Bacteriology**, v.59, n.5, p. 407-411, 1985.
- MALLIDIS, C. S.; SCHOLEFIELD, J. Relation of the heat resistance of bacterial spores to chemical composition and structure II. Relation to composition and structure. **Journal of Applied Bacteriology**, v.63, n.3, p.207-215, 1987.
- MARQUIS, R. I.; SIM, J. S. Y. Molecular mechanisms of resistance heat and oxidative damage. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.405-485, 1994. Supplement.

- MAZAS, M.; GONZALES, I.; LOPEZ, M.; GONZALES, J.; SARMIENTO, R. M. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v.30, p.71-78, 1995.
- MOIR, A. E.; KEMP, A.; ROBINSON, C.; CORFE, B. M. The genetic analysis of bacterial spore germination. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.9-16, 1994. Supplement.
- MOLIN, G. Inherent genetic differences in dry heat resistance of some *Bacillus* spores. In: BARKER, A. N., (Ed) **Spore research**. Toronto: Academic Press, 1977b. p.487-500.
- MOLIN, G. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in dry system at low and high temperature. **Journal of General Microbiology**, v.101, n.3, p.227-231, 1977a.
- MOLIN, G.; ÖSTLUND, K. Dry heat inactivation of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores with special reference to spore density. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, n.4, p.359-363, 1975.
- MORTON, R. D.; SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T.; WILEY, R. C. Effect of heat and pH on toxigenic *Clostridium butyricum*. **Journal of Food Science**, v.55, n.6, p.1725-1727 1990.
- MOSSEL, D. A. A.; MORENO-GARCIA, B. **Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidade y la calidad de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 792p.
- MURREL, W. G.; SCOTT, W. J. The heat resistance of bacterial spores at various water activities. **Journal of General Microbiology**, v.43, p.411-425, 1966.
- NAKAMURA, K.; HASHIZUME, E.; SHIBATAT, T.; NAKAMURA, Y; MALA, S.; YAMANE, K. Small cytoplasmic RNA(scRNA) gene from *Clostridium perfringens* can replace the gene for the *Bacillus subtilis* scRNA in both growth and sporulation. **Microbiology**, v.141, p.2965-2975, 1995.
- NAKASHIO, S.; GERHARDT, P. Protoplast dehydration correlated with heat resistance of bacterial spores. **Journal of Bacteriology**, v.93, p.571-578, 1985.

- NISHIGUCHI, M.; HONDA, K.; AMIKURA, R.; NAKAMURA, K.; YAMANE, K. Structural requirements of *Bacillus subtilis* small cytoplasmic RNA for cell growth, sporulation, and extracellular enzyme production. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.157-165, 1994.
- OCIO, M. J.; SANCHES, T.; FERNANDEZ, P. S.; RODRIGO, M.; MARTINEZ, R. Thermal resistance characteristic of PA 3679 in the temperature range of 110-121 degree as affected by pH, type of acidulante and substrate. **Journal of Food Microbiology**, v.22, n.4, p.239-247, 1994.
- PEELER, J. T.; REYES, A. L.; GRAWFORD, A. J.; WEHBY, A. J.; CAMPBELL, J. E. Thermal resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* in closed system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, n.1, p.52-58, 1977.
- PEREGO, M.; COLE, S.; BURBULYS, D.; TRACH, K.; HOCH, J. Characterization of the gene for a protein kinase which phosphorylates the sporulation-regulatory proteins Spo0A and Spo0F. **Journal of Bacteriology**, v.141, p.6187-6196, 1989.
- PFLUG, I. J.; ODLAUG, T. E. Biological indicators in pharmaceutical and the medical device industry. **Journal of Parenter Science and Technology**, v.40, n.5, p.242-248, 1986.
- PHEIL, C. G.; PFLUG, I. J.; NICHOLAS, R. C.; AUGUSTIN, J. A. L. Effect of various gas atmospheres on destruction of microorganisms in dry heat. **Applied Microbiology**, v.15, n.1, p.120-124, 1967.
- PRADO FILHO, L. G. Resistência térmica de microrganismos em ambiente de baixa atividade de água I. Montagem de equipamento específico e cálculos termodinâmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.7, n.1, p.27-49, 1987a.
- PRADO FILHO, L. G. Resistência térmica de microrganismos em ambiente de baixa atividade de água. II. Resistência térmica de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* frente a vapor superaquecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.7, n.2, p.145-171, 1987b.

- PRADO FILHO, L. G. Uso de bioindicadores na esterilização de alimentos. I bioindicadores em processos térmicos empregando calor seco. In: SIMPOSIO LATINO-AMERICANO DE ALIMENTOS, 2. Campinas, 1997. Campinas: Fundação Gargill, 1997. p.341-345.
- PRADO FILHO, L. G.; GRISOTTO, R. Projeto e construção de câmara para tratamento térmico de esporos de microrganismos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.14, n.1, p.96-104, 1994.
- PRADO FILHO, L. G.; KIEFER, P. Versuchsanlage zur thermischen behandlung von bakteriensporen in gase mit liner wasseraktivitaet $< 1,0$. **Lebensmittel-Wissenschaft und technologie**, v.7, n.1 p. 255-256, 1974.
- PRADO FILHO, L. G.; GRISOTTO, R.; TAPIA TAPIA, D. M. Resistência de esporos de *Bacillus subtilis* var niger. ATCC 9372 tratados com vapor superaquecido com atividade de água menor que 1,0. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.16, n.2, p. 153-157, 1996.
- QUAST, D. G.; TEIXEIRA NETO, R. O. Atividade de água em alimentos de teor intermediário de umidade. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.6, n.1, p.203-232, 1975.
- QUAST, D. G.; LEITÃO, M. F.F.; KATO, K. Death of *Bacillus stearothermophilus* 1518 spores on covers exposed to superheated steam in dole aseptic cannind system. **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie**, v.10, n.4, p.198-202, 1977.
- QUINTAVALLA, S.; SARDEGNA, R.; PEDRELLI, T.; CAMPANINI, M. Aplication of the "Inoculated pack tests" methods for determination of the heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores in acidified mushrooms. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, n.6, p.492-496, 1994.
- RAMPAL, L.; JEGATHESAN, M.; LIM, Y. S. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning in a school hostel, klong. **Medical Journal of Malaysia**, v.39, n.2, p.116-122, 1984.

- REICH, R. R.; WHITBOURNE, J. E.; McDANIEL, A. W. Effect of storage conditions on the performance of *Bacillus stearothermophilus* biological indicators. **Journal Parenteral Drug Association**, v.33, n.4, p.228-234, 1979.
- REYES, A. L.; CRAWFORD, R. G.; WEHBY, A. J.; PEELER, J. T.; WIMSATT, J. C.; CAMPBELL, J. E.; TWEDT, R. M. Heat resistance of *Bacillus* spores at various relative humidities. **Applied Environmental and Microbiology**, v.42, n.4, p.692-697, 1981.
- REYNOLDS, M. C.; LINDELL, K. F.; DAVID, T. J.; FAVERO, M. S.; BOND, W. W. Thermoradiation inactivation of naturally occurring bacterial spores in soil. **Applied Microbiology**, v.28, n.3, p. 406-410, 1974.
- RODRIGO, M.; MARTINEZ, A.; SANCHEZ, T. PERIS, M. J.; SAFON, J. Kinetics of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores destruction using computer-controlled thermoresistometer. **Journal of Food Science**, v.58, n.3, p.649-652, 1993.
- ROEMER, G. B. Heissulfsterilisation. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v.100, n.13, p.709-710, 1975.
- ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITHALL, R. W. **The clostridia: molecular biology and pathogenesis**. New York: Academic Press, 1997. 533p.
- RUSSEL, A. D. **The destruction of bacterial spores**. New York: Academic Press, 1982. 333p.
- SACKS, L. E.; THOMPSON, P. A. Increased spores yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxantines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.189-193, 1977.
- SALA, F. J.; IBARZ, P.; PALOP, A.; RASO, J.; CONDÓN, S. *Bacillus subtilis* at different pH values. **Journal of Food Protection**, v.58, p.239-243, 1994.
- SAUER, U.; TREUNER, A.; BUCHHOLZ, M.; SANTANGELO, J.; DURRE, P. Sporulation and primary sigma factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.6572-6582, 1994.
- SCHULL, J. J.; CARGO, G. T.; ERNST, R. R. Kinetics of heat activation and thermal death of bacterial spores. **Applied Microbiology**, v.11, p.485-487, 1963.

- SETLOW, P. I Will survive: protecting and repairing spore DNA. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.9, p.2737-2741, 1992.
- SETLOW, P.; SACKS, L. E. Cyclic AMP is not detectable in *Clostridium perfringens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.1228-1230, 1983.
- SHAKHBANOV, A. A. Ultrastructure of *Clostridium septicum*. **Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology**, v.7, p.43-47, 1980.
- SHANSUZZAMAN, K.; LUCHT, L. Resistance *Clostridium sporogenes* to radiation and heat in various nonaqueous suspension media. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.10-12, 1993.
- SHIH, N. J.; LABBÉ, R. G. Characterization and distribution of analyses during vegetative cel growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.628-633, 1996.
- SMITH, P. R. **The determination of equilibrium relative a water sensitivity in foods: a literature review**. s.l.: BMFIRA, 1971. 29p. (Scientific and Technical Survey, 70).
- SOPER, J. C.; DAVIES, D. J. G. The effect of rehydration and oxygen on the heat resistance vacuum treated spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.36, n.1, p.119-130, 1973.
- SRIMANI, B.; LONCIN, M. Determination of decimal reduction time of *Bacillus subtilis* spores at 100 °C. **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie**, v.13, n.3, p.190-192, 1980.
- STRUCK, J.; VOGEL, D.; ULBRICH, N.; ERDMANN, V. The *Bacillus subtilis* scRNA is related to 4,5S RNA from *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.2719, 1988.
- STUMBO, C. R. **Termobacteriology in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press, 1973. 354p.
- TAPIA TAPIA, D. M. Resistência térmica de esporos de *Bacillus cereus* IAL 2599 frente a vapor superaquecido com atividade de água menor que 1,0. Piracicaba, 1997. 67p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- TODA, K. Studies on heat sterilization. VII : Complex reaction model for heat inactivation of bacterial spores. **Journal of Fermentation Technology**, v.48, p.811-818, 1970.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducción a la microbiología**. 3ª ed. Zaragoza: Acribia, 1993, p.792.
- TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. London: Academic Press, 1993. 478p.
- UBOLDI EIROA, M. N. Atividade de água: influência sobre o desenvolvimento de microrganismos e métodos de determinação em alimentos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p. 353-383, 1981.
- UBOLDI EIROA, M. N. Microbiologia de frutas e hortaliças desidratadas. In: AGUIRRE, J. M. ; GASPARINO FILHO, J. (Coord). **Desidratação de frutas e hortaliças**. Campinas: ITAL, 1996. p.6.1-6.26. (Manual Técnico).
- UNITED States pharmacopeia: dispensing information. 23. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. 3v.
- VASZ, K.; PROSZT, G. Observation on heat destruction of spores of *Bacillus cereus*. **Jurnal of Applied Bacteriology**, v.21, n.3, p.431-441, 1957.
- VESSONI-PENNA, T. C. Validação de processos de esterilização I. Conceitos básicos. **Laes & Haes**, v.88, p.46-48, 1994.
- VESSONI-PENNA, T. C.; MACHOSHVILI, I. A.; BASTON, L. M. Importância da autoclave em lactário hospitalar. **Laes & Haes**, v.16, n.91, p.68-74, 1994.
- WEISS, K. F.; STRONG, D. H. Some properties of heat-resistance and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. I. Heat resistance and toxigenicity. **Journal of Bacteriology**, v.93, p.21-26, 1967.
- WITMER, M. E.; JOHNSON, A. D. Development of improved defined media for *Clostridium botulinum* serotypes A, B and E. **Applied Environmental and Microbiology**, v.54, p.753-759, 1988.
- WONG, J.; SASS, C. BENNETT, G. Sequence and arrangement of genes encoding sigma factors homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.6572-6582, 1995.

YOUNG, J. H. Sterilization with steam under pressure. In: MORRISSEY, R. F.; PHILLIPS, G. B.(Ed) **Sterilization technology**: a practical guide for manufacturers and uses of health care products. New York: Van Nostrand Reinold, 1993, p.120-149.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 100 °C a uma Aa média = 0,95.

Tempo de tratamento (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
10	2,25 E+04	4,35	
10	1,24 E+04	4,09	
10	1,16 E+04	4,06	
10	1,34 E+04	4,12	4,16
20	1,08 E+03	3,03	
20	1,11 E+03	3,05	
20	2,50 E+03	3,40	
20	1,80 E+03	3,25	3,18
30	1,56 E+04	4,19	
30	1,71 E+04	4,23	
30	2,13 E+04	4,33	
30	1,21 E+04	4,08	4,21
40	4,20 E+02	2,62	
40	1,51 E+02	2,18	
40	3,83 E+02	2,58	
40	3,20 E+02	2,51	2,47
50	2,37 E+02	2,37	
50	1,00 E+02	2,00	
50	2,90 E+02	2,46	
50	1,35 E+02	2,13	2,24
60	2,33 E+02	2,37	
60	2,91 E+02	2,46	
60	1,33 E+02	2,12	
60	1,44 E+02	2,15	2,28
70	1,46 E+02	2,16	
70	9,30 E+02	2,97	
70	1,02 E+02	2,01	
70	1,17 E+02	2,07	2,05
80	2,21 E+02	2,34	
80	1,34 E+02	2,13	
80	1,67 E+02	2,22	
80	2,51 E+02	2,40	2,27
90	2,50 E+02	2,40	
90	3,10 E+02	2,50	
90	2,03 E+02	2,31	
90	1,82 E+02	2,26	2,37

Apêndice 2 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 110 °C
a uma Aa média = 0,67.

Tempo de tratamento (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
10	2,39 E+03	3,38	
10	170 E+03	3,23	
10	1,79 E+03	3,25	
10	1,93 E+03	3,29	3,29
20	4,80 E+03	3,68	
20	3,21 E+03	3,51	
20	4,10 E+03	3,61	
20	2,90 E+03	3,46	3,57
30	6,90 E+02	2,84	
30	5,15 E+02	2,71	
30	3,17 E+02	2,50	
30	4,29 E+02	2,63	2,67
40	2,93 E+03	3,47	
40	3,72 E+03	3,57	
40	2,00 E+03	3,30	
40	1,83 E+03	3,26	3,40
50	1,27 E+04	4,10	
50	1,96 E+04	4,29	
50	1,13 E+04	4,05	
50	1,08 E+04	4,03	4,12
60	7,20 E+03	3,86	
60	6,61 E+03	3,82	
60	6,03 E+03	3,78	
60	5,89 E+03	3,77	3,81
70	1,26 E+03	3,13	
70	9,90 E+02	2,99	
70	1,48 E+03	3,17	
70	1,37 E+03	3,14	3,11
80	1,08 E+02	2,03	
80	9,30 E+01	1,97	
80	1,05 E+02	2,02	
80	9,80 E+01	1,99	2,00
90	1,94 E+02	2,29	
90	1,77 E+02	2,25	
90	1,60 E+02	2,20	
90	1,73 E+02	2,24	2,25

Apêndice 3 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 120 °C a uma Aa média = 0,48.

Tempo de tratamento (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
10	2,96 E+03	3,47	
10	3,11 E+03	3,49	
10	2,84 E+03	3,45	
10	2,79 E+03	3,45	3,47
20	2,91 E+04	4,46	
20	2,23 E+04	4,35	
20	2,50 E+04	4,40	
20	2,78 E+04	4,44	4,41
30	5,70 E+03	3,76	
30	5,05 E+03	3,70	
30	6,01 E+03	3,78	
30	5,83 E+03	3,77	3,75
40	2,53 E+04	4,40	
40	2,76 E+04	4,44	
40	2,39 E+04	4,38	
40	2,61 E+04	4,42	4,41
50	2,85 E+03	3,45	
50	2,33 E+03	3,37	
50	1,94 E+03	3,29	
50	3,13 E+03	3,49	3,40
60	7,10 E+02	2,85	
60	8,60 E+02	2,93	
60	6,80 E+02	2,83	
60	6,40 E+02	2,81	2,86
70	2,91 E+02	2,46	
70	3,10 E+02	2,49	
70	2,83 E+02	2,45	
70	2,67 E+02	2,43	2,46
80	3,60 E+02	2,56	
80	2,97 E+02	2,47	
80	3,31 E+02	2,52	
80	3,01 E+02	2,48	2,51
90	3,90 E+02	2,59	
90	3,13 E+02	2,49	
90	3,04 E+02	2,48	
90	3,72 E+02	2,57	2,53
120	2,20 E+01	1,34	
120	3,60 E+01	1,56	
120	2,40 E+01	1,38	
120	2,90 E+01	1,46	1,44

Apêndice 4 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 130 °C
a uma Aa média = 0,33.

Tempo de tratamento (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
10	1,10 E+04	4,04	
10	1,60 E+04	4,20	
10	1,40 E+04	4,15	
10	1,43 E+04	4,16	4,14
20	2,91 E+03	3,46	
20	2,60 E+03	3,41	
20	2,43 E+03	3,39	
20	2,69 E+03	3,43	3,42
30	2,37 E+03	3,37	
30	2,20 E+03	3,34	
30	2,60 E+03	3,41	
30	2,57 E+03	3,41	3,38
40	1,29 E+04	4,11	
40	1,26 E+04	4,10	
40	1,31 E+04	4,12	
40	1,28 E+04	4,11	4,11
50	3,60 E+02	2,56	
50	4,10 E+02	2,61	
50	3,21 E+02	2,51	
50	3,44 E+02	2,54	2,56
60	7,40 E+02	2,87	
60	8,10 E+02	2,91	
60	6,90 E+02	2,84	
60	7,20 E+02	2,86	2,87
70	6,80 E+01	1,83	
70	8,50 E+01	1,93	
70	6,10 E+01	1,79	
70	5,90 E+01	1,77	1,83
80	3,50 E+02	2,54	
80	3,90 E+02	2,59	
80	2,90 E+02	2,46	
80	3,10 E+02	2,49	2,52
90	3,40 E+02	2,53	
90	2,60 E+02	2,41	
90	2,90 E+02	2,46	
90	3,60 E+02	2,56	2,49
120	3,70 E+01	1,57	
120	4,80 E+01	1,68	
120	2,70 E+01	1,43	
120	3,10 E+01	1,49	1,54

Apêndice 5 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 140 °C
a uma Aa média = 0,26.

Tempo de tratamento (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
10	1,55 E+03	3,19	
10	1,63 E+03	3,21	
10	1,20 E+03	3,08	
10	1,33 E+03	3,12	3,15
20	1,76 E+03	3,25	
20	1,55 E+03	3,19	
20	1,67 E+03	3,22	
20	1,80 E+03	3,26	3,23
30	2,27 E+03	3,36	
30	2,54 E+03	3,41	
30	2,31 E+03	3,36	
30	2,10 E+03	3,32	3,36
40	2,00 E+03	3,30	
40	2,35 E+03	3,37	
40	2,10 E+03	3,32	
40	1,94 E+03	3,29	3,32
50	8,20 E+01	1,91	
50	9,80 E+01	1,99	
50	7,30 E+01	1,86	
50	7,90 E+01	1,90	1,91
60	3,70 E+02	2,57	
60	4,50 E+02	2,65	
60	4,00 E+02	2,60	
60	3,20 E+02	2,51	2,58
70	2,28 E+02	2,36	
70	1,70 E+02	2,23	
70	1,20 E+02	2,08	
70	2,10 E+02	2,32	2,25
80	5,70 E+02	2,76	
80	6,20 E+02	2,79	
80	4,60 E+02	2,66	
80	5,50 E+02	2,74	2,74
90	7,10 E+01	1,85	
90	8,50 E+01	1,93	
90	7,70 E+01	1,89	
90	8,20 E+01	1,91	1,89
120	7,80 E+01	1,89	
120	8,70 E+01	1,94	
120	8,10 E+01	1,91	
120	7,30 E+01	1,86	1,90

Apêndice 6 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 150 °C
a uma Aa média = 0,20.

Tempo de tratamento (minutos)	UFCmL ⁻¹	Log UFC	Média
10	2,99 E+04	4,48	
10	2,60 E+04	4,41	
10	2,70 E+04	4,43	
10	2,80 E+04	4,45	4,44
20	5,70 E+03	3,76	
20	6,10 E+03	3,72	
20	5,10 E+03	3,71	
20	5,30 E+03	3,72	3,75
30	2,67 E+03	3,43	
30	2,90 E+03	3,46	
30	2,20 E+03	3,34	
30	2,50 E+03	3,39	3,41
40	2,30 E+04	4,36	
40	2,90 E+04	4,46	
40	2,10 E+04	4,32	
40	2,00 E+04	4,30	4,36
50	7,20 E+02	2,86	
50	8,10 E+02	2,91	
50	7,70 E+02	2,89	
50	7,40 E+02	2,87	2,88
60	1,53 E+03	3,18	
60	1,82 E+03	3,26	
60	1,67 E+03	3,22	
60	1,30 E+03	3,11	3,19
70	3,40 E+01	1,53	
70	4,20 E+01	1,62	
70	3,10 E+01	1,49	
70	3,70 E+01	1,57	1,55
80	3,70 E+02	2,57	
80	4,20 E+02	2,62	
80	3,60 E+02	2,56	
80	3,20 E+02	2,51	2,57
90	3,40 E+02	2,53	
90	3,50 E+02	2,54	
90	3,10 E+02	2,49	
90	3,30 E+02	2,52	2,52
120	2,50 E+01	1,40	
120	2,10 E+01	1,32	
120	2,00 E+01	1,30	
120	1,90 E+01	1,46	1,37

Apêndice 7 - Número de sobreviventes de *C. sporogenes* PA 3679 tratados a 160 °C a uma Aa média = 0,15.

Tempo de tratamento (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
10	2,37 E+04	4,37	
10	2,90 E+04	4,46	
10	2,11 E+04	4,32	
10	2,50 E+04	4,40	4,39
20	1,29 E+03	3,11	
20	1,71 E+03	3,23	
20	1,53 E+03	3,18	
20	1,66 E+03	3,22	3,19
30	7,00 E+03	2,85	
30	8,20 E+02	2,91	
30	7,60 E+02	2,88	
30	7,50 E+02	2,88	2,88
40	3,00 E+03	3,48	
40	3,60 E+03	3,56	
40	3,10 E+03	3,49	
40	3,30 E+03	3,52	3,51
50	2,36 E+03	3,37	
50	2,80 E+03	3,45	
50	2,10 E+03	3,32	
50	2,60 E+03	3,41	3,43
60	6,90 E+02	2,84	
60	7,70 E+02	2,89	
60	7,10 E+02	2,85	
60	6,30 E+02	2,80	2,85
70	8,20 E+01	1,91	
70	9,60 E+01	1,98	
70	1,00 E+02	2,00	
70	8,30 E+01	1,92	1,95
80	1,90 E+01	1,28	
80	2,50 E+01	1,40	
80	3,30 E+01	1,52	
80	1,60 E+01	1,20	1,35
90	1,80 E+01	1,26	
90	2,20 E+01	1,34	
90	2,60 E+01	1,41	
90	1,90 E+01	1,28	1,32

Apêndice 8 - População sobrevivente de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
30	90	9,10 E+03	3,96	3,94
	90	8,40 E+03	3,92	
	90	8,60 E+03	3,93	
	90	8,80 E+03	3,94	
	120	6,80 E+04	4,83	4,81
	120	6,20 E+04	4,79	
	120	5,90 E+04	4,77	
	120	7,20 E+04	4,86	
	150	3,30 E+02	2,52	2,53
	150	3,90 E+02	2,59	
	150	2,90 E+02	2,46	
	150	3,60 E+02	2,56	
60	90	9,30 E+02	2,97	2,95
	90	8,80 E+02	2,94	
	90	9,90 E+02	2,99	
	90	8,10 E+02	2,91	
	120	2,90 E+04	4,46	4,45
	120	2,10 E+04	4,32	
	120	5,00 E+04	4,70	
	120	5,00 E+04	4,70	
	150	4,20 E+02	2,62	2,69
	150	5,60 E+02	2,75	
	150	4,80 E+02	2,68	
	150	5,20 E+02	2,72	
90	90	7,30 E+03	3,86	3,77
	90	5,50 E+03	3,74	
	90	5,40 E+03	3,73	
	90	5,40 E+03	3,73	
	120	7,60 E+04	4,88	4,79
	120	5,00 E+04	4,69	
	120	6,30 E+04	4,79	
	120	6,60 E+04	4,82	
	150	7,60 E+02	2,88	2,88
	150	8,90 E+02	2,95	
	150	6,80 E+02	2,83	
	150	7,30 E+02	2,86	

Apêndice 9 - População sobrevivente de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 frente a vapor superaquecido acondicionados em $Aa = 0,67$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ tratados a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma Aa média = $0,26$.

Dias	Tempo (minutos)	UFC mL^{-1}	Log UFC	Média
30	90	3,30 E+03	3,52	3,45
	90	2,41 E+03	3,38	
	90	2,28 E+03	3,36	
	90	3,30 E+03	3,52	
	120	3,20 E+03	3,51	
	120	5,10 E+03	3,71	
	120	4,40 E+03	3,64	3,61
	120	3,70 E+03	3,57	
	150	2,30 E+02	2,36	
	150	1,00 E+02	2,00	2,15
	150	1,20 E+02	2,08	
	150	1,20 E+02	2,08	
60	90	4,70 E+02	2,67	2,71
	90	5,50 E+02	2,74	
	90	4,90 E+02	2,69	
	90	5,20 E+02	2,72	
	120	1,10 E+04	4,04	
	120	1,60 E+04	4,20	4,12
	120	1,40 E+04	4,15	
	120	1,21 E+04	4,08	
	150	1,00 E+01	1,00	1,03
	150	1,30 E+01	1,11	
	150	1,00 E+01	1,00	
	150	1,00 E+01	1,00	3,45
90	90	7,30 E+02	2,86	
	90	8,10 E+02	2,91	
	90	7,70 E+02	2,89	
	90	6,80 E+02	2,84	
	120	3,00 E+03	3,48	
	120	2,70 E+03	3,48	
	120	2,00 E+03	3,45	
	150	2,90 E+01	1,38	
	150	2,40 E+01	1,46	
	150	2,10 E+01	1,32	
	150	2,60 E+01	1,41	1,39

Apêndice 10 - População sobrevivente de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
30	90	7,80 E+03	3,89	
	90	7,50 E+03	3,88	
	90	8,30 E+03	3,92	
	90	8,50 E+03	3,93	3,91
	120	5,50 E+04	4,74	
	120	6,20 E+04	4,79	
	120	6,70 E+04	4,83	
	120	6,10 E+04	4,79	4,79
	150	2,20 E+02	2,34	
	150	2,80 E+02	2,45	
	150	3,50 E+02	2,54	
	150	3,30 E+02	2,52	2,46
60	90	7,80 E+02	2,89	
	90	7,50 E+02	2,88	
	90	8,20 E+02	2,91	
	90	8,30 E+02	2,92	2,92
	120	2,10 E+04	4,32	
	120	2,50 E+04	4,39	
	120	3,30 E+04	4,52	
	120	3,90 E+04	4,59	4,46
	150	4,00 E+02	2,60	
	150	4,50 E+02	2,65	
	150	4,30 E+02	2,63	
	150	4,70 E+02	2,67	2,64
90	90	7,80 E+03	3,89	
	90	4,60 E+03	3,66	
	90	4,80 E+03	3,68	
	90	6,20 E+03	3,79	3,76
	120	5,00 E+04	4,70	
	120	5,70 E+04	4,76	
	120	4,80 E+04	4,68	
	120	5,00 E+04	4,70	4,71
	150	7,60 E+02	2,88	
	150	7,70 E+02	2,89	
	150	6,90 E+02	2,84	
	150	6,30 E+02	2,79	2,85

Apêndice 11 - População sobrevivente de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
30	90	3,10 E+03	3,49	3,41
	90	3,00 E+03	3,48	
	90	2,00 E+03	3,30	
	90	2,30 E+03	3,36	
	120	4,20 E+03	3,62	
	120	3,40 E+03	3,53	
	120	4,00 E+03	3,60	3,57
	120	3,50 E+03	3,52	
	150	1,65 E+02	2,21	
	150	1,00 E+02	2,00	2,19
	150	1,21 E+02	2,08	
	150	3,17 E+02	2,50	
60	90	4,10 E+02	2,61	2,66
	90	4,70 E+02	2,67	
	90	4,50 E+02	2,65	
	90	5,00 E+02	2,70	
	120	1,10 E+04	4,04	
	120	1,00 E+04	4,00	4,06
	120	1,00 E+04	4,00	
	120	1,60 E+04	4,20	
	150	2,10 E+01	1,04	1,11
	150	1,00 E+01	4,00	
	150	1,70 E+01	1,23	
	150	1,50 E+01	1,17	
90	90	6,70 E+02	2,82	2,85
	90	7,50 E+02	2,87	
	90	7,00 E+02	2,84	
	90	7,60 E+02	2,88	
	120	2,35 E+03	3,13	
	120	2,30 E+03	3,36	3,48
	120	4,00 E+03	3,60	
	120	3,50 E+03	3,54	
	150	1,55 E+02	1,19	1,33
	150	3,20 E+02	1,51	
	150	2,00 E+02	1,30	
	150	2,00 E+02	1,30	

Apêndice 12 - População sobrevivente de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,00 a 30 °C, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias e tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
30	90	7,30 E+03	3,86	
	90	7,90 E+03	3,90	
	90	8,00 E+03	3,90	
	90	8,40 E+03	3,96	3,90
	120	4,60 E+04	4,66	
	120	4,20 E+04	4,60	
	120	5,50 E+04	4,74	
	120	5,40 E+04	4,73	4,68
	150	2,60 E+02	2,41	
	150	2,30 E+02	2,36	
	150	2,70 E+02	2,43	
	150	3,00 E+02	2,48	2,42
60	90	7,70 E+02	2,88	
	90	8,20 E+02	2,91	
	90	8,10 E+02	2,91	
	90	8,40 E+02	2,92	2,91
	120	2,30 E+04	4,36	
	120	2,40 E+04	4,38	
	120	2,90 E+04	4,46	
	120	2,90 E+04	4,46	4,42
	150	3,80 E+02	2,58	
	150	3,90 E+02	2,59	
	150	4,60 E+02	2,66	
	150	4,60 E+02	2,61	2,61
90	90	4,10 E+03	3,86	
	90	5,00 E+03	3,70	
	90	6,30 E+03	3,79	
	90	6,40 E+03	3,81	3,79
	120	4,70 E+04	4,67	
	120	4,80 E+04	4,68	
	120	4,80 E+04	4,68	
	120	4,90 E+04	4,69	4,68
	150	7,40 E+02	2,87	
	150	7,10 E+02	2,85	
	150	6,60 E+02	2,81	
	150	6,00 E+02	2,78	2,83

Apêndice 13 - População sobrevivente de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 armazenados em suspensão aquosa a 4 °C por 70 semanas, acondicionados em Aa = 0,67 a 30 °C, posteriormente mantidos em UR = 95% por 15 dias e tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,26.

Dias	Tempo (minutos)	UFC mL ⁻¹	Log UFC	Média
30	90	3,30 E+03	3,52	
	90	2,90 E+03	3,46	
	90	1,90 E+03	3,28	
	90	1,80 E+03	3,26	3,38
	120	3,10 E+03	3,49	
	120	3,10 E+03	3,49	
	120	4,20 E+03	3,62	
	120	4,30 E+03	3,63	3,56
	150	2,20 E+02	2,34	
	150	1,73 E+02	2,24	
	150	1,59 E+02	2,20	
	150	1,30 E+02	2,11	2,22
60	90	4,50 E+02	2,65	
	90	4,60 E+02	2,66	
	90	4,10 E+02	2,61	
	90	4,20 E+02	2,62	2,64
	120	1,00 E+04	4,00	
	120	1,30 E+04	4,11	
	120	1,10 E+04	4,04	
	120	1,01 E+04	4,00	4,04
	150	2,40 E+01	1,38	
	150	1,00 E+01	1,00	
	150	1,00 E+01	1,00	
	150	1,30 E+01	1,11	1,12
90	90	6,40 E+02	2,81	
	90	7,00 E+02	2,85	
	90	7,00 E+02	2,85	
	90	6,60 E+02	2,82	2,83
	120	1,55 E+03	3,19	
	120	3,80 E+03	3,58	
	120	3,60 E+03	3,56	
	120	2,90 E+03	3,46	3,45
	150	2,10 E+01	1,32	
	150	1,90 E+01	1,28	
	150	2,50 E+01	2,39	
	150	1,80 E+01	2,26	1,31