**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**

LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Luiz Gonzaga do Prado Filho

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo

novembro/1997

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

Carmo, Leandro francisco do

Resistência térmica de esporos de *Bacillus cereus* IAL 55 condicionados em diferentes atividades de água, frente a vapor superaquecido de 140°C e atividade de água média = 0,264 / Leandro Francisco do Carmo. - - Piracicaba, 1998.
79 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Bactéria patogênica 2. Descontaminação 3. Efeito de temperatura 4. Esporo 5. Esterilização 6. Microbiologia de alimento 7. Resistência térmica I. Título

CDD 576.163

**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**

LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Aprovado em 28 de janeiro de 1998

Comissão Julgadora

Prof.a Eleonora Carmona Rodrigues

IB / UNESP

Prof. Fernando Carlos Pagnoca

IB / UNESP

Prof. Luiz Gonzaga do Prado Filho

ESALQ / USP

Prof. Tit. Luiz Gonzaga do Prado Filho

Orientador

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	x
SUMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Bacillus cereus</i>	4
2.2. Resistência térmica em condições de $A_a < 1,0$	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Material	25
3.1.1 Microrganismo estudado	25
3.1.2. Meios de cultura	25
3.1.3. Controle da umidade no meio de condicionamento	26
3.1.4. Equipamento para tratamento térmico dos esporos	26
3.2. Métodos	27
3.2.1. Produção de esporos	27
3.2.2. Preparação das amostras	28
3.2.3. Condicionamento das amostras	28
3.2.4. Tratamento e manuseio das amostras	29
3.2.5. Cálculo da valor D	30

4. RESULTADOS	31
5 . DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE	76

LISTA DE FIGURAS

Número	Página
1 - Gráfico da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, sem condicionamento, tratados à 140 °C a uma Aa média = 0,264	41
2 – Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, sem condicionamento, tratados à 140 °C a uma Aa média = 0,264	42
3 – Gráfico da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, condicionados à 30 °C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e à 7 °C em Aa = 0,43; por 30 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	43
4 – Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados à 30 °C a uma Aa = 0,00 por 30 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	44
5 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados à 7 °C a uma Aa = 0,43 por 30 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	45
6 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados à 30 °C e uma Aa = 0,75 por 30 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	46
7 - Gráfico da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, condicionados à 30 °C em Aa = 0,00 e Aa = 0,7 e à 7 °C em Aa = 0,43; por 60 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	47
8 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados à 30 °C a uma Aa = 0,00 por 60 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	48
9 – Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados à 7 °C a uma Aa = 0,43 por 60 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	49
10 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados à 60 °C a uma Aa = 0,75 por 60 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	50
11 - Gráfico da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, condicionados à 30 °C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e à 7 °C em Aa = 0,43; por 90 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264	51

12 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 30 °C a uma Aa = 0,00 por 90 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	52
13 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 7 °C a uma Aa = 0,43 por 90 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264.....	53
14 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 30 °C a uma Aa = 0,75 por 90 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	54
15 - Gráfico da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, condicionados á 30 °C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e á 7 °C em Aa = 0,43; por 120 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	55
16 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 30 °C a uma Aa = 0,00 por 120 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	56
17 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 7 °C a uma Aa = 0,43 por 120 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	57
18 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 30 °C a uma Aa = 0,75 por 120 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	58
19 - Gráfico da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55, condicionados á 30 °C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e á 7 °C em Aa = 0,43; por 150 dias, tratados á 140 °C e Aa média = 0,26	59
20 - Gráfico representativo da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 30 °C á uma Aa = 0,00 por 150 dias, tratados á 140 °C á uma Aa média = 0,264	60
21 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 7 °C a uma Aa = 0,43 por 150 dias tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	61
22 - Regressão linear da resistência térmica de esporos de <i>B. cereus</i> IAL 55 condicionados á 30 °C a uma Aa = 0,75 por 150 dias tratados á 140 °C e Aa média = 0,264	62

LISTA DE TABELAS

Número	Página
1 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973) - $D = t / (\log a - \log b)$ -, referente aos esporos de <i>Bacillus cereus</i> IAL 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264; sem condicionamento	33
2 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973) - $D = t / (\log a - \log b)$ -, referente aos esporos de <i>Bacillus cereus</i> IAL 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264; condicionados durante 30 dias	34
3 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973) - $D = t / (\log a - \log b)$ -, referente aos esporos de <i>Bacillus cereus</i> IAL 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264; condicionados durante 60 dias	35
4 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973) - $D = t / (\log a - \log b)$ -, referente aos esporos de <i>Bacillus cereus</i> IAL 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264, condicionados durante 90 dias	36
5 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973) - $D = t / (\log a - \log b)$ -, referente aos esporos de <i>Bacillus cereus</i> IAL 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264, condicionados durante 120 dias	37
6 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973) - $D = t / (\log a - \log b)$ -, referente aos esporos de <i>Bacillus cereus</i> IAL 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264, condicionados durante 150 dias	38
7 - Valores D máximos em minutos, calculados pela fórmula de Stumbo (1973) $D = t / (\log a - \log b)$, por extrapolação gráfica e pela equação de regressão linear, dos esporos de <i>Bacillus cereus</i> tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,264.....	39

8 - Valores médios em porcentagem dos resultados referentes à resistência termica dos esporos de <i>B. cereus</i> IAL expostos nos tempos máximo e minimo, de tratamento com vapor superaquecido à 140 °C a uma atividade de água média de 0,264.....	40
--	----

**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**

Autor: LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Orientador: PROF. TIT. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

RESUMO.

Com o objetivo de estudar a resistência térmica de esporos de *Bacillus cereus* IAL 55, foram realizados tratamentos com vapor de água superaquecido à 140 °C com atividade de água (Aa) média de 0,264. Antes de serem submetidos ao tratamento térmico por 90; 120; 150; 180; 210; 240 e 270 minutos, os esporos foram condicionados em ambientes com diferentes Aa, sendo estas, Aa = 0,00 (sílica gel), Aa média = 0,43 (estacados à 7 °C) e Aa = 0,75 (solução saturada de cloreto de sódio). O condicionamento foi aplicado durante 30; 60; 90; 120 e 150 dias. Os resultados mostraram que o condicionamento em diferentes Aa causa, em uma fração da população, modificações fisiológicas e / ou estruturais, as quais, contudo, são anuladas por um estresse térmico muito prolongado (270 minutos), o qual também, evidencia uma fração de 3 a 4 esporos por milhão, que apresenta uma resistência intrínseca que independe do condicionamento prévio. A ocorrência de fenômenos de ativação e inativação simultâneos e / ou sequenciais tornam inviável o emprego da fórmula $D = t / (\log A - \log B)$ Stumbo (1973), para qualificar a resistência térmica dos esporos da população estudada. Valores D calculados a partir de equações de regressão, não se mostraram uniformes para todos os condicionamentos, podendo levar, em condições práticas, a um super-dimensionamento da resistência dos esporos estudados, no caso do emprego dos mesmos como indicadores biológicos de processos térmicos por calor seco com Aa intermediária.

THERMAL RESISTANCE OF *Bacillus cereus* SPORES CONDITIONED ON DIFFERENTS WATER ACTIVITIES, FACED TO WATER EVAPORATION OVERHEATED TO 140 °C AND THE ACTIVITIE OF WATER MEDIUM = 0.264

Author: LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Advisor: PROF. TIT. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

SUMMARY

With the aim of studying the thermal resistance of *Bacillus cereus* IAL 55 spores. The spores were treated with steam over heated at 140 °C with the average of 0.264 water activitie (Aw)The spores were conditioned to different Aw atmospheres before submitting to thermal treatment during 90; 120; 150; 180; 210; 240 and 270 min in the following, conditions Aw = 0.00 (silica gel); Aw = 0.43 (stocked at 7 °C) and Aw = 0.75(saturated solution of sodium chloride). The conditioning time was applied for 30; 60; 90; 120 and 150 days. The results showed that the differents Aw cause, physiological and / or structural modifications on the population spores, with ever there modifications were canceled by overprolonged thermal stress (270 min).Where about 3 to 4 spores per million show a intrinfec resistance. The occurrence of activation and inactivation pheromones, simultaneous and / or sequencious make unpracticable the use of - $D = t / (\log A - \log B)$ - Stumbo's formula (1973) to qualify the thermal resistance of the spores from the population studied. The D values calculated from regression equation, did not show uniformity to all the conditioning, and, on practical conditions, lead to an excessive spores resistance, if they were used as a biological indicators for thermal process per dry heat with Aw intermediate

INTRODUÇÃO

Dentro de quaisquer sistemas, a disponibilidade de água é um fator determinante no transcurso dos fenômenos físicos, químicos e biológicos que neles ocorrem. No caso particular dos alimentos, em que a água é um componente intrínseco e de grande importância, ela torna-se um condicionante dos processos que causam a deterioração dos mesmos. Contudo, a umidade disponível em um sistema não pode ser quantificada simplesmente pela umidade absoluta ($U_{ab} \%$), mas sim, o deve ser através da atividade de água (A_a) no sistema considerado. A atividade de água é definida como a relação entre a pressão de vapor de água de um sistema e a pressão de água livre a uma mesma temperatura. Portanto, o conceito de atividade de água e de umidade relativa (UR) equivalem-se, sendo que este é expresso em porcentagens, e o primeiro em frações de unidades ($A_a = UR \% / 100$).

A resistência térmica de microrganismos, particularmente a dos esporos, aumenta com a diminuição da atividade de água no ambiente onde ocorre o estresse térmico, atingindo, geralmente, um máximo no intervalo entre $A_a = 0,20$ e $A_a = 0,40$. Deste modo, o aumento da temperatura à uma pressão constante, acarreta um declínio da atividade de água, diminuindo a eficiência do estresse térmico, fato este que não se aplica em sistemas fechados, onde a pressão aumenta de acordo com a elevação da temperatura, como é o caso da autoclave, onde consegue-se altas temperaturas juntamente com altas pressões e, conseqüentemente, alta atividade de água.

O estudo da resistência térmica de esporos bacterianos, seu comportamento fisiológico e biológico, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e outras, é de grande

importância para a descontaminação ou esterilização de produtos, matérias primas, máquinas, instrumentos e embalagens e, também, para estudar a possibilidade de inativação sem o emprego de métodos úmidos de descontaminação.

Em pesquisas sobre resistência térmica de microrganismos e seus esporos em ambientes de A_w menor que 1,0, diversos métodos podem ser aplicados. Dentre eles podem ser citados: vapor superaquecido, vapor superaquecido com manipulação prévia ou, simultânea dos objetos com produtos químicos ou radiação ionizante, calor seco com e sem pré tratamentos e radiação infravermelha.

Outro aspecto de grande importância no estudo sobre a resistência térmica de esporos em ambientes de atividade de água menor que 1,0; é o comportamento destes em diferentes matérias primas, em alimentos desidratados ou liofilizados, e no processamento e armazenamento dos mesmos. Para tais estudos, podem ser utilizados diversos métodos para controlar a atividade de água ambiental, dentre os quais, o mais comum é o emprego de soluções salinas saturadas, com atividade de água definida na temperatura na qual se deseja fazer o condicionamento ou, o tratamento térmico. Neste caso, os esporos podem ou não estar em contato direto com as soluções controladoras, alternativa esta que influencia de modo significativo os resultados obtidos.

No presente trabalho utilizou-se o microrganismo *Bacillus cereus* que é uma bactéria Gram-positiva, da família Bacillaceae. Esta espécie tem sido apontada como responsável por casos de surtos de toxinfecções de origem alimentar decorrentes de consumo de produtos altamente contaminados pela mesma. Dentre estes produtos, os mais importantes são de origem vegetal como, cereais e tubérculos, bem como as farinhas e amidos provenientes de seus processamento.

A patologia do *Bacillus cereus* é caracterizada por duas síndromes distintas, uma diarréica e outra emética, sendo que os sintomas a elas associados são provocados por duas toxinas distintas.

Outra característica apresentada por esse microrganismo, é o fato de que seus esporos apresentam uma grande resistência ao calor seco, não apresentando sua inativação

um perfeito perfil logarítmico, como seria de esperar de fenômeno que, teoricamente transcorre como uma reação de primeira ordem.

O presente trabalho objetivou avaliar a resistência térmica de esporos da bactéria patogênica *Bacillus cereus* IAL 55, condicionados em diferentes atividades de água, ($A_w = 0,0$; $A_w 0,75$ e $A_w 0,43$), frente a vapor superaquecido que é um agente usado na descontaminação de equipamentos e instalações de manipulação de alimentos e fármacos.

Em ensaios preliminares, foi determinado que a maior resistência apresentada por esporos da cepa estudada, não condicionados, frente a vapor superaquecido, situa-se a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que, no local dos experimentos (715 Torr), corresponde a uma atividade de água média de $0,264$. Nestas condições médias foram feitos os tratamentos, após condicionamentos prévios em três diferentes condições ambientais.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - *Bacillus cereus*:

Bacillus cereus foi originalmente isolado e descrito por Frankland & Frankland (1887) citado por Franklin (1970), e atualmente está incluído na família Bacillaceae. Esta bactéria tem sido apontada como responsável por casos de surtos de toxinfecções de origem alimentar decorrentes de consumo de produtos altamente contaminados. Dentre estes produtos, os mais importantes são cereais e tubérculos, bem como farinhas e amidos provenientes de seus processamento.

O *B. cereus* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e suas células vegetativas possuem um comprimento de 1,0 - 1,2 μm até 3,0 - 5,0 μm (Goeppert & Kim, 1976). É uma bactéria esporulante, sendo seus esporos bastante resistentes ao calor, acreditando-se que sua destruição não ocorra de forma logarítmica.

Franklin (1970), relatou que os esporos de *B. cereus* sobrevivem ao tratamento térmico a 64°C durante 30 minutos. Em alguns casos, o reaquecimento do alimento pode levar a ativação e germinação dos esporos e se o alimento for mantido a temperatura conveniente, poderá ocorrer o desenvolvimento e a multiplicação da bactéria no mesmo.

No que diz respeito ao pH no crescimento de *B. cereus*, Kim & Goeppert (1971) determinaram um valor de 4,35 como limitante para o crescimento, acreditando-se que ele não se desenvolva em pH superior a 9,3.

Quanto a temperatura, Johnson et al. (1983) observaram que em caldo tripticase-soja o crescimento ocorria entre 15 e 50°C, sendo a temperatura ótima na faixa de 35 a 40°C e a germinação ocorrendo entre 5 e 50°C, porém, sendo mais rápida a 30°C.

Segundo Johnson et al. (1983), *B. cereus* não fermenta manitol e tem um sistema fosfolipase (lecitinase) muito ativo, sendo estas características frequentemente utilizadas em meios seletivos e diferenciais para o isolamento do microrganismo.

A enzima urease é produzida por poucas cepas, porém a produção de acetil-carbinol é característica da maioria das cepas de *B. cereus* (Seenapa & Kimpton, 1983). O nitrato é reduzido à nitrito, porém cepas nitrato-redutase negativas tem sido isoladas. Uma das características importantes é que a maioria das cepas utiliza amido, entretanto, tem sido descrita a ocorrência de mutantes que não o fazem.

Geralmente todas as cepas de *B. cereus* produzem a enzima penicilinase, o que torna possível o crescimento deste microrganismo em meios contendo 10 Unidades Internacionais de Penicilina, sendo esta propriedade utilizada na diferenciação entre *B. cereus* e *B. anthracis* (Seenapa & Kimpton, 1983).

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 (Beckers, 1988; Banwart, 1989; Trabulsi, 1989; Cliver, 1990; Troller, 1993; Eley, 1994).

Um dos mais importantes aspectos bioquímicos de *B. cereus* é a capacidade de sintetizar e secretar certas toxinas, sendo que no mínimo três importantes toxinas extra celulares são produzidas.

A produção de lecitinase foi observada por Ives & Potter (1977), que constataram que filtrados de culturas de *B. cereus* possuíam atividades hemolíticas, dermonecróticas e letal para camundongos. Esta enzima é formada na fase exponencial de crescimento da bactéria e, durante esta fase, o *B. cereus* elabora diversos produtos extracelulares, como proteases, β -lactamases, antibióticos peptídicos, fosfolipases e hemolisinas.

A patologia do *B. cereus* é caracterizada por duas síndromes distintas, uma diarreica e outra emética, sendo que os sintomas a elas associados são provocados por duas toxinas distintas (ICMSF, 1978). O primeiro surto relatado envolvendo a enterotoxina diarreica foi na Noruega, envolvendo aproximadamente 600 pessoas. Ocorreu em um hospital, atingindo tanto pacientes, como funcionários que consumiram carne com

legumes e, de sobremesa, pudim de chocolate com creme de baunilha, o qual havia sido preparado na noite anterior ao consumo e, mantido a temperatura ambiente. Os sintomas começaram a ocorrer entre 10 e 12 horas após o consumo, e consistiram em dores abdominais, diarreia aquosa, espasmos, náuseas com vômitos esporádicos e febre, sendo que os sintomas duraram mais de 12 horas.

Segundo Spira & Goeppert (1972) a toxina causadora da síndrome diarreica é uma proteína de peso molecular de 50.000 Dáltons, sua produção ocorre em pH 6,0 a 8,5, sendo ótimo na faixa de 7,0 a 7,5 e ocorre uma interrupção na produção da toxina depois de completar a fase exponencial, sendo esta proteína sensível a tripsina e pronase, podendo ser produzida entre 18 e 43°C, sendo inativada a 56°C durante 5 min.. Vários métodos tem sido utilizados para sua detecção, sendo que o mais comum é o da alça ligada de intestino de coelho.

A outra síndrome característica de *B. cereus* é a denominada emética, (Bonventre & Johnson, 1970). A maior parte dos surtos envolvendo esta toxina foi ocasionada pelo consumo de arroz cozido, preparado segundo a culinária chinesa, sendo o *B. cereus* isolado em número de 10^3 a 10^9 / g de alimento.

Os sintomas mais freqüentes são náuseas e vômitos, que ocorrem cerca de 5 horas após a ingestão, não apresentando febre e de recuperação mais rápida (Wyatt & Guy, 1981).

A toxina emética tem peso molecular de 1.000 Da, é bastante estável na faixa de pH de 2,0 a 11,0; é também estável a 126°C durante 90 min. e a 4°C durante 2 meses (Johnson et al., 1983). Esta toxina é resistente à tripsina e a pepsina. Como é extraída com clorofórmio, acredita-se que tenha características predominantemente apolares.

A síndrome causada pela toxina emética é muito semelhante a infecção estafilocócica (*Staphylococcus aureus*), tanto pela sintomatologia como pelo período de incubação (Kaur, 1986).

Higuti et al. (1997) isolaram cepas de *B. cereus* de fubá de milho e farinha de mandioca, adquiridos no mercado varejista de Curitiba - PR. e as caracterizaram por suas propriedades bioquímicas e toxicológicas. Todas as cepas foram positivas para os testes de hemolisina, fosfolipase C e toxina letal para camundongo, sendo que a população

responsável pela dose letal para 50 % da população de camundongos (DL_{50}) variou entre $3,0 \times 10^6$ e $6,0 \times 10^6$ UFC / mL. Todas as cepas cresceram no meio básico de cultura, suplementado com glucose, amido ou caseína, porém, foram negativas para a assimilação de lactose ou manitol

2.2 Resistência térmica em condições de $Aa < 1,0$

O estudo da resistência térmica de microrganismos e seus esporos ao tratamento térmico em condições de Aa menor que 1,0 (calor seco), teve início com o trabalho clássico de campo realizado por Collier & Townsend (1955), os quais citaram a falta de dados sobre a resistência térmica de microrganismos tratados por vapor superaquecido. Os mesmos autores efetuaram estudos sobre o comportamento de esporos *Clostridium* PA 3679, *B. stearothermophilus* 1518 e *B. polymyxa* em um sistema de enlatamento asséptico fabricado pela firma James Dole Engineering Company, o qual então começava a se difundir na indústria de alimentos. Neste trabalho evidenciou-se a variação da resistência de ambas as espécies de *Bacillus* em função do meio de tratamento e da atividade de água. A partir deste trabalho pioneiro ampliou-se o interesse pelo comportamento de microrganismos sob tratamento térmico em ambiente de atividade de água menor que 1,0, ou umidade relativa menor que 100%.

A resistência de microrganismos à ação de calor seco, constituiu-se até cerca de quatro décadas, um campo de interesse muito limitado dentro do contexto de esterilização de alimentos. Até então o problema estava restrito a indústria de produtos farmacêuticos, e mesmo assim não havia ainda uma norma definida da aplicação geral do calor seco, fato relatado no artigo de Roemer (1975). Apenas recentemente, Russel et al (1992) demonstraram valores mais definidos. Embora a aplicação do calor seco seja mais restrita que a do calor úmido, que é melhor bactericida, há uma carência de estudos adicionais, pois existem produtos e equipamentos cuja esterilização por calor úmido é inconveniente ou, mesmo, impossível.

Com a finalidade de estudar o comportamento de esporos de *B. subtilis* 5230 em vapor saturado, ar e vapor superaquecido, Pflug (1960) construiu um termoresistômetro, que trabalhava com uma sobre pressão de 5 a 20 polegadas de água (12,7 a 50,8 mm Hg).

Neste trabalho não foram indicadas as velocidades dos gases na câmara de tratamento, nem as temperaturas que permitiram a avaliação da atividade de água durante a realização dos experimentos. O valor de inativação decimal por calor (valor D) exato não pode ser calculado, sendo a resistência expressa em LD₅₀ a 350 °F (176,6°C).

Murrell & Scott (1966) trabalharam com esporos de três espécies do gênero *Bacillus* e duas do gênero *Clostridium*, sendo que uma delas com duas variedades *B. megaterium*, *B. stearothermophilus* ATCC 7949, *B. coagulans*, *C. botulinum* ATCC 9564, *C. botulinum* B ATCC 7949 e *C. bifermentans*. Ficou evidenciado o fato, até então não relatado, de que a resistência térmica dos esporos testados era máxima no intervalo de Aa de 0,2 a 0,4. Para *B. megaterium* a resistência máxima no intervalo citado acima foi 10.000 vezes maior que a resistência a Aa = 1,0. Neste experimento foram utilizados esporos liofilizados, condicionados na presença de soluções controladoras da atividade de água, mas sem contato físico entre ambos. O tratamento térmico feito na mesma disposição esporos - soluções, comprovou uma total desvinculação entre resistência térmica ao calor úmido (Aa = 1,0) e resistência térmica ao calor seco (Aa < 1,0).

Pheil et al. (1967) estudaram o efeito dos gases (ar, He, N₂, O₂ e CO₂) sobre a inativação térmica dos esporos de *B. subtilis* 5230 e *C. sporogenes* PA 3679 - 45. Inocularam esporos em cadinhos de estanho (11 x 8 mm) e após secagem sob vácuo a 25 °C por 24 h, dez unidades foram fixadas em latas especiais, "Thermal Death Time cans" (Latas TDT 64 x 8 mm), em ambientes com os gases em estudos. O tratamento térmico foi feito em autoclave a 121,1; 143,3; 148,9; 154,5 e 160 °C. A resistência de *B. subtilis* 5230 foi maior à temperaturas abaixo de 143,3 °C, em todos os gases; entre 143,3 °C e 148,9 °C as resistências se equívalem, sendo *C. sporogenes* PA 3679 - 45 a mais resistente acima de 148,9 °C em função do seu maior valor Z. Os valores D foram maiores em He e N₂ para ambos os microrganismos, não influenciando o peso molecular do gás utilizado na distribuição energética, nem, mostrando o oxigênio, especial efeito inativador como anteriormente era suposto.

Angelotti et al (1968) publicaram um trabalho considerado clássico no campo do calor seco, com vista ao estudo de problemas de descontaminação de veículos espaciais. Esporos de *B. subtilis* var. *niger* foram inoculados em superfície de papel e aço,

entreporkas e arruelas de aço com aperto a um torque de 12 ou a de 150 lb. / pol., e embebidos em bastonetes de “Lucite” (metilmetacrilato) e de resina de epoxi. Todas as amostras foram tratadas em “Thermal Death Time tubes” (tubos de TDT) imersos em banho de silicone com temperaturas de 105 °C a 160 °C. Em esporos equilibrados a diversas atividades de água antes da polimerização da “Lucite”, a maior resistência térmica detectada a 150 °C foi nos esporos equilibrados entre $A_w = 0,2$ e $A_w = 0,4$.

Hoffman et al. (1968), realizaram estudos onde condicionaram esporos de *B. subtilis* var. *niger* em ambiente com $A_w = 0,11$; $0,33$ e $0,85$ a 25 °C por 48 h antes dos testes de resistência térmica. O equipamento foi uma placa de aquecimento, com esporos pipetados em lâminas de aço de 13 x 13 x 0,3 mm. A disposição do equipamento utilizado caracterizou um sistema aberto, que nas temperaturas de tratamento (125 °C, 135 °C e 164 °C) correspondem a uma atividade de água igual a 0,03. Nas condições do experimento não houve influência da atividade de água sobre a resistência térmica durante o tratamento. Contudo a atividade de água do condicionamento teve influência marcante, apresentando os esporos mais úmidos uma maior resistência térmica.

Bruch & Smith, (1968) publicaram trabalho no qual, esses autores inocularam sobre pedaços de filmes de Kapton e Teflon, esporos de *B. subtilis* var. *niger*, e verificaram que ocorriam diferenças nos valores Z e D, sendo que o valor Z, isto é, a quantidade de temperatura necessária para aumentar um ciclo logaritmico na inativação de microrganismos, calculado foi de $Z = 29,1$ °C para Kapton e $Z = 139$ °C para esporos sobre Teflon. Essa diferença estaria relacionada com a atividade de água reinante no ambiente em que os esporos se encontravam. No caso, o filme de Kapton, era permeável ao vapor d'água formado durante o processo, enquanto o Teflon, por ser impermeável, permitiu um aquecimento dos esporos em um ambiente de atividade de água intermediária, dando assim, aos esporos uma alta resistência.

Fox & Eder (1969) realizaram estudos sobre a resistência térmica de esporos de *B. subtilis* submetidos a tratamento por calor úmido e seco, usando latas apropriadas, “TDT cans” e autoclave. A população estudada comportou-se de maneira variável, apresentando “ombro” sob calor úmido e duas frações de resistências distintas sob calor seco. Este comportamento foi atribuído a fenômenos simultâneos de ativação e inativação e à

diferença de eficiência do choque térmico úmido, e do choque térmico seco na ativação dos esporos. Nas condições e temperaturas de tratamento, (95 °C; 113 °C; 129 °C e 152 °C), não houve variação da atividade de água durante o tratamento térmico.

King et al. (1969) estudaram a resistência térmica de *Byssochlamys fulva* utilizando o método descrito pela “National Canners Association”. A resistência térmica era determinada em suco de uva reconstituído e suco de uva concentrado. Os valores de Z encontrados foram 6,1 °C para experimento com suco reconstituídos e 6,7 °C para experimento em suco concentrado. Para as diferentes cepas obtidas de coleção de culturas, os valores D encontrados a 87,8 °C variavam de 48 min. a 8,5 min., enquanto que para a cepa original do suco, o valor de D encontrado foi de 11,3 min.

Drumond & Pflug (1970) estudaram a inativação de esporos de *B. subtilis* por calor seco adaptando um incubador de umidade controlada para operar em altas temperaturas. Os esporos foram conservados vários meses em etanol 95 %, sendo depois lavados com água e congelados a - 10 °C, sendo descongelados no momento do uso. A inoculação foi feita em chapas de aço inox de 25,4 x 50,8 mm, com posterior equilíbrio a 2% ou 89% de umidade relativa por cerca de 12 h. As condições de tratamento caracterizavam um sistema aberto no qual a atividade de água era de 0,011 ou 0,0034. Houve variação de resistência em amostras do mesmo lote quando tratadas em dias diferentes, e os autores não consideraram o número inicial de esporos nos cálculos de resistência.

Toda (1970) utilizou esporos de *B. subtilis* para desenvolver sua teoria da não linearidade da resistência térmica dos esporos. 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 estado não viável. Concluiu que não há homogeneidade das populações no tocante à habilidade de germinação, fato este, apontado como uma das causas da curva não logarítmica de sobrevivência.

Alderton & Snell (1970) estudaram a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* NCA 1518 em ambientes com atividade de água de 0,0 a 0,9 utilizando tubos apropriados “TDT tubes” e aquecimento em banho de óleo. As atividades de água nas temperaturas estudadas eram obtidas por deposição de água nas paredes dos

tubos e imediatamente congeladas, em quantidades tais que, após a evacuação e selamento dos mesmos, as atividades de água desejadas eram obtidas. Em experimentos preliminares a maior resistência detectada foi para valor $A_a = 0,28$, tanto a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ como a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os experimentos definitivos foram conduzidos a $125\text{ }^{\circ}\text{C}$, $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, $135\text{ }^{\circ}\text{C}$, $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $145\text{ }^{\circ}\text{C}$, $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $154\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas a atividade de água foi sempre mantida a $0,28$. Os autores não encontraram gráfico de redução decimal linear, e propuseram um modelo matemático que permitiu linearizar os resultados obtidos. Determinaram que em $A_a = 1,0$ e $A_a = 0,0$; o valor “Z” do microrganismo é apenas função da temperatura.

Bond et al. (1971) realizaram estudos sobre a resistência térmica de esporos de várias espécies do gênero *Bacillus*, coletados de amostras do solo das instalações de pesquisas espaciais (Cabo Kennedy); estes autores utilizaram uma estufa de ar forçado a $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ e plaquetas de aço de $12,7 \times 12,7\text{ mm}$ como portadoras dos esporos. O solo contendo os esporos era suspenso em soluções de etanol 95% e em seguida, alíquotas de 1 mL desta suspensão eram aplicadas em cada placa de aço e, secas sobre sílica gel por 16 horas antes dos testes. Calcularam uma reta hipotética de sobrevivência para a população isolada, e observaram que a inclinação dessa reta fora determinada quase que exclusivamente pelos organismos mais resistentes, embora estes estivessem presentes em menor número, apresentando um valor $D_{125} = 13,9\text{ h}$.

Brannen & Gasrt (1972) estudaram a possibilidade de equacionar um modelo cinético incorporando a umidade relativa como um dos parâmetros na resistência térmica de esporos de microrganismos. Tal modelo poderia ser útil para estimar a esterilização de espaçonaves em ciclos de $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $125\text{ }^{\circ}\text{C}$, partindo de dados obtidos a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para esse experimento foram utilizados esporos de *B. subtilis* var. *niger* em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ com ar circulante totalmente renovado a cada 1,0 min., e com atividade de água variando entre 0,000033 e 0,00167. A precisão da atividade de água foi obtida através da saturação do ar, com posterior condensação ao ponto de orvalho em temperaturas tais que, após o aquecimento a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ os valores desejados eram obtidos. Nesses estudos os esporos estocados em etanol 95% foram inoculados em discos de alumínio com 31,7 mm de diâmetro x 0,047 de espessura e recobertos por outro disco, sendo as menores resistências detectadas no intervalo entre $A_a = 0,0002 - 0,0008$.

Bond et al. (1973), trabalhando com solo aquecido, encontraram espécies do gênero *Bacillus* apresentando uma extraordinária resistência ao calor seco ($D_{125\text{ }^{\circ}\text{C}} = 139\text{ h}$) e uma relativa sensibilidade ao calor úmido ($D = 280\text{ }^{\circ}\text{C} = 61\text{ min.}$).

Prado Filho & Kiefer (1974) publicaram um esquema de construção de um equipamento para o tratamento térmico de esporos de bactérias em corrente de gases à pressão atmosférica, cuja a atividade de água podia ser parcialmente controlada em temperaturas entre $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No mesmo ano, o autor (Prado Filho, 1974) publicou estudos sobre os parâmetros termodinâmicos envolvidos na inativação térmica de esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 por calor seco em corrente de ar e CO_2 . A energia de ativação (ΔF^*) calculada, indicou no processo de inativação uma reação mono-molecular de primeira ordem envolvendo proteína. A entropia de ativação calculada (ΔS^*) indicou que a inativação se dava pelo rompimento de poucas ligações importantes para a atividade biológica, mas sem influência marcante na conformação das moléculas envolvidas.

Reynolds et al. (1974) publicaram os resultados de suas pesquisas de inativação, por calor seco, de esporos isolados do solo de dependências de montadoras de veículos espaciais, no Centro Espacial de Cabo Kennedy. O equipamento usado foi estufa com volume de $0,016\text{ m}^3$ com recirculação do ar que a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tinha UR = 30 %. As temperaturas empregadas foram $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $115\text{ }^{\circ}\text{C}$, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ com e sem tratamento dos esporos por radiação, tratamento esse feito com vistas à detecção de ação sinérgica. A $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi detectada uma fração da população com $D = 29\text{ h}$, que é muito maior que o valor D de *B. subtilis* var. *niger* tomado como padrão de resistência ao calor seco. Em todas as temperaturas foram detectadas duas frações distintas da população, sendo que a mais resistente representava apenas cerca de 1 % do total.

Emborg (1974) estudou a ação conjunta de radiação e calor seco na inativação de microrganismos. Esporos de *B. subtilis* (cepa padrão de Statens Serum Institut), *B. globiggi* ATCC 9372 e *B. sphaericus* foram inoculados em folha de polietileno, equilibrados cerca de 12 h a UR = 30 %, e então tratados simultaneamente por radiação (25 a 70 Krad / h) e calor seco a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. No sistema de tratamento não havia

movimentação de gás nem controle da atividade de água. Nas condições testadas *B. sphaericus* mostrou-se mais resistente.

Prado Filho (1975), publicou estudo sobre os parâmetros termodinâmicos envolvidos na inativação térmica dos esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 por calor seco em corrente de ar e CO₂. O equipamento utilizado, descrito em publicação anterior (Prado Filho, 1974), trabalhava em sistema aberto com aquecimento e resfriamento instantâneos da amostra. Os esporos inoculados em lâmina de alumínio (55 x 10 x 0,04 mm) foram equilibrados antes do tratamento em atmosfera com atividade de água 1,0; 0,6; 0,3 e 0,0. Nas temperaturas testadas (120 °C, 130 °C, 140 °C e 150 °C) a atividade de água do ambiente de tratamento foi sempre menor que 0,016. Embora havendo resistência em ar e CO₂, em cada gás ela foi feita em função apenas da temperatura e do teor de umidade dos esporos, sendo que esse ultimo parâmetro foi de 37,2 %; 13,8 % e 5,0 %.

Molin & Östlund (1975) apresentaram equipamento experimental para pesquisar o emprego da radiação infravermelha na esterilização por calor seco. Como indicador biológico empregaram esporos de *B. subtilis* ATCC 6333 inoculados em lamínulas de microscopia, as quais eram posteriormente equilibradas de 3 a 10 dias a 21 °C e 79 % de UR. A atividade de água nas temperaturas estudadas (130 °C e 180 °C) neste sistema aberto variou de 0,001 a 0,005. Nos valores baixos de atividade de água, a resistência foi função apenas da temperatura, porém, em todas as temperaturas foi detectada uma fração da população com resistência maior, o que dá origem a dois segmentos da reta na representação gráfica do tempo de redução decimal. Os autores atribuíram esta diferença na resistência à fatores fisiológicos dos esporos no momento da coleta.

Bond & Favero (1975) estudaram a resistência térmica de uma espécie de *Bacillus* (*Bacillus* sp ATCC 27380) isolado do solo do Centro Espacial de Cabo Kennedy. Os esporos aquecidos por calor seco em temperaturas superiores a 125 °C apresentaram “ombro” característico de ativação e inativação térmica simultâneas. O número de esporos viáveis antes do tratamento térmico foi calculado em apenas 2,5 % da população realmente presente na amostra, e a resistência a 130 °C ($A_a < 0,01$) foi caracterizada por

um valor D extremamente alto ($D = 54$ h). Nas condições experimentais a resistência foi uma função apenas da temperatura, tendo sido possível o cálculo de um $Z = 15$ °C.

Von Schelhorn & Heiss (1975) estudaram a influência da umidade relativa sobre a resistência térmica de esporos de fungos. Trabalharam com esporos de *Aspergillus niger*, *Humicola fuscoatra* e *Byssoschlamys fulva*, sendo que foi usado H_2SO_4 e P_2O_5 para manter as diferentes atividades de água no ambiente em que os esporos se encontravam. O método utilizado para determinar o valor D constituía de um tubo menor contendo os esporos, e este tubo por sua vez era colocado dentro de um tubo maior, no qual havia a substância que regulava a atividade de água no ambiente. O tubo maior era selado. Após várias semanas, o equilíbrio era atingido, e o conjunto era submetido ao tratamento térmico em banho aquecido nas temperaturas de tratamento desejadas. O valor D encontrado para *Byssoschlamys fulva* foi de 25 min. a 0 % de umidade relativa e temperatura de 120 °C.

Puleo et al. (1975) desenvolveram um método de coleta de esporos em ambiente utilizado para montagem de naves espaciais. Os esporos coletados em fitas de Teflon (politetra Fluoretilico) de 7,3 x 183 cm, foram tratados a 113 °C e 125 °C em estufas de ar forçado sem controle da atividade de água ambiental. O cálculo de valores D para a população heterogênea total (segundo o método “Replicata fracionária - umidade relativa” Pflug, 1960), não resultou em retas que passassem pela população inicial. No entanto, os cálculos baseados apenas no número mais provável de sobreviventes, “Most Provable Number” (MPN) indicaram a presença de uma fração da população com $D_{113} = 14$ h e $D_{125} = 6,3$ h.

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, os esporos de ambos os casos, advindos da cultura pura, apresentaram uma fração potencialmente mais

resistente. Os esporos tanto do *C. botulinum* 62 como do 213 B, quando presentes em alimentos de baixa acidez podem ser sensibilizados em pH normal do alimento.

Molin & Östlund (1976) estudaram a resistência térmica de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 ao calor seco de radiação infra-vermelha (Molin & Östlund, 1975), dando especial enfoque ao número de esporos presentes nas amostras tratadas. Determinaram que amostras com concentrações intermediárias de esporos mostravam um valor D mais elevado que concentrações maiores e menores, contudo, o valor Z da população não era influenciado. Os autores atribuíram essa variação a diferenças de emissão e absorção de calor nas diferentes concentrações de esporos, a diferentes disponibilidades de biomassa nas amostras, e às diferentes proporções de esporos em contato com o vidro da lâminula portadora. A presença de “ombros” levou os autores a não considerar o número inicial de esporos nos cálculos do valor D.

Han (1977) estudou a resistência térmica de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372, *B. stearothermophilus* 1518 e *C. sporogenes* ATCC 19404 ao calor seco (120 °C, Aa < 0,012) e ao vapor superaquecido (120 °C, Aa = 0,51), com e sem tratamento prévio com ácido peracético ou água oxigenada. Os esporos foram previamente condicionados por 48h em ambiente de atividade de água 1,00; 0,33; e 0,00. O equipamento utilizado foi o descrito por Prado Filho & Kiefer (1974) com entrada adicional de vapor fluente. Em ar com atividade de água baixa (120 °C, Aa < 0,012) esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 apresentaram maior resistência que esporos de *B. stearothermophilus* 1518. Em vapor superaquecido (120 °C, Aa = 0,51) a situação inverteu-se, porém, a diferença foi muito menor. Em ambas as condições *C. sporogenes* ATCC 19404 apresentou a menor resistência, cerca de dez vezes menor que a resistência de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372.

Fisher & Pflug (1977) trabalhando com esporos de *B. subtilis* estudaram o efeito sinérgico do tratamento úmido e seco conjugados com radiação. As dosagens de radiação foram 5, 10 e 20 Krad / h e as temperaturas em experimentos prévios variavam entre 76 °C e 125 °C com atividade de água variando de 0,25 a 0,82 nos tratamentos por calor seco. Os esporos eram inoculados em plaquetas de aço de 127 x 127 mm e equilibrados em Aa = 0,5 por 24 h. Esporos irradiados a 110 °C apresentaram maior valor D na região de

atividade de água 0,3 a 0,4; o mesmo acontecendo com esporos que apenas receberam tratamento térmico a 90 °C, 105 °C, 110 °C e 125 °C. Os autores 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 o binômio calor úmido - radiação (SI = 1,5).

Peeler et al. (1977) estudaram a resistência térmica de esporos de *B. subtilis* var. *niger* em sistema fechado, visando a descontaminação de espaçonaves. Os esporos foram inoculados em cadinhos de aço inoxidável, os quais foram fechados em latas 57,2 x 73 mm (120 cadinhos por lata), que recebiam P_2O_5 ou água em quantidade necessária para obter-se varias atividades de água no ambiente, nas temperaturas desejadas. Em experimentos preliminares a 113 °C e 125 °C a atividade de água variou de 0,0 a 1,0 e nos experimentos definitivos a 85 °C, 90 °C, 95 °C, 100 °C, 105 °C e 120 °C, a Aa foi menor que 0,01 e igual a 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 adaptavam a modelos matemáticos ou mecânicos, o que levou os autores a determinar a resistência pelo número mais provável de sobreviventes (MPN).

Molin (1977a) publicou um estudo comparativo da resistência térmica de esporos do gênero *Bacillus* ao calor seco, empregando equipamento de radiação infra-vermelho (Molin & Östlund, 1975). Os microrganismos estudados foram : *B. cereus* NCTB 9372, *B. coagulans* NCTB 9365, *B. megaterium* NCTB 9376, *B. polymyxa* NCTB 8158, *B. pumilus* NCTB 10337, *B. stearothermophilus* ATCC 7953, *B. stearothermophilus* NCTB 10339, *B. subtilis* NCTB 8054 e *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372. Os esporos foram condicionados a 22 ± 2 °C e Aa = 0,33 de 3 a 10 dias, e foram tratados em temperaturas variando de 90 °C a 180 °C. Neste intervalo de temperatura, os esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372, mostraram um valor D maior que outros microrganismos. O autor verificou ainda que os valores Z dependiam da capacidade de retenção de água pelo esporo.

No mesmo ano Molin (1977b), usando o mesmo equipamento e esporos de *B. subtilis* var. *niger* e *B. stearothermophilus*, estudou a variação do valor Z em calor seco,

em intervalos grandes de temperaturas. Para *B. subtilis* var. *niger* o gráfico do valor D versus temperatura é linear em intervalos de 37 °C a 190 °C, contanto que a umidade seja mantida a níveis baixos e o valor $Z = 23$ °C constante. Para *B. stearothermophilus* o gráfico é função linear entre 150 °C e 180 °C com $Z = 29$ °C, mas desvia-se da linearidade a temperaturas mais baixas, com decréscimo de valor Z . Se os esporos fossem previamente secos, Z , na faixa linear (150 °C - 180 °C) baixava para 23 °C.

Rank & Plfug (1977) estudaram a resistência térmica de esporos de *B. subtilis* var. *niger*, inoculados sobre superfície de metal e sobre batata, aquecidos em forno com ar a 175 °C. Os autores verificaram que os esporos de *B. subtilis* var. *niger* são mais resistentes ao calor seco quando inoculados sobre superfície de batata, do que sobre superfície de metal. Após inóculo sobre a superfície de batata e do metal, ambos eram equilibrados a 22 °C com 50 % de umidade relativa por 18 a 24 horas; para depois sofrerem tratamento. O valor D_{150} encontrado para *B. subtilis* var. *niger* em superfície de metal era de 0,92 min., enquanto que para superfície de batata era de 5,6 min. Os autores justificaram que no caso do metal, o ambiente que cerca os esporos está em equilíbrio com a atmosfera no ar do forno, enquanto que no caso da batata, este ambiente que os cerca está com uma umidade mais alta que o ar do ambiente, pois a água se difunde continuamente da batata para o ar do forno.

Quast et al. (1977) utilizaram um equipamento asséptico marca DOLE para estudar a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* 1518 frente a vapor superaquecido. Nas temperaturas estudadas (152 °C; 155,6 °C e 159 °C) a atividade de água teria variado entre 0,15 e 0,20. Com base nos valores D obtidos nas temperaturas estudadas os autores calcularam um valor $Z = 17$ °C e por extrapolação concluíram que 6,3 min. a 170 °C são suficientes para causar uma redução da ordem de 10^{10} na população de *B. stearothermophilus*, sendo a recomendação segura, com respeito a *C. botulinum* considerado 10 vezes menos resistente que o microrganismo pesquisado.

Harnulv et al. (1977) realizaram um trabalho sobre resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* em vapor de água, solução de NaCl, LiCl, glucose, glicerol, ovo integral em pó, concentrado proteico de peixe e farinha de trigo em várias atividades de água. Em vapor com solução de glicerol, a resistência foi máxima a uma baixa

atividade de água, porém, esta A_w , não chegou a zero. Em solução de NaCl e glucose houve uma pequena variação na resistência térmica com a diminuição da atividade de água, ao passo que em soluções de LiCl, a resistência térmica foi mínima em atividade de água ao redor de 0,5. Quando aquecidos o ovo em pó, o concentrado proteico de peixe e a farinha de trigo, os esporos apresentaram máxima resistência em valores de atividade de água variando entre 0,2 e 0,4.

Puleo et al. (1978) estudaram a resistência térmica de espécies do gênero *Bacillus* isolados de áreas de montagem de espaçonaves, com vistas à diminuição da duração dos ciclos de descontaminação. O equipamento utilizado foi uma estufa com nitrogênio fluindo a 3 l / min., com umidade 1,2 mg H₂O / L e as temperaturas foram 105 °C; 111,7 °C; 130 °C e 135 °C. As espécies estudadas foram *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*. Os autores concluíram que a maioria das espécies do gênero *Bacillus* isoladas de espaçonave, tem resistência menor ou no máximo igual a *B. subtilis* var. *niger*.

Estudos sobre resistência térmica de esporos de *C. botulinum* G 2A foram realizados por Alderton et al. (1980). Esporos liofilizados foram submetidos a temperaturas de 125 °C a 160 °C, em ambientes com atividade de água variando de 0,0 a 0,9. Os métodos de trabalho foram os mesmos descritos anteriormente por Alderton & Snell (1970). Os autores encontraram em $A_w = 1,0$ um valor D maior que em $A_w = 0,0$ e estabeleceram que, com a diminuição da umidade ambiental, a resistência de microrganismos cresce, apresentando a 130 °C e $A_w = 0,4$ um D = 24,2 min.

Beaman & Gerhardt (1980) estudaram vinte e oito tipos de esporos sensíveis a lisozima entre sete espécies de *Bacillus* representativos de termófilos, mesófilos e psicrófilos. A resistência das espécies foi alterada pela desmineralização dos esporos originais para esporos protonados e remineralização dos esporos protonados para esporos calcificados e pela adaptação térmica nas temperaturas de esporulação mínima, ótima e máxima.

Chumney & Adams (1980), estudando esporos de *C. perfringens* NTCC 8798, verificaram que os mesmos tornaram-se sensíveis à inibição pelo cloreto de sódio e a mistura de polimixina e neomicina, quando aquecidos a temperaturas de 70 °C a 100 °C.

Os autores explicam o aumento da sensibilidade provocada por estes agentes da seguinte maneira: o coeficiente de temperatura de indução dos danos celulares conduziram ao aumento da sensibilidade. Verificaram que na ausência desses agentes, os esporos recuperaram a resistência quase ao mesmo tempo. As combinações dos agentes inibidores tiveram menor efeito sobre os esporos, do que cada um empregado individualmente.

Srimani & Loncin (1980), desenvolveram um equipamento para determinar o valor D de microrganismos à elevadas temperaturas. Para comparar os resultados extrapolados com valores D determinados convencionalmente, foram feitos experimentos pelo método de Stumbo (1965) utilizando esporos de *B. subtilis* a 100 °C.

Srimani et al. (1980), utilizando este tipo de esterilização determinaram os valores D para esporos de *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* a temperaturas de 115 °C e 148 °C. Foi observado que os valores D permanecem aproximadamente constantes em temperaturas acima de 135 °C. O valor Z foi 6,4 °C para *B. stearothermophilus* e 3,7 °C para *B. subtilis*.

Odlang et al. (1981), utilizando esporos de *B. subtilis* 5230 liofilizados em tampão fosfato, estocados nas temperaturas de 2 °C a 8 °C por 9 a 27 meses, determinaram a sua resistência térmica, em um termoresistômetro, após reconstituição em solução tampão ou solução salina. Os esporos liofilizados mantiveram sua resistência térmica e o nível da população durante todos os períodos testes. Os valores D obtidos foram 0,44 a 0,54 min. a 121 °C e os valores Z de 6,1 a 6,6 °C.

Reyes et al. (1981) pesquisaram a resistência térmica de *Bacillus* sp. ck 4 - 6, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* NCA 1518, *B. megaterium* HTCC 64583 e *B. subtilis* var. *niger*, utilizando equipamento e manuseio de amostras propostos por Peeler et al. (1977). A atividade de água no meio ambiente durante o tratamento variou de 0,001 a 1,00 e a temperatura variou de 100 °C a 125 °C. Para *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 verificou-se um $F = 99,4$ h a $Aa = 0,07$ e para *Bacillus* sp. ck 4-6 um $F = 99,4$ h a Aa variando de 0,01 a 0,07. Os autores constataram resistências diferentes em esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 equilibrados à mesma atividade de água (1,0) com e sem contato direto com tampão fosfato.

Prado Filho (1982) estudou a resistência térmica de esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 sendo que as temperaturas empregadas no tratamento foram: 100; 110; 120; 130; 140; 150 e 160 °C. A metodologia utilizada consistia em inocular lâminas de alumínio (10 x 15 x 0,02 mm) fixadas em suportes. As amostras eram equilibradas antes do tratamento a temperaturas de 30 °C e umidade relativa de 75% por 8 semanas. O meio de aquecimento utilizado foi vapor superaquecido e a atividade de água variou de 0,153 a 0,951. O autor constatou que a maior resistência térmica ocorria quando a temperatura era de 130 °C e $A_a = 0,355$ tendo encontrado um valor $D = 123,7$ min. para esporos inoculados diretamente da suspensão aquosa e um valor $D = 149,9$ min. para esporos condicionados por 8 semanas a 30 °C e $A_a = 0,75$. Também concluiu que a resistência térmica não é a mesma para toda a população, verificando sempre existir uma fração mais resistente.

Bayliss & Waites (1982) estudaram a relação do uso simultâneo de tratamentos com radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio como método de esterilização, concluindo que a alta intensidade de radiação ultravioleta ($1,8 \times 10$ mW / m) em esporos de *B. subtilis* na presença de 2,5 % (peso / volume) de peróxido de hidrogênio resultou em um tempo de morte muito rápido dos esporos.

Oxborrow et al. (1983) pesquisaram o efeito da temperatura e umidade relativa na esterilização por óxido de etileno. O microrganismo utilizado foi *B. subtilis* var. *niger*, e o inóculo era feito em tiras de papel colocadas em estufa, com o gás esterilizante. Os autores variaram a umidade relativa de 10 a 70 % , e a temperatura de 30 °C a 70 °C. Com isto verificaram que para temperatura acima de 50 °C e umidade relativa variando entre 30 a 50 %, havia pouca influência sobre o valor D. Testes utilizando umidade relativa baixa (10 a 30 %) mostraram um valor D alto, determinando um $D = 15$ min. a 30 °C e 60 % de UR e $D = 1,1$ min a 70 °C e 60 % de UR.

Alcock (1984), estudando a elevação da resistência térmica de várias cepas de *C. sporogenes* após choque térmico, verificou que, usando tampão ácido dimetil glutárico / NaOH, o choque térmico tem máximo efeito sobre a resistência térmica, e que choque térmico a 80 ou 100 °C, aumenta a resistência aparente ao aquecimento a 121,1 °C, em todos os meios de cultura empregados, com exceção da cepa NCIB 10.696.

Contiero (1984) estudou a resistência térmica de conidiósporos de *Aspergillus parasiticus* 403, produtor de aflatoxina B1 e G1, em ar superaquecido. O autor utilizou conidiósporos estocados em suspensão aquosa a cerca de 5 °C. Antes de serem submetidos a tratamento térmico, os conidiósporos eram secos a vácuo sendo preconditionados por 48 horas em ambiente de $A_a = 0,75$. As temperaturas de tratamento utilizadas variaram de 50 °C a 120 °C, e os valores D encontrados foram 24 min. a 100°C e $A_a = 0,032$; 22,5 min. a 105 °C e $A_a = 0,027$; 11,5 min. a 110 °C e $A_a = 0,024$ e 9,0 min. a 115 °C e $A_a = 0,019$.

Leader (1984), estudou a ação esporicida do peróxido de hidrogênio em concentrações variando de 11,8 a 41,3% nas temperaturas de 20 °C a 65 °C, usando esporos secos e úmidos de *B. subtilis* SA 22 (NCA 72-52). Os esporos secos apresentaram duas vezes mais resistência aos efeitos esporicidas do peróxido de hidrogênio que os esporos úmidos.

Malladis & 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 bloco sólido aquecido. Os microrganismos utilizados para obtenção de resultados experimentais foram o *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* 52330 e o *C. sporogenes* PA 3679-45 e a temperatura utilizada foi de 120 °C. Os resultados mostraram precisão e reprodutibilidade ao novo método. Pelos resultados obtidos foi constatado que a resistência de *B. subtilis* 5230 foi maior a temperaturas abaixo de 143,3 °C, em todos os gases. Entre 143,3 °C e 148,9 °C as resistências se equivalem, ficando *C. sporogenes* PA 3679-45 mais resistente acima de 148,9 °C, em função de seu valor Z maior. Os valores D são maiores em He e N₂, para todos os microrganismos utilizados, não influenciando o peso molecular na distribuição energética, nem mostrando o oxigênio especial efeito inativador, como anteriormente era suposto.

Kahoury et al. (1987) trabalharam com esporos de *B. megaterium*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, colhidos de culturas esporuladas em diferentes temperaturas e na presença de etanol. Esses esporos apresentaram resistências térmicas diferentes. Existe uma correlação direta entre a temperatura de esporulação e a temperatura de morte dos

esporos, sendo os mesmos mais sensíveis quando formados em meio suplementado com etanol.

Malladis & Scholefield (1987), estudaram a relação entre as características de resistência térmica e a composição dos esporos bacterianos em cinco cepas de *B. stearothermophilus*. Foi encontrada uma relação entre o ácido dipicolínico, o conteúdo de cálcio dos esporos e as características de resistência térmica. A estabilidade do ácido dipicolínico também tem um significado na resistência térmica.

Feherry et al. (1987) trabalharam com uma suspensão aquosa de esporos de *B. stearothermophilus* ATCC 12980 aquecidos em diferentes temperaturas por vários intervalos de tempo, em um resistômetro. Sobre meio de cultura analítico com antibióticos suplementado com 0,1 % de amido solúvel, 0,9 % de NaCl (AAMS -S) e, incubado a 55 °C, os esporos que não sofreram inativação formaram colônias somente sobre meio analítico de antibiótico, suplementado com 0,1 % de amido solúvel (AAMS). Os valores D dos esporos recuperados sobre AAMS foram 62,04; 18,00; 8,00; 3,33 e 1,05 min. à 112,8 °C; 115,6 °C; 118,3 °C; 121,1 °C e 123,9 °C respectivamente. Os valores D dos esporos recuperados em AAMS-S foram menores, sendo que o valor de Z computado dos esporos recuperados em AAMS foi de 8,3 °C e de esporos recuperados em AAMS - S de 7,6 °C.

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.

Lynch & Potter (1988) compararam os efeitos dos ácidos málico, acético, cítrico, láctico e clorídrico sobre a inativação térmica de esporos de *B. stearothermophilus* e *B. coagulans* em salsichas tipo "frankfurter" e massa de salsicha. Para *B. stearothermophilus* a 121 °C em pH 5,2 não houve diferenças nas taxas de morte térmica, mas em pH 4,6 uma grande taxa de inativação foi observada usando ácidos láctico, cítrico ou acético, não ocorrendo o mesmo com o uso de ácido málico ou clorídrico. Para *B. coagulans* a 105 °C ou 110 °C e pH 4,5 não houve diferenças na ativação de esporos entre os cinco ácidos,

mas, nessas mesmas temperaturas e pH 4,2, houve uma rápida taxa de inativação. A inoculação em emulsão de carne no estado ácido e a conservação a 4 °C por 70 h diminuiu a resistência dos esporos de *B. coagulans* em pH 4,5.

Etoa & Mitchiels (1988) estudaram esporos de *B. stearothermophilus* CNCH 5781 que foram suspensos em água destilada. Aliquotas foram inoculadas em tubos capilares em diferentes intervalos de tempos à temperatura subletal de 63 °C ou 100 °C para ativação térmica de germinação. Após o choque seguiu-se um tratamento térmico a 121,1 °C e o valor D obtido foi de 3,5 min.

Gaze & Brown (1990) avaliaram a resistência térmica de *B. stearothermophilus*, *C. botulinum* e *C. sporogenes* quando aquecidos em tampão neutro a uma faixa de temperatura de 110-130 °C (*B. stearothermophilus*) ou 110-120 °C (*Clostridium spp.*). Os valores Z obtidos para todas as espécies foram similares, variando de 8,01 a 10,26 °C.

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

Grisotto (1992) apresentou um plano de construção de uma câmara de tratamento térmico de esporos de microrganismos. Seu funcionamento foi testado fazendo-se tratamentos térmicos sobre esporos de *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 com vapor super aquecido à temperaturas de 128 °C; 137 °C; 142 °C e 150 °C, as quais correspondem a atividades de água médias de 0,40; 0,30; 0,25 e 0,20 respectivamente, nas condições ambientais dos experimentos. Os resultados obtidos em todas as temperaturas apresentaram fenômenos de ativação e inativação simultâneos ou sequenciais e a presença de esporos muito mais resistentes que a média da população tratada. Na temperatura de 128 °C $A_a = 0,40$ o valor D da fração mais resistente da população de esporos tratada foi de 195,31 min.. Ao contrario das outras temperaturas, na temperatura de 137 °C ($A_a = 0,30$) não foram evidenciados fenômenos de ativação ou inativação, assim como não foi detectada uma fração mais resistente, devido a insuficiência do tempo de tratamento. Os parâmetros técnicos do equipamento citados acima foram publicados por Prado Filho & Grisotto (1994), e os valores D médios obtidos no estudo foram 242

min.; 32,86 min.; 14,60 min. e 9,72 min.; respectivamente; à 128 °C; 137 °C; 142 °C e 150°C (Prado Filho et al., 1996)

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; valores D aumentaram em meios não acidificados. Diferenças em valores D em ambos os substratos foram dependentes da temperatura, chegando-se a conclusão de que ambos, pH e a natureza do substrato, afetam a resistência dos esporos.

Maggi et al. (1996), estudando a possibilidade de preservação de alimentos de baixa acidez por tratamento de alta pressão combinada 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, nas seguintes temperaturas: 20, 60, 80 e 90 °C. A 1500 Mpa e a uma temperatura de 20 °C por cinco min. não houve alteração dos 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, uma concentração de 10^5 esporos / mL foram totalmente esterilizados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

3.1.1 - Microrganismo estudado

O microrganismo utilizado foi o *Bacillus cereus* IAL 55, cedido gentilmente pelo Instituto Adolfo Lutz.

3.1.2 - Meios de Cultura

3.1.2.1 - Meio de ativação da cultura liofilizada de *Bacillus cereus*:

Caldo nutriente Glucose, extrato de Levedura e Triptona (GLT).

Dextrose	20 g
Extrato de levedura	5 g
Peptona	10 g
Água destilada	1000 ml

3.1.2.2 - Meio para produção dos esporos:

Meio específico para a produção de esporos 0582 (DIFCO).

Extrato de carne	1,5 g
Extrato de levedura	3,0 g
Caseína	4,0 g
Dextrose	1,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 ml
Sulfato de Mercúrio (0,1 - 1,0 ml) de uma solução 40 %	
pH	6,5

3.1.2.3 - Meio para contagem das UFC:

Para realizar a contagem das UFC, após o tratamento térmico, foi utilizado o meio “PLATE COUNT AGAR” PCA (OXOID)

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

3.1.3 - Controladores da umidade no ambiente de condicionamento.

Para o controle da umidade ambiental durante os períodos de condicionamento, foram utilizadas soluções saturadas de NaCl para Aa 0,75; sílica gel para Aa = 0,0 e ambiente de refrigerador doméstico com Aa média = 0,43 e temperatura média de 7 °C.

3.1.4 - Equipamento para tratamento térmico dos esporos.

O equipamento para tratamento térmico dos esporos com vapor superaquecido, (Apêndice 1 e 2), 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. (Prado Filho, 1987a).

Os suportes das lâminas de alumínio, portadoras de esporos (Apêndice 3), foram feitos de fio de níquel - cromo (Grisotto, 1992).

3.2 - Métodos:

3.2.1 - Produção de esporos:

Uma cultura estoque de *B. cereus* IAL 55 foi revigorada em caldo nutriente GLT por 72 horas a 36 ± 1 °C. Quando constatada visualmente uma turvação intensa, alíquotas de 2,5 mL do meio foram transferidas para uma superfície de 100 mL do meio de esporulação contidos em Erlenmeyer de 1000 mL, para obter-se uma superfície maior com pequeno volume. Foram utilizados 5 frascos. Durante a incubação a 36 ± 1 °C por 72 horas, foram feitas observações periódicas ao microscópio e, constatada esporulação praticamente total. Tanto os esporos como as células esporuladas foram colhidas em tubos contendo água destilada previamente esterilizada, raspando-se a superfície com um bastonete de vidro em "L".

Os tubos foram incubados por 24 h a 40 °C para acelerar o processo de liberação dos esporos que ainda estavam contidos nas células (Grisotto, 1992).

Após serem incubados, o volume total foi centrifugado a $1.500 \times g$ por 15 min., separando-se a massa de esporos. Esta massa de esporos foi retomada e ressuspendida em água esterilizada e de novo centrifugada. Esta operação foi executada 5 vezes (Grisotto, 1992). Feita a última centrifugação, os esporos foram suspensos em 20 mL de água destilada e estocados a 5 °C até serem utilizados.

Posteriormente uma das suspensões estocadas foi diluída para contagem posterior em câmara de Neubauer segundo metodologia de Collins & Lyne (1970). Esta suspensão estoque contendo $7,32 \times 10^{10}$ esporos / mL foi diluída para $7,32 \times 10^8$ esporos / mL, sendo então, utilizada para inoculação das lâminas portadoras durante o condicionamento e posterior tratamento.

3.2.2 - Preparação das amostras.

As amostras para condicionamento e tratamento seguem o mesmo padrão utilizado por Prado Filho (1987 b) e Grisotto (1992), sendo as lâminas de alumínio, medindo 10 x 15 x 0,02 mm, fixadas em suportes pôr mínima dobradura, e esterilizadas em placas de Petry (Apêndice 3). Estas lâminas após esterilização foram inoculadas com 25 µL da suspensão de esporos, o que corresponde a uma média de $1,831 \times 10^7$ esporos inoculados por lâmina.

Após inoculação, as placas de Petri contendo os esporos foram transferidas para um dessecador, no qual foi feito vácuo durante 15 min., tempo suficiente para que toda a água da gota evaporasse deixando, contudo, os esporos ainda úmidos. Atingido o tempo admitia-se, lentamente, a entrada de ar filtrado por algodão para a quebra do vácuo.

3.2.3 - Condicionamento das amostras

Os suportes devidamente inoculados e colocados nas placas de Petri, foram condicionados em três diferentes atividades de água, $A_a = 0,0$; $A_a = 0,75$ e $A_a = 0,43$ por até 150 dias, sendo que a cada 30 dias eram tiradas amostras para tratamento térmico.

Para as duas primeiras ($A_a = 0,0$ e $A_a = 0,75$) foram utilizados potes plásticos de 1,5 litros, medindo 140 mm de altura e 110 mm de diâmetro, previamente esterilizados com solução de hipoclorito de sódio 2%, contendo as soluções controladoras de umidade, (3.1.3). Dentro desses potes, também foram introduzidos suportes confeccionados de cortiça e madeira, para evitar um eventual contato direto das placas contendo os esporos, com as soluções controladoras de umidade, durante o condicionamento, (Apêndice 4), contato este que poderia alterar os resultados (Murrel & Scott, 1966). Os frascos então foram vedados com fita gomada, para que a umidade externa não interferisse no ambiente interno, todo o processo foi feito em câmara de fluxo laminar. Os frascos já preparados foram colocados em uma estufa de incubação a uma temperatura de 29 ± 1 °C.

Já a terceira atividade de água 0,43, foi a umidade relativa média, monitorada durante todo o condicionamento de 150 dias, dentro de um refrigerador doméstico, no qual as amostras preparadas permaneceram, a uma temperatura média de 7 °C. Para esta atividade de água, também foram utilizados frascos plásticos similares aos dos outros condicionamentos, mas não foi feita a vedação com a fita gomada, pois neste caso as amostras deveriam se equilibrar com o ambiente interno do refrigerador.

3.2.4 - Tratamento e manuseio das amostras

Em ensaios prévios, seguindo metodologia descrita por Grisotto (1992), determinou-se a temperatura de 140 °C, como sendo a de maior resistência térmica, isto é, a que apresentava um D maior. Com base nesta informação, optou-se por utilizar esta temperatura para a realização do presente trabalho.

Os tempos utilizados para os tratamentos das amostras frente ao vapor superaquecido (140 °C), foram 90; 120; 150; 180; 210; 240 e 270 min.

Quando o equipamento de tratamento (3.1.4) atingia a temperatura desejada, um suporte contendo uma lâmina era introduzida na câmara de tratamento com auxílio de uma pinça flambada, colocando-se esta, na posição horizontal, sendo a gaveta fechada automaticamente pela ação da mola elástica. O tempo para essa operação era de aproximadamente de quatro segundos. Uma vez fechada a gaveta, era acionado um cronômetro elétrico para registro do tempo de tratamento.

Após um intervalo de vinte segundos a mesma operação era repetida com a segunda lâmina.

Atingido o tempo estabelecido de tratamento o suporte com a lâmina era resfriado rapidamente, sendo estes, transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de uma solução de Tween a 0,008 % e 0,5 g de areia lavada e esterilizada com granulação menor que malha 100 Tyler.

Adotando-se um intervalo máximo de 35 a 40 min. os esporos foram raspados por meio de um bastão de vidro com ponta de borracha de silicone, sendo então o tubo agitado vigorosamente por 1 minuto, em agitador elétrico. A seguir foram feitas 6 diluições consecutivas em tubos com 9 mL de água destilada e esterilizada, sendo 1,0 mL de cada diluição plaqueado em quadruplicata em meio PCA e as placas incubadas a 37 °C por 48 horas. Em seguida realizava-se a contagem das UFC.

3.2.5 - Cálculo do valor D

Para o cálculo do valor D da população de esporos de *B. cereus* IAL 55 empregada nos testes, foram utilizados três métodos.

O primeiro deles é o preconizado por Stumbo (1973), o qual emprega a fórmula:

$$Dt = t / \log b - \log b.$$

Onde:

t = Tempo total de tratamento da amostra à temperatura escolhida.

a = Número de esporos viáveis no início do tratamento.

b = Número de esporos viáveis no final do tratamento.

Para a aplicação da fórmula citada, foi tomado como número inicial de esporos o valor $1,831 \times 10^7$, conforme descrito em 3.2.2, assumindo-se que todos os esporos seriam viáveis.

O segundo método permite obter o valor D a partir da equação de regressão calculada através dos dados obtidos, considerando-se apenas a fração mais resistente da população testada e não o número inicial de esporos inoculados. Neste caso o valor D reflete a resistência da fração mais resistente a cada tempo de condicionamento e não a resistência média da população.

O terceiro método consiste em uma extrapolação gráfica simples, realizada a partir dos gráficos das regressões lineares, obtidos pelo Software Harvard Graphics 3.0.

4 - RESULTADOS.

A Tabela 1 mostra os números de UFC obtidos em cada tempo de tratamento à 140 °C, sem condicionamento prévio, e também, os valores D calculados segundo a fórmula de Stumbo (1973).

As Tabelas 2; 3; 4; 5 e 6 mostram os números de UFC obtidos em cada tempo de tratamento à 140 °C, após condicionamentos prévios, e também, os valores D calculados segundo a fórmula de Stumbo (1973).

A Tabela 7 mostra os valores D obtidos pela fórmula de Stumbo (1973), comparados com os valores D obtidos pela regressão linear e, por extrapolação gráfica, a partir das retas de regressão linear, apresentando também o coeficiente de correlação de suas respectivas retas.

Atabela 8 mostra os valores médios em porcentagem dos resultados referentes à resistência térmica dos esporos de *B. cereus* IAL 55 expostos nos tempos máximo e mínimo, de tratamento com vapor superaquecido à 140 °C a uma atividade de água média de 0,264.

As Figuras 1; 3; 7; 11; 15 e 19 mostram o transcurso da inativação térmica nos tempos de tratamento empregados no presente estudo. As figuras mostram também, a ocorrência de evidentes fenômenos de ativação e inativação simultâneos ocorrendo em algumas combinações do binômio condicionamento prévio - tempo de tratamento. Sendo que a Figura 1 apresenta apenas apenas o resultado do tratamento térmico, pois neste caso, não houve condicionamento das amostras.

As Figuras 4; 5; 6; 8; 9; 10; 12; 13; 14; 16; 17; 18; 20; 21; e 22, mostram individualmente, para cada combinação condicionamento prévio - tempo de tratamento os

resultados obtidos, bem como as equações de regressão linear, seus coeficientes de correlação e os valores D calculados a partir das mesmas. Sendo que a Figura 2 apresenta os resultados das amostras que não foram submetidas ao condicionamento prévio.

TABELA 1 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973)
 $D = t / (\log a - \log b)$, referente aos esporos de *Bacillus cereus* IAL
 55 tratados à 140 °C à uma A_0 média = 0,264; sem
 condicionamento

Tempo de tratamento (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
90	$6,40 \times 10^3$	29,03
120	$5,05 \times 10^2$	26,32
150	$1,58 \times 10^2$	29,62
180	$7,70 \times 10^2$	41,12
210	$6,50 \times 10^2$	47,19
240	$8,10 \times 10^1$	44,82
270	$4,80 \times 10^1$	47,78

TABELA 2 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973)
 $D = t / (\log a - \log b)$, referente aos esporos de *Bacillus cereus* IAL
 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264; condicionados durante
 30 dias.

Condicionamento	Aa = 0,00 à 30 °C		Aa = 0,43 à 7 °C		Aa = 0,75 à 30 °C	
	UFC (média)	Valor D (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
Tempo de Tratamento (minuto)s						
90	$7,95 \times 10^3$	26,76	$1,79 \times 10^3$	22,44	$2,46 \times 10^3$	23,24
120	$9,95 \times 10^2$	18,14	$1,08 \times 10^3$	28,35	$3,15 \times 10^2$	25,18
150	$1,49 \times 10^3$	36,67	$5,40 \times 10^2$	33,10	$6,50 \times 10^2$	31,79
180	$5,40 \times 10^2$	39,73	$1,46 \times 10^2$	35,30	$6,80 \times 10^2$	40,62
210	$1,62 \times 10^2$	41,55	$4,25 \times 10^2$	41,18	$8,20 \times 10^2$	48,29
240	$3,10 \times 10^2$	50,29	$1,86 \times 10^2$	48,05	$7,75 \times 10^1$	44,66
270	$6,40 \times 10^1$	49,48	$2,50 \times 10^1$	46,04	$4,95 \times 10^1$	48,49

TABELA 3 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973)
 $D = t / (\log a - \log b)$, referente aos esporos de *Bacillus cereus* IAL
 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264; condicionados durante
 60 dias

Condicionamento	Aa = 0,00 à 30 °C		Aa = 0,43 à 7 °C		Aa = 0,75 à 30 °C	
	UFC	Valor D	UFC	Valor D	UFC	Valor D
Tempo de Tratamento (minutos)	(média)	(minutos)	(média)	(minutos)	(média)	(minutos)
90	$6,20 \times 10^3$	25,93	$1,94 \times 10^3$	22,64	$6,30 \times 10^2$	20,16
120	$1,58 \times 10^3$	29,53	$6,30 \times 10^2$	26,88	$1,00 \times 10^1$	22,80
150	$1,25 \times 10^3$	36,01	$3,90 \times 10^2$	38,53	$6,30 \times 10^1$	27,45
180	$7,90 \times 10^2$	41,24	$1,58 \times 10^2$	35,54	$2,51 \times 10^2$	37,01
210	$7,90 \times 10^2$	48,11	$5,00 \times 10^1$	37,74	$7,90 \times 10^1$	39,14
240	$3,90 \times 10^2$	51,37	$8,10 \times 10^1$	44,82	$3,10 \times 10^2$	50,29
270	$5,00 \times 10^1$	48,45	$1,90 \times 10^1$	45,08	$3,00 \times 10^1$	46,66

TABELA 4 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973)

D = t / (log a - log b) , referente aos esporos de *Bacillus cereus* IAL

55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264, condicionados durante

90 dias

Condicionamento	Aa = 0,00 à 30 °C		Aa = 0,43 à 7 °C		Aa = 0,75 à 30 °C	
	UFC (média)	Valor D (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
90	6,30 x 10 ³	25,98	1,98 x 10 ³	22,69	1,50 x 10 ²	25,98
120	1,25 x 10 ³	28,80	7,90 x 10 ²	27,49	7,90 x 10 ¹	28,80
150	6,30 x 10 ²	33,60	6,10 x 10 ²	33,97	5,00 x 10 ¹	33,60
180	5,00 x 10 ²	39,44	3,20 x 10 ²	37,83	1,00 x 10 ²	39,44
210	2,50 x 10 ²	43,16	2,50 x 10 ²	43,16	1,59 x 10 ²	43,16
240	6,30 x 10 ²	53,76	1,49 x 10 ²	47,15	3,10 x 10 ¹	53,76
270	3,10 x 10 ¹	46,85	1,00 x 10 ¹	43,11	1,60 x 10 ¹	44,56

TABELA 5 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973)
 $D = t / (\log a - \log b)$, referente aos esporos de *Bacillus cereus* IAL
 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264, condicionados durante
 120 dias

Condicionamento	Aa = 0,00 à 30 °C		Aa = 0,43 à 7 °C		Aa = 0,75 à 30 °C	
	UFC	Valor D	UFC	Valor D	UFC	Valor D
Tempo de Tratamento (minutos)	(média)	(minutos)	(média)	(minutos)	(média)	(minutos)
90	$2,51 \times 10^3$	23,30	$7,70 \times 10^2$	20,56	$1,60 \times 10^1$	14,85
120	$1,99 \times 10^3$	30,28	$5,00 \times 10^2$	26,29	$8,00 \times 10^0$	18,87
150	$1,00 \times 10^3$	35,19	$1,63 \times 10^2$	29,70	$1,00 \times 10^1$	23,95
180	$6,30 \times 10^2$	40,33	$9,50 \times 10^1$	34,01	$2,00 \times 10^1$	30,19
210	$3,90 \times 10^2$	44,95	$4,20 \times 10^1$	37,23	$2,50 \times 10^1$	35,81
240	$1,25 \times 10^2$	46,46	$4,40 \times 10^1$	42,70	$2,00 \times 10^1$	40,25
270	$1,40 \times 10^1$	44,14	$1,50 \times 10^1$	44,36	$8,00 \times 10^0$	42,45

TABELA 6 - Número de UFC e cálculo do valor D através da fórmula de Stumbo (1973)
 $D = t / (\log a - \log b)$, referente aos esporos de *Bacillus cereus* IAL
 55 tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264, condicionados durante
 150 dias

Condicionamento	Aa = 0,00 à 30 °C		Aa = 0,43 à 7 °C		Aa = 0,75 à 30 °C	
	UFC (média)	Valor D (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
90	5,00 x 10 ³	25,25	5,10 x 10 ²	19,75	1,70 x 10 ¹	14,92
120	3,15 x 10 ³	31,87	3,15 x 10 ²	25,18	1,30 x 10 ¹	19,51
150	1,91 x 10 ³	37,68	2,10 x 10 ²	30,36	8,00 x 10 ⁰	23,58
180	1,78 x 10 ³	44,88	3,00 x 10 ²	31,11	1,10 x 10 ¹	28,93
210	5,05 x 10 ²	40,98	5,00 x 10 ¹	37,74	1,00 x 10 ¹	33,53
240	1,35 x 10 ²	46,76	2,50 x 10 ¹	40,921	9,00 x 10 ⁰	38,04
270	2,00 x 10 ¹	45,29	1,60 x 10 ¹	44,287	1,10 x 10 ¹	43,39

TABELA 7 - Valores D máximos em minutos, calculados pela fórmula de Stumbo (1973)

$D = t / (\log a - \log b)$, por extrapolação gráfica e pela equação de regressão linear, dos esporos de *Bacillus cereus* tratados a 140 °C a uma Aa média = 0,264

CONDICIONAMENTOS			Valor D máximo	Valor D máximo	Valor D máximo	coeficiente de
tempo	umidade	temperatura	pela fórmula de	por extrapolação	por regressão	correlação da
(dias)	(Aa)	(°C)	Stumbo (1973)	gráfica	linear	regressão
				(minutos)	(minutos)	(r)
0	-	-	47,19	110,00	111,13	- 0,7988
	0,00	30	50,29	100,00	101,67	- 0,9300
30	0,43	7	48,06	114,00	116,82	- 0,8960
	0,75	30	48,49	140,00	141,58	- 0,7718
	0,00	30	51,37	107,00	108,79	- 0,9264
60	0,43	7	45,08	95,00	96,34	- 0,9722
	0,75	30	50,29	300,00	291,12	- 0,4863
	0,00	30	53,76	104,00	105,90	- 0,8744
90	0,43	7	47,15	97,00	96,25	- 0,9200
	0,75	30	53,76	260,00	260,21	- 0,9566
	0,00	30	46,46	76,00	71,43	- 0,923
120	0,43	7	44,36	108,00	107,26	- 0,9366
	0,75	30	42,45	*	2886,84	+ 0,1090
	0,00	30	46,76	80,00	79,94	- 0,8770
150	0,43	7	44,56	115,00	115,13	- 0,9466
	0,75	30	43,39	*	1063,26	- 0,5651

não foi possível o cálculo do valor “D”

TABELA 8 - Valores médios em porcentagem dos resultados referentes à resistência térmica dos esporos de *B. cereus* IAL 55 expostos nos tempos máximo e mínimo, de tratamento com vapor superaquecido à 140 °C a uma atividade de água média de 0,264.

CONDICIONAMENTOS			Percentual de resistentes ao	Percentual de resistentes ao
tempo (dias)	umidade (Aa)	temperatura (°C)	tratamento de 90 min	tratamento de 270 min
0	-	-	0,0349726 %	0,00026229 %
30	0,00	30	0,0434426 %	0,0003497 %
	0,43	7	0,0097814 %	0,0001366 %
	0,75	30	0,0134426 %	0,0002704 %
60	0,00	30	0,0338798 %	0,0002732 %
	0,43	7	0,0106011 %	0,0001038 %
	0,75	30	0,0034426 %	0,0001639 %
90	0,00	30	0,0344262 %	0,0001693 %
	0,43	7	0,0108197 %	0,0000546 %
	0,75	30	0,0008197 %	0,0000874 %
120	0,00	30	0,0137158 %	0,0000765 %
	0,43	7	0,0042076 %	0,0000820 %
	0,75	30	0,0000874 %	0,0000437 %
150	0,0	30	0,027322 %	0,000109 %
	0,43	7	0,0027869 %	0,0000874 %
	0,75	30	0,0000929 %	0,0000601 %

FIGURA - 1 Gráfico da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 sem condicionamento, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 2 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 sem condicionamento, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 3 Gráfico da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e a 7 °C em Aa = 0,43, por 30 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 4 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma Aa = 0,00 por 30 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 5 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* /AL 55 condicionados à 7 °C a uma $A_a = 0,43$ por 30 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 6 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma $A_a = 0,75$ por 30 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 7 Gráfico da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e à 7 °C em Aa = 0,43; por 60 dias, tratados à 140° e Aa média = 0,264

FIGURA - 8 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma Aa = 0,00; por 60 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 9 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 7 °C a uma $A_a = 0,43$; por 60 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 10 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C à uma Aa = 0,75; por 60 dias, tratados à 140 °C à uma Aa média = 0,264

FIGURA - 11 Gráfico da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e à 7 °C em Aa = 0,43; por 90 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 12 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* /AL 55 condicionados à 30°C a uma $A_a = 0,00$; por 90 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 13 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* /AL 55 condicionados à 7 °C a uma $A_a = 0,43$; por 90 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 14 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma $A_a = 0,75$; por 90 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 15 Gráfico da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30 °C em $Aa = 0,00$ e $Aa = 0,75$ e à 7 °C em $Aa = 0,43$; por 120 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 16 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma Aa = 0,00; por 120 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 17 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 7 °C a uma Aa = 0,43; por 120 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 18 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma Aa = 0,75; por 120 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 19 Gráfico da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30 °C em Aa = 0,00 e Aa = 0,75 e à 7 °C em Aa = 0,43; por 150 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 20 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma $A_a = 0,00$; por 150 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

FIGURA - 21 Regressao linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 7 °C a uma Aa = 0,43; por 150 dias, tratados à 140 °C e Aa média = 0,264

FIGURA - 22 Regressão linear da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 condicionados à 30°C a uma $A_a = 0,75$; por 150 dias, tratados à 140 °C e A_a média = 0,264

5 - DISCUSSÃO

As Tabelas 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mostram que a fórmula proposta por Stumbo (1973) não apresenta precisão na descrição da inativação térmica de esporos bacterianos, quando o agente térmico é o calor seco com atividade de água intermediária. Este fato, que já foi detectado por outros autores (Adams & Busta, 1972; Berg & Sandine, 1970; Bond et al., 1971; Fox & Pflug, 1968; Grisotto, 1992; Hachigian & Schelinger, 1991; Prado Filho, 1987a; Prado Filho, 1987b; Prado Filho et al., 1996 e Tapia, 1997), é causado pela distribuição gaussiana natural da resistência em uma população de esporos. Se o número inicial de esporos é alto, a probabilidade de serem detectados esporos super-resistentes, aumenta com o aumento do tempo de tratamento, uma vez que os menos resistentes são inativados em tempos de tratamentos menores.

As Figuras 3; 7; 11; 15 e 19 mostram que independentemente do tipo de condicionamento a que foram submetidos os esporos, quaisquer modificações fisiológicas e/ou estruturais, eventualmente causada pelo condicionamento prévio são anuladas pelos tempos de tratamento extremamente longos (270 min.).

Os resultados de possíveis modificações fisiológicas, e/ou estruturais causadas pelo condicionamento prévio estão evidenciados no mesmo tempo de tratamento - 90 min. - como mostram as figuras 7; 11; 15 e 19.

A população de esporos estudada apresentou maior número de esporos sensíveis a um tratamento de 90 min. à 140 °C quando o condicionamento é feito a $A_w = 0,75$ o que significa maior umidade nos esporos como um todo, não obrigatoriamente no córtex (Gould, 1978) . Entretanto, a maior sensibilidade ao estresse térmico, eventualmente

resultante de alterações fisiológicas e/ou estruturais, só é notável após um período prolongado de condicionamento (90 dias).

Este fato é mostrado nas Figuras 7; 11; 15 e 19 onde, em tratamentos com tempos inferiores a 270 min., os esporos mais secos ($A_a = 0,00$) mostram uma resistência maior que aqueles mais úmidos - condicionados à $A_a = 0,43$ e $A_a = 0,75$ -.

A ocorrência da ativação dos esporos é particularmente notável em esporos não condicionados e naqueles condicionados à 0,75, em tempos de tratamento entre 180 e 240 min. O fenômeno, só deixa de ser claramente notável quando os esporos são condicionados por 150 dias. Os esporos condicionados a $A_a = 0,0$ e $A_a = 0,43$ apresentam muito menos variações que possam ser associadas a fenômenos de ativação. Os coeficientes de correlação confirmam essa observação (Tabela 7, e Figuras 2; 4; 5; 6; 8; 9; 10; 12; 13; 14; 16; 17; 18; 20; 21 e 22).

Uma fração de resistência intrínseca está presente na população de esporos estudados, e sua resistência ao estresse térmico muito prolongado - 270 min. - independe do condicionamento prévio. Isto pode ser constatado quantitativamente na Tabela 8, que mostra que a máxima ocorrência dos esporos hiper-resistentes é de 3 a 4 por milhão.

Devido ao fato de fenômenos de ativação e inativação simultâneos e/ou sequenciais não se mostrarem constantes em todas as combinações tempo / temperatura / condicionamento, estabelecer um valor D característico válido para uma população de esporos não possui objetividade. Assim os valores D calculados (Tabela 7), servem como indicadores de comportamento característicos em função do condicionamento e, não determinante da resistência térmica da população muito numerosa de esporos de *B. cereus* IAL 55.

Deste modo, tomar os valores D dessas funções hiper-resistentes como parâmetros de tratamento por calor seco empregando vapor superaquecido com atividades de água intermediárias, pode significar um fator de segurança demasiadamente alto. Em condições práticas, poderia significar um tratamento desnecessário para materiais, ocasionando perda de qualidade, desperdício de energia e aumento no tempo de operação de equipamentos, uma vez que calor seco empregando ar quente ($A_a \ll 0,1$) é mais eficiente que vapor superaquecido.

Para se utilizar *B. cereus*, ou qualquer esporo bacteriano, como bioindicador para tratamento térmico, se faz necessário considerar as condições reais dos esporos das populações naturais cujas inativações devam ser monitoradas pelo indicador. Tais condições reais podem ser extremamente variáveis e difíceis de serem avaliadas com precisão, sendo necessário, um estudo para cada situação específica. Portanto, do presente estudo, não deve ser referida uma recomendação definida com respeito ao emprego de esporos de *B. cereus* IAL 55 como bioindicador, em processos com diferentes condições.

Em casos excepcionais podem ocorrer, sob condições naturais, esporos hiper-resistentes que podem sobreviver a tratamentos térmicos tão prolongados como 14,4 h (Puleo et al., 1975), ou mesmo 54 h (Bond & Favero, 1975). Em tais casos, não se cogitou, como no presente estudo, a utilização de um valor D tradicional, mas sim, foi apontada a ocorrência de sobreviventes após os tempos prolongados de tratamento térmico.

Para materiais que possam ser tratados por calor seco com $Aa \ll 0,100$ (gases, infravermelho) recomendações já existentes são perfeitamente satisfatórias (Russel et al., 1992).

Com base nesse conceito de resistência e, não na determinação de um valor D para uma fração mais resistente da população, é que apresentamos os valores da Tabela 8 como parâmetros básicos da resistência térmica de esporos de *B. cereus* IAL 55 ao tratamento com vapor superaquecido em Aa intermediária, e não recomendação técnica no emprego de indicadores biológicos.

6 - CONCLUSÕES

Para todos os condicionamentos estudados, a fórmula tradicional, para o cálculo de resistência térmica proposta por Stumbo (1973) mostrou-se inconsistente, não apresentando resultados constantes.

Devido as diferenças dos valores D encontrados pelos métodos utilizados, e ao fato da ocorrência de fenômenos de ativação e inativação simultâneos ou seqüenciais, torna-se inviável a utilização deste valor D, sendo recomendável para estes casos, apenas apontar o número de sobreviventes após o tratamento térmico.

Ficou evidenciado que os esporos de *Bacillus cereus* condicionados em ambientes com diferentes atividades de água, apresentaram diferentes comportamentos frente ao tratamento com vapor superaquecido a 140 °C, o que corresponde no local do experimento a uma Aa média = 0,264

Os tratamentos extremamente longos (270 min.) anulam modificações fisiológicas ou estruturais transientes causadas pelos condicionamentos, evidenciando uma resistência intrínseca à formação dos esporos das frações hiper-resistentes, apresentada em todos os condicionamentos.

Os valores obtidos representam especificamente as condições propostas no presente estudo, temperatura - condições reais do bioindicador - atividade de água do tratamento, não sendo extrapoláveis para situações em que haja variação em quaisquer um dos componentes do conjunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS , D.M ; BUSTA, F.F. Ultra high temperature activation of low-temperature *Bacillus subtilis* spores germination system. **Applied Microbiology**. v. 24, p. 418-423. 1972.
- ALCOCK, S. Evaluation of heat resistance of *Clostridium sporogenes* following heat shock . **Food Microbiology**, v.1, n. 1, p. 39 - 41, 1984.
- ALDERTON, G. ; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores; heat resistance and its kinetics of intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, p. 562 - 572. 1970
- 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 p. 51 - 55, 1980.
- 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.
- ANGELOTTI , R. ; MARYANSKI , J. H. ; BUTLER , T. F. ; PEELER, J. T. CAMPBELL , J. E. Influence of spores moisture content of the dry heat resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger*. **Applied Microbiology**, v. 15 p. 735 - 745 , 1968.
- BANWART, G. J. **Basic Food Microbiology**. New York: Van Nostrand Reinold , 198. 519 p.
- BAYLISS, C. E. ; WAITES , W. M. Effect of simultaneous high intensityultraviolet irradiation and hydrogen peroxide on bacterial spores. **Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 467 - 470, 1982 .
- BEAMAN , T. C. ; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n. 6 p. 1242 - 1246 , 1980.
- BECKERS, H. J. Incidence of foodborne diseases in the Netherlands: annual summary 1982 and overview from 1972 to 1982. **Journal Food Protection**, v. 51, n. 8, p. 663 - 673, 1988.

- BERG, R. W. ; SANDINE , W. E. Activation of bacterial spores. A review. *Journal Milk. Food Technology*, v. 33 p. 435 - 441 , 1970.
- BOND , W. W. ; FAVERO, M. S. Thermal profile of a *Bacillus* species (ATCC 27380) extremely resistant to dry heat. *Applied Microbiology*, v. 29 p. 859 - 860, 1975.
- BOND , W. W. ; FAVERO, M. S. ; KORBER, M. R. *Bacillus* sp. ATCC 27380 a spore with extreme resistance to dry heat. *Applied Microbiology*, v. 26 n.4 p. 614 - 616 , 1973.
- BOND , W. W. ; FAVERO, M. S. ; PETERSEN, N. J. ; MARSHAL, J. H. Relative frequency distribution of D_{125} values for spores isolates from Mariner - Mars 1969 space craft. *Applied Microbiology* , v. 21, p. 32 - 36 , 1971.
- BONVENTRE, P. E.; JOHNSON, C. E. *Bacillus cereus* toxin. In: MONTIE, T. C.; KADIS, S.; AJL, S. I., ed. *Microbiological Toxins*. New York: Academic Press, 1970, v. 3, p. 415 - 435.
- BRANNEN , J. R. ; GASRT , D. M. Dry heat inactivation of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores as a function of relative humidity. *Applied Microbiology*, v. 23, p. 1125 - 1130, 1972.
- BROWN, K. L. Use of a computer data file for storage of heat resistance data on bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology* , v. 65, p. 49 - 54 , 1988.
- 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. 1841- 6, 1968.
- CHUMNEY, R. K. ; ADAMS , D. M. Relationship between the increases sensitivity of heat injured *Clostridium perfringens* spores to surface active antibiotics and to 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. 395 p.
- COLLIER, C. P.; TOWNSEND, T. The resistance of bacterial spores to superheated steam. *Food Technology*, v. 10, p. 477 - 481, 1955.
- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. **Microbiological methods**. Butterworths: Academic Press. 1970. p. 454.

- CONTIERO , J. Resistência térmica de conidiósporos de *Aspergillus parasiticus* Speare ao calor seco: Desenvolvimento de equipamentos e ensaios. Piracicaba 1984 , 93 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DRUMOND, D . W. ; PFLUG, I. J. Dry heat destruction of *Bacillus subtilis* on surface effect of humidity in an open system. **Applied Microbiology**, v 20 p. 805 - 809, 1970.
- ELEY, A. R. **Intoxicaciones alimentarias de etiologia microbiana**. Zaragoza: Editorial Acribia, 208 p., 1994.
- EMBORG, C. Inactivation of dried bacteria and bacterial spores by means of gamma - irradiation at high temperature. **Applied Microbiology**, v. 27 : 830 - 833 , 1974.
- ETOA , F. X. ; MITCHIELS , L. Heat induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 43 - 45, 1988.
- FEHERRY, F. E. ; MUNSEY , D. T. ; ROWLEY, D. B. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v 53 n.2, p. 365 - 370, 1987.
- FISHER , D. A.; PFLUG, I. J. Effect of combined heat and radiation on microbiology destruction. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 33 p. 1170 - 1176 , 1977.
- FOX , K. ; PFLUG, J. J. Effect of temperature and gas velocity on the dry heat destruction rate of bacterial spores . **Applied Microbiology**, v. 6 n. 2, p. 343-348, 1968.
- FOX , K. ; EDER , B. Comparison of survivor curves of *Bacillus subtilis* spores subjected to wet and dry heat. **Journal of Food Science**, v.34, n. 6, p. 518 - 520, 1969.
- FRANKLIN, J. G.; Spores in milk: Problems associated with UHT processing. **Journal Applied Bacteriology**, London, v. 33, n. 1, p. 180 - 191, 1970.
- GOEPPERT, J. M.; KIM, V. H. *Bacillus cereus* In: SPECK, M. L., ed. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. Washington: American Publishing Health Association, 1976. p. 417 - 423.

- GOULD, G. W. Practical implications of compartmentalization and osmotic control of water distribution in spores. In: CHAMBLIS, G.; VAR., Y, J. C. ed -**Spores VII**. Washington, **Society Microbiology**. p. 21 - 26, 1978.
- GAZE, J. E.; BROWN, G. D. Comparative heat resistance studies on spores of *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. **Campden food & Drink Research Association**; n. 568, 1990, 54p.
- GRISOTTO, R. Construção e testes de câmara para tratamento de esporos de microrganismos. Piracicaba, 1992. p.73. Tese (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HACHIGIAN, J. ; SCHELINGER, R. J. Analysis of quantal response data from bacterial destruction studies in sterilization : the Stumbo estimate is biased. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 5, p. 460 - 466, 1991.
- 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.
- HARNULV, B. G. ; JOHANSSON, M.; SNYGG, B. G. Heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores at different water activities. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 1, p. 91 - 93, 1977.
- HIGUTI, I. H., MACENA, I. R., CORTIANO, L., BRANCO FILHO, M. O., BLASKOWSKI, M. M. M., NASCIMENTO, A. J. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from corn and cassava flour sample in Curitiba. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**. v 28, n 1 p. 46 - 48, 1997.
- 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 p. 1240 - 1241, 1968.
- INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microrganisms in foods**; their significance and methods of enumeration. 2ed Toronto: University of Toronto Press, 1978. p. 434.
- IVES, J. T.; POTTER, N. N. Production and stability of hemolysin, phospholipase C and lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**. v.40, n. 1, p. 17 - 22, 1977.

- JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 286 - 287, 1983.
- KAHOORY, D. H. ; LOMBARD , S. J. ; SPLECKY , R. A. Perturbation of the heat resistance of bacterial spores by sporulation temperature and ethanol **Current Microbiology**, v. 15 p. 7 - 9, 1987.
- KAUR, P. Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. **Journal os Food Safety**, v. 34, n. 8, p. 71 - 81, 1986.
- KIM, H. U.; GOEPPERT, J. M. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in food. I. 24-hour presumptive test medium. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 581 - 587, 1971.
- KING JUNIOR, A. D. ; BAINE, H. G. ; ALDERTON , G. Non logarithmic death rate calculation for *B. fulva* and other microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 37, p. 596 - 600 , 1969.
- LEADER , S. Comparison of the resistance to hydrogen peroxide of wet and dry spores of *Bacillus subtilis* 5 A 22. **Journal of Food Technology**, v. 19, n. 7, p. 695 - 702, 1984.
- 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.
- MALLADIS , C. G. ; 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.
- MALLADIS , C. G. ; SCHOLEFIELD , J. Relation of the heat resistance of spores to chemical composition on structure. I. Relation to core components. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 62, n. 1, p. 65 - 69 , 1987.

- MOLIN , G. Inherent genetic differences in dry heat resistance of some *Bacillus* spores. In : **BARKER, A. N.** , ed. **Spore Research**. Toronto: Academic Press, 1977a. p. 487 - 500.
- MOLIN , G. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in dry system at low and high temperature . **Journal General Microbiology** , v.101, n. 3, p. 227 - 231, 1977 b.
- MOLIN , G. ; ÖSTLUND, K. Dry heat inactivation of *Bacillus subtilis* spores by means of infra - red heating. **Antonie Van Leeuwenhoek** , v. 41, n.3, p. 329 - 335 , 1976.
- MOLIN , G. ; ÖSTLUND , K. Dry heat inactivation of *Bacillus subtilis* var... *niger* spores with special reference to spore density. **Canadian Journal 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.
- MURREL , W. G. ; SCOTT , W. J. The resistance of bacterial spores at various water activities. **Journal of General Microbiology** , v. 43, p. 411 - 425 , 1966.
- 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.
- ODLANG , T. E.; CAPUTO , R. A. ; GRAHAM , G. S. Heat resistance and population stability of lyophilized *Bacillus subtilis* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 1374 - 1377 , 1981.
- OXBORROW , G. S. ; PLACENCIA , A. M. ; DANIELSON , J. W. Effects of temperature and relative humidity on biological indicators used for ethylene oxid sterilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 46 - 49, 1983.
- 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.

- PFLUG , I. J. Thermal resistance of microorganisms to dry heat design of apparatus, operational problems and preliminary results. **Food Technology**, v.14, p. 483 - 487, 1960.
- PHEIL , C. G. ; PFLUG , I. J. ; NICHOLAS , R. C. ; AUGUSTIN , J. A. L. Effect of various gas atmosphere on destruction of microorganisms in dry heat. **Applied Microbiology** , v. 15, p. 120 - 124 , 1967.
- PRADO FILHO , L. G. Estudo dos parâmetros termodinâmicos da inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* por calor seco. **Revista Brasileira de Tecnologia** , v.6, n. 1, p. 77 - 82 , 1975.
- PRADO FILHO, L. G. Die thermische Abtoetung von sporen von *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 gas Gasphasen mit liner Wasseraktivitaet < 1,0. **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie** , v. 7, n. 1, p. 29 - 33, 1974.
- PRADO FILHO , L. G. ; KIEFER , P. Versuchsanlage zur thermischen Behandlung von Bakteriensporen in Gasen mit liner Wasseraktivitaet < 1,0 . **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie** , v. 7, n. 5, p. 255 - 256 , 1974 .
- PRADO FILHO , L. G. Resistência de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 ao tratamento por vapor superaquecido. Montagem de equipamento específico e ensaios. Piracicaba, 1982. 124 p. Tese (Livre Docência), Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”, Universidade de São Paulo.
- 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. 1, p. 145 - 171, 1987 b.
- PRADO FILHO, L.G.; GRISOTTO, R. Projeto e construção de câmara de tratamento térmico de esporos de microrganismos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.14. n.1. p. 96 - 104. Jan / Jun. 1994.

- PRADO FILHO, L.G. ; GRISOTTO, R.; TAPIA TAPIA, D.M. Resistência térmica 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 Jul / Set. 1996.
- PULEO , J. R. ; BERGSTROM , S. L. ; PEELER , J. T. ; OXBORROW ,G. S. Thermal resistance of naturally occurring airborne bacterial spores.**Applied Microbiology**, v. 36, p. 473 - 479 , 1978.
- PULEO , J. R. ; FAVERO , M. S. ; OXBORROW , G. S. ; HERRING , C. M. Method for collecting naturally occurring airborne bacterial spores for determining their thermal resistance. **Applied Microbiology** , v. 30, p. 786 - 790 , 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 canning system . **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie** , v. 10, n. 4, p. 198 - 202 1977.
- RANK , E. ; PFLUG , I. J. Dry heat destruction of spores on metal surface and on potatoes during baking . **Journal of Food Protection** , v. 40, n. 2, p. 608 - 613, 1977.
- 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 and Environmental 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 anturally occurring spores in soil. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 406 - 410 , 1974.
- ROEMER , G. B. Heissluftsterilisation . **Deutsche Medizinische Wochenschrift**. v.100, p. 709 - 710 , 1975.
- RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFE, G.A.T. Heat sterilization. In: **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. London : Blackwell Scientific, 1992. cap. 18, p. 483 - 511.
- SEENAPA, M.; KIMPTON, A. G. A pimple key for identification of *Bacillus cereus* species camon in foods. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 20, n. 3, p. 223 - 227, 1983.

- SPIRA, W. M. ; GOEPPERT, J. M. *Bacillus cereus* induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 341 - 348, 1972.
- 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.
- SRIMANI, B. ; STAHL, R. ; LONCIN, M. Death rate of bacterial spores at high temperatures . **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie**, v. 13, n. 3, p. 186 - 189, 1980.
- STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in food processing**. New York: Academic Press, 1965. 236p
- STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in food processing** . 2 ed. New York: Academic Press 1973. 354p
- TAPIA, D. M. T. Resistência térmica de esporos de *Bacillus cereus* IAL 2599, frente a vapor superaquecido com atividade de água menor que 1,0. Piracicaba, 1997. 68p. Tese (Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- TODA, K. Studies on heat sterilization . V III - Complex reaction model for heat inactivation of bacterial spores. **Journal of Fermentation Technology** v. 48, n. 8, p. 811 - 818, 1970.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atica, 1989. 386 p.
- TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. London: Academic Press, 1993. 478 p.
- VON SCHELHORN, M. L.; HEISS, R. Influence of relative humidity on the thermal resistance of mould spores. In : **DUCKWORTH, R. B.**, ed. *Water Relation of Food*, New York: Academic Press, 1975. 175p
- WYATT, C. J.; GUY, V. H. Incidence and growth of *Bacillus cereus* in retail pumpkin pie. **Journal of Food Protection**. v. 44, n. 6, p. 422 - 429, 1981.

APÊNDICE 1 – Esquema geral do equipamento de tratamento térmico de esporos (Prado Filho, 1987 a)

APÊNDICE 2 – Esquema da câmara de tratamento térmico (Grisotto, 1992)

APÊNDICE 3 – Suporte das lâminas de alumínio, portadoras de esporos

APÊNDICE 4 – Potes plásticos utilizados para o condicionamento