CONSTRUÇÃO E TESTES DE CÂMARA
PARA TRATAMENTO TÉRMICO DE
ESPOROS DE MICRORGANISMOS

ROSÂNGELA GRISOTTO

Engenheiro de Alimentos

Orientador: Prof.Dr. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, área de
concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

MAIO DE 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

G869c Grisotto. Rosângela
Construção e testes de câmara para tratamento térmico
de esporos de microrganismos. Piracicaba. 1992.
73p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Câmara para tratamento térmico 2. Microrganismo -
Esporo - Tratamento térmico 3. Microrganismo - Tratamento
térmico - Equipamento I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz. Piracicaba

CDD 576.028

**CONSTRUÇÃO E TESTES DE CÂMARA
PARA TRATAMENTO TÉRMICO DE
ESPOROS DE MICRORGANISMOS**

ROSÂNGELA GRI SOTTO

Aprovada em: 15/06/1992

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho ESALQ/USP

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira ESALQ/USP

Prof. Dr. *Luiz Gonzaga do Prado Filho* *62*
Orientador

SUMÁRIO

Página

RESUMO	V
SUMMARY	Vi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Materiais	24
3.1.1. Equipamento para Tratamento Térmico de Esporos	24
3.1.1.1. Câmara de Tratamento de Esporos	24
3.1.2. Microrganismo Estudado	31
3.1.3. Meios de Culturas Empregados	31
3.2. Métodos	31
3.2.1. Determinação da Estabilidade da Temperatura na Câmara de Tratamento	31
3.2.2. Produção de Esporos	32
3.2.3. Preparação das Amostras para Tratamento	33
3.2.4. Condições de Tratamento	34
3.2.5. Tratamento e Manuseio das Amostras	34
3.2.6. Cálculo do Valor D	35
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	55
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

CONSTRUÇÃO E TESTES DE CÂMARA PARA TRATAMENTO
TÉRMICO DE ESPOROS DE **MICROORGANISMOS**

AUTORA : *Rosângela Grisotto*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado *Filho*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo apresentar planos de construção de uma nova câmara de tratamento térmico de esporos de microrganismos, mais funcional e mais econômica que a utilizada em equipamento piloto anteriormente proposto (PRADO FILHO, 1987), bem como os resultados dos testes de funcionamento do modelo proposto, e do tratamento térmico de esporos de *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372 com vapor super aquecido à temperaturas de 125°C; 137°C; 142°C e 150°C que correspondem a atividades de água medidas de 0,40; 0,30; 0,25 e 0,20 respectivamente, nas condições ambientais dos experimentos.

O equipamento constituiu-se basicamente de um gerador de vapor, de uma seção tubular de aquecimento e da nova câmara de tratamento de esporos.

Os testes de funcionamento realizados demonstraram que a nova câmara garantiu muito boa estabilidade de temperatura dos experimentos.

Com exceção de 137°C ($A_a = 0,30$), nas demais temperaturas o tratamento dos esporos evidenciou a ocorrência de fenômenos de ativação e inativação simultâneos ou sequenciais e, a presença de esporos muito mais resistentes que a média da

população tratada.

A 128°C e $Aa = 0,40$ o valor D da fração mais resistente da população de esporos tratada foi 195,31 minutos.

CONSTRUCTION AND TESTS OF A MICRORGANISM SPORE THERMAL TREATMENT CHAMBER

AUTHOR : Rosângela Grisotto

ADVISER : Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho

SUMMARY

The present work had the objective of presenting: a) construction plans of a new chamber for microorganism spore thermal treatment, being more functional and more economical than the one employed in a pilot equipment previously proposed (PRADO FILHO, 1987); and b) the proposed model working results and *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 spore thermal treatment data with superheated steam at temperatures 128°C, 137°C, 142°C and 150°C that correspond to measured water activities of 0,40; 0,30; 0,25 and 0,20, respectively, under experimental environmental conditions.

Basically, the equipment consisted in a steam generator, a heating tubular section and the new spore treatment chamber.

The working tests showed that the new chamber guaranteed a very good temperature stability in the experiments. Except for 137°C ($A_w = 0,30$), the spore treatment showed occurrence of simultaneous or sequential activation and inactivation phenomena and the presence of spores that were more resistant than the treated population's average.

At 128°C and $A_w = 0,40$, the most resistant treated spore population fraction presented D value of 195,31 min.

1 - INTRODUÇÃO

Em quaisquer sistemas a disponibilidade de água é o fator condicionante da atividade biológica. No caso particular dos alimentos, a água sendo um componente importante, é um fator condicionador da evolução de diversos processos, biológicos e químicos, que levam à deterioração dos mesmos. Contudo, a água presente nos alimentos precisa estar "disponível" para propiciar condições favoráveis para o desenvolvimento dos citados processos. A disponibilidade da água em um sistema é expressa em termos de atividade de água (A_a) ou umidade relativa (UR).

A atividade de água é expressa como a relação entre a pressão de vapor de água de um sistema e a pressão de vapor da água livre à mesma temperatura. Os conceitos de atividade de água e de umidade relativa se equivalem, sendo este expresso em porcentagem e aquele em frações de unidade.

A resistência térmica de esporos aumenta com a diminuição da atividade de água do sistema no qual sofrem o "stress" térmico. Na maioria dos casos a resistência máxima situa-se no intervalo $A_a = 0,2$ a $A_a = 0,4$.

Na conservação de alimentos, o estudo da resistência térmica de microrganismos e seus esporos é de grande importância, como o é, também, o conhecimento do comportamento dos mesmos em matérias primas e em alimentos desidratados, e como esses microrganismos e esporos poderiam

ser destruídos ou inativados sem o emprego dos métodos úmidos de descontaminação. Em pesquisa sobre a resistência térmica de microrganismos em ambiente de $A_a < 1,0$ diversos métodos podem ser utilizados para controlar a atividade de água ambiental, sendo o mais comum, o uso de soluções com atividade de água definida na temperatura em que deseja fazer o tratamento térmico.

O presente trabalho tem por objetivos, apresentar os planos de construção de uma nova câmara de tratamento térmico de esporos de microrganismos, mais funcional e mais econômica que a utilizada em equipamento experimental anteriormente proposto (PRADO FILHO, 1987), bem como os resultados dos testes de funcionamento do modelo proposto e do tratamento térmico de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 com vapor superaquecido a temperaturas que corresponderam a atividades de água médias de 0,20; 0,25; 0,30 e 0,40 nas condições ambientais dos experimentos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os estudos da resistência térmica de esporos em ambiente de atividade de água menor que 1,0 ou umidade relativa menor que 100% iniciou-se com COLLIER & TOWNSEND, (1956) que estudaram a resistência de esporos de PA 3675, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus polymyxa* em um sistema de enlatamento asséptico fabricado pela firma James Dole Engineering Company. No trabalho evidenciou-se a variação de resistência de ambas as espécies em função do meio de tratamento e da atividade de água reinante.

A resistência de microrganismos à ação de calor seco, ou seja, tratamento térmico em condições de $a_w < 1,0$, constituiu até há cerca de quatro décadas um campo de interesse muito limitado dentro do contexto da esterilização de alimentos. O problema estava afeto às áreas especiais da indústria farmacêutica.

Mesmo nestas indústrias, que usam mais amplamente o calor seco, não há ainda uma norma definida de aplicação geral. Este fato está bem caracterizado no artigo publicado por ROEMER (1975). Embora a aplicação de calor seco seja mais restrita que a do calor úmido, que é melhor bactericida, há necessidade de estudos adicionais pois, existem produtos e equipamentos em cuja esterilização não pode ser usado calor úmido.

PFLUG (1960), construiu um termoresistômetro com a finalidade de estudar o comportamento de esporos de *Bacillus subtilis* 5230 em vapor saturado, ar e vapor superaquecido. No trabalho não foram indicadas as velocidades dos gases na câmara de tratamento, nem temperaturas que permitam uma avaliação da atividade de água reinante durante os vários experientos. O valor D exato não pode ser calculado, sendo a resistência expressa em LD 250 a 350°F (176,6°C).

MURRELL & SCOTT (1966), trabalhando com esporos de seis espécies de *Bacillus* estabeleceram que a resistência térmica dos esporos testados era máxima no intervalo de atividade de água de 0,2 a 0,4, sendo que para os esporos de *Bacillus megaterium* a resistência máxima no intervalo citado era 10.000 vezes maior que a resistência para $a_w = 1,0$. Neste experimento foram utilizados esporos liofilizados condicionados na presença de soluções controladoras de atividade de água.

PFEIL et alii (1967), para estudar o efeito dos gases (ar, He, N₂, O₂ e CO₂) sobre a inativação térmica por calor seco em esporos de *Bacillus subtilis* 5230 e *Clostridium sporogenes* PA 3679-45, inocularam os esporos em cadinhos de estanho (11 x 8 mm) e após secagem a vácuo a 25°C por 25 h, de unidades eram fixadas em latas especiais (Latas TDT 64 x 8 mm) em atmosfera dos gases em estudo. 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 a temperaturas abaixo de 143,3°C, em todos os gases; entre 143,3°C e 148,9°C as resistências se equivalem passando C.

sporogenes PA 3679-45 a mais resistente acima de $148,9^{\circ}\text{C}$, em função de seu valor Z maior. Os valores D são maiores em He e N_2 para ambos os microrganismos, não influenciando o peso molecular na distribuição energética, nem mostrando o oxigênio, especial efeito inativador como anteriormente era suspeitado.

ANGELOTTI et alii (1968), trabalharam com descontaminação de veículos espaciais. Trataram esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* em tubos TDT imersos em banho de silicone com temperatura de 105 a 160°C . Em esporos equilibrados a diversas atividades de água, a maior resistência térmica detectada a 135°C foi a dos esporos equilibrados entre $A_a = 0,2$ e $A_a = 0,4$.

BRUCH & SMITH (1968), inocularam sobre pedaços de filme de Kapton e Teflon esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger*, e verificaram que ocorriam diferenças nos valores Z e D. Os autores calcularam Z igual $29,1^{\circ}\text{C}$ para Kapton e Z igual 139°C para esporos sobre Teflon. Essa diferença estaria relacionada com a atividade de água reinante no ambiente em que os esporos se encontravam. O filme de Kapton é permeável ao vapor de água formado durante o processo, enquanto que o Teflon, por ser impermeável, permitia o aquecimento dos esporos em um ambiente de atividade de água intermediária, dando assim alta resistência.

HOFFMANN et alii (1968), condicionaram esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* em ambiente com 11, 33 e 85% de UR a 25°C por 48 horas antes dos testes de resistência térmica. O equipamento utilizado foi placa de aquecimento,

com os esporos pipetados em lâminas de aço de 13 x 13 x 0,3 mm. A disposição do equipamento utilizado caracterizou um sistema aberto, o que nas temperaturas de tratamento (125, 135 e 164°C) correspondia a uma $A_a = 0,03$. Nas condições experimentais não houve influência da atividade de água sobre a resistência durante o tratamento, contudo, a atividade de água do condicionamento teve influência marcante, apresentando os mais úmidos, maior resistência térmica. KING et alii (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 o experimento em suco reconstituído e 6,7°C para o experimento em suco concentrado. Para as diferentes cepas obtidas de coleção de culturas, os valores de D encontrados a 87,8°C variaram de 4,8 min a 8,5 min, enquanto que para a cepa original do suco, o valor de D encontrado foi de 11,3 minutos.

ALDERTON & SNELL (1970), trabalharam com determinação de resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* NCA 1518 em atividade de água menor que 1,0. Para esse trabalho utilizaram tubos apropriados e aquecimento em banho de óleo. As atividades de água nas temperaturas pesquisadas eram obtidas por deposição de água nas paredes dos tubos, em quantidades tais que, após evacuação e selamento dos mesmos, as atividades de água desejadas eram obtidas.

BOND et alii (1971), estudaram a resistência térmica de

esporos de *Bacillus* sp ATCC 27380, coletados de solo do Cabo Kennedy, e verificaram serem esses esporos extremamente resistente ao calor seco, sendo o valor $D_{125}=139$ h. O solo contendo esporos era suspenso em solução de álcool etílico a 95% e em seguida, porções de 0,1 ml de suspensão eram aplicadas em tiras de aço (0,5" x 0,5") para posterior tratamento.

BRANNEN & GARST (1972), usaram esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* para estudar a possibilidade de equacionar um modelo cinético incorporado a umidade relativa como um dos parâmetros. Tal modelo poderia ser útil na estimativa da esterilização de espaçonaves em ciclos de 115 e 125°C, partindo de dados obtidos a 105°C com ar circulante totalmente renovado a cada 1,0 min, com atividade de água variando entre 0,000033 e 0,00167. A precisão da atividade de água foi obtida pela saturação do ar, com posterior condensação ao ponto de orvalho a temperaturas tais que, após o aquecimento a 105°C, os valores desejados eram obtidos.

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

EMBORG (1974), estudou a ação conjunta de radiação e calor seco na inativação de microrganismos. Esporos de *Bacillus subtilis*, *B. globigii* ATCC 9372 e *B. sphaericus* eram inoculados em folha de polietileno, equilibrados por cerca de 12 horas em U.R.=30%, então tratados

simultaneamente por radiação (25 a 70 krad/h) e calor seco a 100°C. No sistema de tratamento, não havia movimentação de gás, nem controle de atividade de água. Nas condições testadas *B. sphaericus* mostrou-se mais resistente.

MICHENER & KING (1974), estudaram a resistência térmica de ascoporos de *Byssochlamys fulva* NRRL 3495 em suco de uva a temperaturas abaixo de 100°C e encontraram um valor para D de 14 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 atividade de água podia ser parcialmente controlada em temperaturas entre 100°C e 200°C.

REYNOLDS et alii (1974), isolaram esporos do solo de dependências para montagem de veículos espaciais, no Centro Espacial do Cabo Kennedy. O equipamento usado foi estufa com volume de 0,016 m³ com recirculação de ar a 25°C e UR = 30%. As temperaturas empregadas foram 105 , 110 , 115 , 120 e 125°C com e sem tratamento dos esporos por radiação, tratamento este feito com vistas à detecção de ação sinérgica. A 125°C foi detectada uma fração da população com D = 29 horas, sendo esse valor maior que aquele considerado para *B. subtilis* var. *niger*, tomado como padrão de resistência ao calor seco. Em todas as temperaturas detectaram uma fração mais resistente, a qual representava cerca de 1% do total.

SHOLEFIELD & ABDELGADIR (1974), separaram esporos lisos e rugosos de *B. stearothermophilus* NCIB 8923 através de

centrífugação. As frações separadas exibiram grande resistência térmica e uma marcante ativação térmica na presença de altos níveis de cálcio, ferro e ácido dipicolínico. Usando as diferenças constatadas entre as curvas de sobreviventes das duas frações e a natureza não linear das mesmas, os autores concluíram pela existência de frações hiperresistentes de esporos nas duas frações separadas

No ano seguinte, BOND & FAVERO (1975), estudando a resistência térmica de *Bacillus*, isolados do solo do Centro Espacial do Cabo Kennedy, verificaram que esporos aquecidos a temperaturas superiores a 125°C apresentavam "ombro" característico de ativação e destruição térmica simultâneos. A resistência térmica a 130°C ($A_a < 0,01$) foi caracterizada por um valor D extremamente alto ($D = 54h$). Nas condições experimentadas a resistência foi uma função apenas da temperatura, tendo sido possível o cálculo de um $Z = 15^\circ C$.

Para testar equipamento experimental para estudo do emprego de radiação infravermelha na esterilização por calor seco, MOLIN & OSTLUND (1975), empregaram *Bacillus subtilis* ATCC 6333, inoculados em lamínulas, as quais eram equilibradas de 3 a 10 dias a 21°C e 79% de umidade relativa. A atividade de água no sistema variou de 0,001 a 0,05. Nos valores baixos de atividade de água reinante, a resistência era função apenas da temperatura.

PRADO FILHO (1975a), publicou estudo sobre os parâmetros termodinâmicos envolvidos na inativação térmica de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 por calor seco em

corrente de ar e CO_2 . O autor verificou que a energia livre da ativação (AF^*) para destruição térmica de esporos de bactérias em atmosferas gasosas de baixa atividade de água, é praticamente independente da temperatura, da umidade dos esporos e da composição da atmosfera de tratamento. Os valores baixos de entropia de ativação (AS^*) indicavam que a inativação se dava pelo rompimento de poucas ligações importantes para a atividade biológica, mas sem influência marcante na conformação das moléculas envolvidas.

PRADO FILHO (1975b), publicou resultados de pesquisas sobre a inativação térmica de esporos de *Bacillus subtilis* var. niger ATCC 9372 em corrente de ar e de CO_2 . O equipamento empregado trabalhava em sistema aberto, com aquecimento e resfriamento instantâneo da amostra. Os esporos inoculados em lâminas 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 , 130 , 140 e 150°C) a atividade de água do ambiente de tratamento foi sempre menor que 0,016.

PULEO et alii (1975), também trabalharam com esterilização de naves espaciais, coletaram esporos e testaram a resistência térmica dos mesmos a 113 e 125°C, em estufa de ar forçado, sem controle de atividade de água ambiental. Constataram a existência de uma fração da população com $D_{113} = 14 \text{ h}$ e $D_{125} = 6,3 \text{ h}$.

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 do ambiente em que os esporos se encontravam. O método utilizado para determinar o valor D constituia 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 daria a atividade de água reinante no meio 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 $120^{\circ}C$.

ALDERTON et alii (1976), estudaram a resistência térmica de esporos de *Clostridium botulinum* 62A e 213B em vários meios de aquecimento, incluindo alguns alimentos com baixa acidez. Verificaram que a resistência térmica dos esporos pode ser aumentada ou diminuída mudando-se os meios de germinação dos esporos, isto é, da forma resistente calcificada (germinação na presença de $Ca(Ac)_2$ para a forma sensível hidrogenada (germinação na presença de HCl). Quando esta resistência é medida em ervilhas e aspargos, ambos os tipos de esporos vindos da cultura pura apresentaram uma pequena fração potencialmente mais resistente. As formas de esporos resistentes de ambos os tipos (62A e 213B), quando presentes em alimentos de baixa acidez podem ser sensibilizados ao aquecimento em pH normal dos alimentos.

FISHER & PFLUG (1977), pesquisaram o efeito sinérgico de tratamento térmico úmido e seco, conjugados com radiação;

para isso trabalharam com esporos de *Bacillus subtilis* var *niger*. As taxas de doses de radiação foram de 5,10 e 20 krad/h, e as temperaturas em experimentos prévios variavam entre 76 e 125°C em atividade de água variando de 0,25 a 0,82 nos tratamentos por calor seco. Os esporos eram inoculados e equilibrados a $A_w = 0,5$ durante 24 horas. Esporos irradiados a 110°C apresentavam 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 , 105 , 110 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 = 2,5) do que o binômio calor úmido-radiação (SI = 1,5).

HARNULV et alii (1977), realizaram um trabalho sobre resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em vapor de água, solução aquosa de NaCl, LiCl, glucose, glicerol, ovo integral em pó, concentrado protéico de peixe e farinha de trigo em várias atividades de água. Em vapor de água e solução de glicerol, a resistência foi máxima a uma baixa atividade de água, porém, não chegando 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 solução de LiCl, a resistência térmica foi mínima em atividade de água ao redor de 0,5. Quando aquecido o ovo em pó, concentrado protéico de peixe e farinha de trigo, os esporos apresentaram máxima resistência em valores de atividade de água variando entre 0,2 e 0,4.

MOLIN (1977), trabalhou com *Bacillus cereus* NCTB 9372,

B.coagulans NCTB 9365, *B. megaterium* NCTB 9376, *B. polymyxa* NCTB 8158, *B. pumilis* NCTB 10337, *B. stearothermophilus* ATCC 7953, *B. stearothermophilus* NCTB 10339, *B. subtilis* NCTB 8054 e *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372, para fazer um estudo comparativo da resistência térmica de esporos do gênero *Bacillus* ao calor seco, empregando equipamento de radiação infra-vermelho (MOLIN & OSTLUND, 1975). Os esporos foram condicionados a 20-24°C e atividade de água 0,33 por um período de 3 a 10 dias, e tratados em temperaturas variando de 90 a 180°C. Neste intervalo de temperatura, esporos de *B.subtilis* var. *niger* ATCC 9372, tiveram um valor D maior que para os outros microrganismos.

PEELER et alii (1977), utilizaram esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* para estudar a resistência ao calor seco em sistema fechado, com vista à descontaminação de espaçonaves. Os esporos foram inoculados em cadinhos de aço inoxidável, os quais foram fechados em latas de 57,2 x 73 mm (120 cadinhos por lata) que recebiam P₂O₅ ou água em quantidade necessária para obter-se várias atividades de água no ambiente, as temperaturas desejadas. Em experimentos preliminares a 113 e 125°C a Aa variou de 0,0 a 1,0 e nos experimentos definitivos a 85 , 90 , 95 , 100 , 105 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.

QUAST et alii (1977), para estudar a resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* 1518 ao vapor superaquecido, utilizaram um equipamento asséptico marca

DOLE. Este estudo foi feito às temperaturas de 152 , 155,6 e 159°C e a atividade de água teria variado entre 0,15 e 0,20. Com base nos valores de D obtidos nas temperaturas estudadas, os autores calcularam um valor $Z = 17^{\circ}\text{C}$ e por extrapolação concluíram que 6,3 min a 170°C é suficiente para causar uma redução, de 10 potências de 10 na população de *B.stearothermophilus*, sendo a recomendação, portanto, segura com respeito ao *Clostridium botulinum*, considerado 10 vezes menos resistente que o microrganismo estudado.

RANK & PFLUG (1977), estudaram a resistência térmica de esporos de *Bacillus 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 eram mais resistentes ao calor seco, quando inoculados sobre a superfície de batata, do que sobre superfície de metal. Após o inóculo sobre a superfície de batata e do metal, ambos eram equilibrados a 22°C e 50% de umidade relativa por 18 e 24 horas, para depois sofrerem o tratamento térmico. O valor D150 encontrado para superfície de metal era de 0,92 min, enquanto que para superfície de batata era de 5,6 min. Os autores atribuíram esta diferença a problemas ligados à difusão de umidade das superfícies suporte para a atmosfera do forno.

No ano seguinte, PULEO et alii (1978), estudaram a resistência térmica de espécies do gênero *Bacillus*, isolados em áreas de montagem de espaçonaves, com vistas a diminuição da duração dos ciclos de descontaminação. O equipamento usado foi estufa com nitrogênio fluindo a 3 l/min, com umidade

1,2mg H₂O/l e as temperaturas foram 105 , 111,7 , 130 e 135°C. As espécies isoladas estudadas foram *B. brevis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. feimus*, *B. pumilus*, *B. macerans* e *B. polymyxa*. Os autores concluíram que a maioria das espécies do gênero *Bacillus* isoladas de espaçonaves, tem resistência menor ou no máximo igual a *B. subtilis* var. *niger*.

ALDERTON et alii (1980), estudaram a resistência térmica de esporos de *Clostridium botulinum* G 2A. Os esporos usados eram liofilizados e foram submetidos a temperaturas de 125 a 160°C em ambiente com atividades de água variando entre 0,0 e 0,9. Os autores encontraram em $A_a = 0,1$ um valor D maior que em $A_a = 0,0$ e estabeleceram que, com a diminuição da umidade ambiental, a resistência do microrganismo cresce, apresentando a 130 °C e $A_a = 0,4$ 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 dismineralização dos esporos nativos para esporos protonados e remineralização dos esporos protonados para esporos calcificados e pela adaptação térmica nas temperaturas de esporulação mínima, ótima e máxima. Em estudo feito por CHUMNEY & ADAMS (1980) esporos de *Clostridium perfringens* NCTC 8798 tornaram-se sensíveis à inibição pelo cloreto de sódio, nitrato e a mistura de polimixina e neomicina quando aquecidos a temperaturas de 70 a 100°C. O autor explica este aumento na sensibilidade causada por estes agentes da

seguinte maneira: o coeficiente de temperatura da indução dos danos celulares conduziram ao aumento da sensibilidade. Verificou 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, que cada um empregado individualmente.

SRIMANI & LONCIN (1980), desenvolveram um equipamento para determinação de valor D de microrganismos à elevadas temperaturas. Para comparar os resultados extrapolados com valores de D determinados convencionalmente, foram feitos experimentos com esporos de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* a 100°C pelo método de STUMBO (1965).

A esterilização à alta temperatura por tempo muito curto é largamente conhecida e usada atualmente. A estimativa correta do tempo de esterilização depende do conhecimento do comportamento dos microrganismos perante o binômio tempo-temperatura. Este moderno processo de esterilização foi primeiramente utilizado em leite, com temperatura entre 130 e 150°C por poucos segundos. SRIMANI et alii (1980), trabalhando com esse tipo de esterilização, determinaram os valores D de esporos de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* em temperaturas de 115 a 148°C. Os autores verificaram que os valores de D permanecem aproximadamente constante em temperaturas acima de 135°C. O valor Z foi 6,4 oC para *B. stearothermophilus* e 3,7°C para *B. subtilis*.

ODLANG et alii (1981), trabalharam com esporos de *Bacillus subtilis* 5230 liofilizados em tampão fosfato, estocados nas temperaturas de 2 a 8°C por 9 a 27 meses. Para

determinar a resistência térmica em um termoresistômetro. Estes esporos foram reconstituídos em solução tampão ou solução salina. Os esporos liofilizados mantiveram a resistência térmica e o nível da população, durante todos os períodos de testes. Os valores de D limitaram-se de 0,44 a 0,54 min. a 121,1°C, e os valores de Z de 6,1 a 6,6°C.

REYES et alii (1981), usaram equipamento e manuseio de amostras propostos por PEELER et alii (1977) para pesquisar a resistência térmica de *Bacillus* sp CK 4-6, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* NCA 1518, *B. megaterium* HTCC 64583, *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372. A atividade de água no ambiente durante o tratamento variou de 0,001 a 1,00 e a temperatura variou de 100 a 125°C. Para o *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 verificou-se um $F = 19,4h$ a $Aa = 0,07$ e para *Bacillus* sp CK 4-6 um $F = 99,5h$ a Aa 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.

BAYLISS & WAITES (1982), estudaram a relação do uso simultâneo de tratamentos com radiações ultravioleta e peróxido de hidrogênio como método de esterilização, e concluíram que alta intensidade de radiações ultravioleta ($1,8 \times 10 \text{ mW/cm}$) em esporos de *Bacillus subtilis* na presença de 2,5% (peso/volume) de peróxido de hidrogênio resultou em um tempo de morte muito rápido dos esporos.

PRADO FILHO (1982), estudou a resistência térmica dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 em

temperaturas variando de 100 a 160 °C. O método utilizado consistia de inóculo em lâminas de alumínio (10 x 15 x 0,02 mm) fixados em suportes. As amostras eram equilibradas antes do tratamento a temperatura 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 verificou que a maior resistência térmica ocorria quando a temperatura era de 130°C e $A_w = 0,355$, encontrando um $D = 123,7$ minutos para esporos inoculados diretamente de suspensão aquosa e $D = 149,8$ min para esporos condicionados por 8 semanas a 30°C e $A_w = 0,75$. Também concluiu que a resistência térmica não é a mesma para toda a população verificando sempre existir uma fração mais resistente.

OXBORROW et alii (1982), pesquisaram o efeito temperatura e umidade relativa na esterilização por óxido de etileno. O microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis* var. niger, e o inóculo era feito em tiras de papel e colocado em estufa, com admissão do gás esterilizante. Os autores variaram a umidade relativa de 10 a 70%, com incremento de 10%, e a temperatura de 30 a 70°C com incrementos de 10°C. Verificaram que para temperatura acima de 50°C e umidade relativa variando entre 30 e 70%, havia pouca influência desta sobre o valor de D . Em experimentos com umidade relativa baixa (10 a 30%), encontraram um valor de D alto, 15,0 min a 30°C e 60% UR em contraposição a um $D = 1,1$ min a 70°C e 60% UR.

ALCOCK (1984), estudando a elevação da resistência térmica de várias cepas de *Clostridium sporogenes* após choque

térmico, verificou que, usando tampão de ácido dimetil glutárico/NaOH o choque térmico tem um 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 excessão do NCIB 10.696.

CONTIERO (1984), estudou a resistência térmica de conidiosporos de *Aspergillus parasiticus* 403, produtor de aflatoxina B1 e G1, em ar superaquecido. Para o estudo utilizou conidiosporos estocados em suspensão aquosa a cerca de 5°C. Antes de serem submetidos aos tratamentos térmicos os conidiosporos eram secos a vácuo, sendo pré-condicionados por 48 horas em ambiente de $Aa = 0,75$. As temperaturas de tratamento foram de 50 a 120°C, e os valores de D foram 24 min a 100°C e $Aa = 0,032$; 22,5 min a 105°C e $Aa = 0,027$; 11,5 min a 110°C e $Aa = 0,024$ e 9 min a 115°C e $Aa = 0,019$.

LEADER (1984), estudou a ação esporicida do peróxido de hidrogênio em concentrações variando de 11,8 a 41,3% nas temperaturas de 20 a 65°C, usando esporos secos e úmidos de *Bacillus 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.

MALLIDIS & SCHOLEFIELD (1985), desenvolveram uma técnica simples e precisa para determinação da resistência térmica de esporos microbianos. A técnica consiste na combinação de um tubo capilar modificado com um bloco sólido aquecido. Os resultados experimentais apresentados para destruição dos esporos de *Bacillus stearothermophilus* a 120°C mostraram

precisão e reprodutibilidade nos resultados do novo método.

FEHERRY et alii (1987), trabalharam com uma suspensão aquosa de esporos de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 aquecidos em diferentes temperaturas por vários intervalos de tempo em um resistômetro, sobre meio de cultura com antibiótico suplementado com 0,1% de amido solúvel (AAMS) sem NaCl, e (AAMS-S) com 0,9% de NaCl, e incubado a 55°C. Os esporos não injuriados formaram colônias sobre AAMS e AAMS-S, enquanto os esporos injuriados formaram colônias somente sobre AAMS. Os valores D dos esporos recuperados sobre AAMS foram 62,04; 18,00; 8,00; 3,33 e 10,5 min a 112,8; 115,6; 118,3; 121,1 e 123,9°C respectivamente. Os valores de D dos esporos recuperados em AAMS-S foram menores. O valor de Z computado de esporos recuperados em AAMS foi de 8,3°C, e de esporos recuperados em AAMS-S foi de 7,6°C.

KHOURY et alii (1987), trabalharam com esporos de *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* colhidos de culturas esporuladas em diferentes temperaturas e na presença de etanol, esses esporos apresentaram diferentes resistências térmicas. Há uma correlação direta entre a temperatura de esporulação e a temperatura de morte dos esporos. Os esporos são mais sensíveis à temperatura quando formados em meio suplementado com etanol.

MALLIDIS & SCHOLEFIELD (1987), estudaram a relação entre as características de resistência térmica e a composição dos esporos bacterianos em cinco cepas de *Bacillus stearothermophilus*. Foi encontrado uma relação existente 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.

BROWN (1988), apresentou a estrutura de um banco de dados sobre resistência térmica de esporos bacterianos, esporulação, aquecimento, recuperação de esporos e tempo de redução decimal a diferentes temperaturas. Os dados obtidos por este meio, permitem uma rápida manipulação de uma grande quantidade de análises de informações relativas a resistência térmica dos esporos bacterianos.

LYNCH & POTTER (1988), compararam os efeitos dos ácidos málico, acético, cítrico, láctico e clorídrico sobre a inativação térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus 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 a pH 4,6 uma grande taxa de inativação foi observada usando ácidos láctico, cítrico ou acético, não ocorrendo o mesmo quando usado málico ou clorídrico. Para *B. coagulans* a 105°C ou 110°C e pH 4,5, não houve diferenças na inativação de esporos entre os cinco ácidos, mas a essas mesmas temperaturas e pH 4,2, houve uma rápida taxa de inativação destes organismos. A inoculação em emulsão de carne no estado ácido e a conservação a 4°C por 70 horas diminuiu a resistência dos esporos de *B. coagulans* em pH 4,5.

ETOA & MICHIELS (1988), estudaram esporos de *Bacillus 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.

MORTON et alii (1990), determinaram a resistência térmica de esporos toxigênicos e não toxigênicos de *Clostridium 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.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Equipamento para Tratamento Térmico de Esporos

O equipamento utilizado é constituído de um gerador de vapor de água à pressão ambiente, de uma secção tubular de ajustagem de temperatura do vapor gerado e, portanto, da atividade de água do mesmo, e de uma câmara de tratamento de esporos. O gerador de vapor e a secção de ajustagem são idênticos aos usados por PRADO FILHO (1987a) para o estudo da resistência térmica de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 frente a vapor superaquecido. A Figura 1 mostra um esquema geral do equipamento e seus componentes a seguir. A Foto 1 mostra o aparelho montado já com o novo modelo de câmara.

3.1.1.1 - Câmara de Tratamento de Esporos

A câmara de tratamento tem como estrutura básica, um tubo de cobre com 300mm de comprimento e diâmetro de 20mm. O novo modelo proposto possui um sistema de duas gavetas para introdução de amostras na corrente de vapor tornando possível

Figura 1-Esquema geral do equipamento montado

tratar duplicatas simultâneamente. É dotada de orifícios para introdução de sensor de temperatura à frente, entre, e atrás das amostras, de modo a ser possível supervisionar uma eventual diferença de temperatura devido ao posicionamento das mesmas em relação à entrada de vapor na câmara. Em substituição ao sistema original de medição de temperatura, foi usado um termômetro digital marca IOP modelo Therm 40, previamente aferido por termômetro padrão ASTM, com correção da coluna emergente de mercúrio.

Nos experimentos para determinação da estabilidade da temperatura no interior da câmara, o sensor foi posicionado nas posições 1 , 2 e 3 , como descrito em 3.2.1.

Durante os experimentos de tratamento de esporos, as temperaturas na câmara foram medidas posicionando-se o sensor do termômetro digital após a última amostra -posição 1- penetrando $\frac{2}{3}$ do diâmetro da câmara sem tocar a parede inferior do tubo. Isto corresponde a 13 mm a partir da parede superior da câmara. As temperaturas desejadas na câmara de tratamento, durante os experimentos, foram conseguidas apenas com a ajustagem da temperatura do vapor na secção de regulagem. Para controlar a potência das resistências na secção de regulagem, e consequentemente ajustar a temperatura do vapor, foram usados reostatos e não sistema de relés automáticos. A fixação da câmara à saída da secção de regulagem de temperatura do vapor é feita por braçadeira e a câmara toda é protegida por isolamento de lã de vidro. As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram os detalhes dos planos de construção do modelo proposto de câmara de tratamento.

Figura 2 – Câmara de tratamento.

Figura 3 – Câmara de tratamento

Figura 4 - Corpo da camara e gaveta

Figura 5- Medidas das peças da câmara

3.1.2 - Microrganismo Estudado

O microrganismo estudado, que serviu para testar o equipamento montado, foi o *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372. Esta cepa de bacilo esporulado aeróbico é considerado como padrão de resistência ao tratamento térmico por calor seco e tratamento térmico em soluções com baixos valores de atividade de água.

3.1.3 - Meios de Cultura Empregados

Para a produção de esporos do microrganismo estudado foi empregado o meio citado por STUMBO (1973). Para contagem dos esporos viáveis após o tratamento térmico foi empregado o meio "Plate Count Agar" PCA OXOID, adicionado de 0,15% de amido solúvel.

3.2 - Métodos

3.2.1. Determinação da Estabilidade da Temperatura na câmara de Tratamento

Para testar a estabilidade da temperatura da câmara, nas operações de introdução e retirada de amostras, foi adotado o procedimento descrito a seguir.

O equipamento era posto em funcionamento e esperado o tempo necessário para estabilização da temperatura dentro da câmara, nos valores desejados para os testes. Atingida a

estabilidade, as gavetas I e II - Figura 3 - eram abertas e fechadas uma após a outra, por 2 segundos, sendo anotadas as eventuais variações de temperatura, com o sensor do termômetro introduzido através dos orifícios 1, 2, e 3 - Figura 3.

3.2.2 - Produção de Esporos

Uma cultura estoque de *Bacillus subtilis* var. *niger* foi revigorada em Nutriente Agar (OXOID) por 82 horas a 35°C. Após constatada, visualmente, turvação intensa, alíquotas de 1,5 ml do meio foram transferidas para a superfície de 100 ml do meio para esporulação recomendado por STUMBO (1973), contidos em frascos de 1.000 ml para obter-se grande superfície com pequeno volume. Foram usados seis frascos para a produção de esporos. Após incubação por 72 horas a 35°C, com observações diárias ao microscópio, as células apresentaram-se praticamente todas esporuladas e um grande número de esporos já estavam liberados. Os esporos e as células esporuladas foram recolhidos de cada frasco com cerca de 10ml de água destilada, raspando-se a superfície com bastonete de vidro em "L". Esta última operação foi repetida uma vez.

As porções de água foram reunidas e incubadas 24 h a 45°C para acelerar a liberação de esporos ainda contidos em células. Após a incubação, o volume total foi centrifugado a 2.500 g por 5 min separando-se a massa de esporos. O sedimentado foi retomado em 50-70 ml de água destilada e de novo centrifugado. Esta operação foi repetida mais duas

vezes. Executada a última centrifugação os esporos foram suspensos em cerca de 5 ml de água destilada, e estocados a 5°C até sua utilização.

Esta suspensão estoque sofreu diluições tais que, para inoculação das lâminas portadoras durante os experimentos usou-se uma suspensão contendo $1,34.10E+9$ esporos/ml, contados em câmara de Neubauer segundo metodologia preconizada por COLLINS & LYNE (1970).

3.2.3 - Preparação das Amostras para Tratamento

Cinco lâminas de alumínio medindo 10x15x0,02mm fixadas em suportes, conforme descrito por PRADO FILHO (1987b), e esterilizadas em placa de Petri, eram inoculadas com uma gota da suspensão de esporos liberada por uma pipeta de Pasteur marca SCIENTIFIC PRODUCTS código P5202 designação ASTM E-438-71.

Esta pipeta padronizada libera gotas uniformes em condições uniformes, e experimentalmente foi determinado que para liberar 1,0ml da suspensão de esporos, contendo em média $1,34.10E+9$ esporos/ml, eram necessárias em média 40 gotas, o que corresponde a uma média de $3,35.10E+8$ esporos inoculados por lâmina

Após inoculadas as lâminas, a placa de Petri era transferida para um dessecador, no qual fazia-se vácuo durante 15 min tempo suficiente para que a água da gota evaporasse deixando, contudo, os esporos ainda úmidos. Neste ponto admitia-se, lentamente, ar filtrado em algodão para a

quebra do vácuo. Das cinco lâminas preparadas, três eram tratadas, e duas ficavam como de reserva.

3.2.4 - Condições de Tratamento

As temperaturas programadas de tratamento foram 128 , 137 , 142 e 150°C, temperaturas estas que correspondem nas condições médias de pressão atmosférica em Piracicaba - SP, a atividades de água de 0,40; 0,30; 0,25 e 0,20 respectivamente. É neste intervalo que os esporos bacterianos apresentam maior resistência térmica. As atividades de água médias nas temperaturas citadas foram calculadas através de interpolação de dados citados por PRADO FILHO (1987a).

3.2.5 - Tratamento e Manuseio das Amostras

Nas temperaturas escolhidas para os testes, após atingida a estabilidade no equipamento, um suporte com a respectiva lâmina devidamente inoculada era introduzido na câmara com auxílio de uma pinça flambada, posicionando-se a lâmina na horizontal, sendo fechada automaticamente a gaveta pela ação da mola. A operação toda era executada normalmente em cerca de 2 segundos. Após fechada a gaveta, era acionado um cronômetro elétrico para registro do tempo de tratamento. Após um intervalo de 1 a 2 minutos, as mesmas operações eram repetidas para a segunda lâmina portadora de esporos.

Após o tratamento, o conjunto suporte-lâmina era

transferido rapidamente para tubo de ensaio contendo 10 ml de uma solução a 0,01% de TWEEN 80 em água destilada, resfriada a aproximadamente 10°C, e 0,5g de areia lavada com granulação menor que malha 100 TYLER. Após um intervalo de 15 a 20 minutos os esporos aderidos à lâmina eram raspados com bastão de vidro com ponta de borracha, sendo o tubo, então, agitado vigorosamente por 1 min. A seguir eram feitas 6 diluições consecutivas em tubos com 9ml da solução de TWEEN 80, sem areia, sendo 1,0ml de cada diluição plaqueado em duplicata em meio PCA OXOID contendo 0,15% de amido solúvel e as placas incubadas a 35°C por 48 h.

3.2.6 - Cálculo do Valor D

Para o cálculo do valor D da população de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 empregada nos testes da câmara de tratamento foram usados dois métodos.

O primeiro deles é o preconizado por STUMBO, 1973, e emprega a fórmula $D_t = t / \log a - \log b$ onde,
t = tempo total de tratamento da amostra a temperatura escolhida.

a = número de esporos viáveis no início do tratamento.

b = número de esporos viáveis no final do tratamento.

Como número inicial - a - foi considerado o valor $3,35.10E+8$ esporos conforme descrito em 3.2.3, assumindo-se que todos os esporos seriam viáveis.

O segundo método obtém o valor D_t a partir da equação de regressão calculada 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 espelha a resistência da fração mais resistente em cada temperatura, e não a resistência média da população.

Isto não constitui limitação do método, pelo contrário, uma vez que a finalidade de um processo térmico é, se possível, inativar até os mais resistentes esporos presentes na população tratada.

Como comparação da aplicabilidade da equação de regressão linear calculada, são apresentados na Tabela 9 os valores D obtidos por extrapolação a partir dos gráficos calculados através do processamento dos dados obtidos, pelo programa HARWARD GRAPHICS (Software Publishing Corporation/USA).

4. RESULTADOS

As Fotos 1 , 2 , 3 e 4 mostram a câmara de tratamento construída.

As tabelas 1, 2, 3 e 4 mostram as médias dos resultados obtidos nas cinco repetições dos testes de estabilidade descrito em 3.2.1.

Testes preliminares idênticos, porém, com o suporte e a lâmina cortadora de esporos sendo introduzidos e retirados nas operações de abertura e fechamento das gavetas, não foram notadas variações maiores das temperaturas, razão pela qual não foram feitas determinações adicionais.

As tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram o valores D_t calculados pela fórmula de STUMBO (1973).

Os gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram a evolução geral da destruição térmica dos esporos do microrganismo tratado, bem como a ocorrência de fenômenos de ativação e inativação e a evidência de frações mais resistentes da população à 128, 142 e 150°C.

Na tabela 9 temos a comparação do valor D_t obtidos pela fórmula de STUMBO (1973), pela equação de regressão e por extrapolação gráfica.

4. RESULTADOS

As Fotos 1 , 2 , 3 e 4 mostram a camara de tratamento construida.

Foto 1- Vista geral do aparelho montado

Foto 2 - Camara com as gavetas

Foto 3 - Gaveta e câmara separadas

Foto 4 - Câmara , gavetas e suporte com a lamina vista de frente.

Tabela 1 - Temperaturas* médias na câmara de tratamento antes e após abertura das gavetas a 128°C.

Gaveta	Posição 1		Posição 2		Posição 3	
	antes	após	antes	após	antes	após
I	128,10	128,16	128,12	128,16	128,20	128,10
II	128,16	128,14	128,18	128,20	128,16	128,18

* Média de 5 repetições

Tabela 2 - Temperaturas* médias na câmara de tratamento antes e após abertura das gavetas a 137°C.

Gaveta	Posição 1		Posição 2		Posição 3	
	antes	após	antes	após	antes	após
I	137,06	137,10	137,14	137,14	137,04	137,04
II	134,04	137,06	137,10	137,08	137,12	137,10

* Média de 5 repetições

Tabela 3 - Temperaturas* médias na câmara de tratamento antes e após abertura das gavetas a 142⁰C.

Gaveta	Posição 1		Posição 2		Posição 3	
	antes	após	antes	após	antes	após
I	142,08	142,08	142,08	142,06	142,14	142,12
II	142,08	142,12	142,28	142,06	142,14	142,12

* Média de 5 repetições

Tabela 4 - Temperaturas* médias na câmara de tratamento antes e após abertura das gavetas a 150⁰C.

Gaveta	Posição 1		Posição 2		Posição 3	
	antes	após	antes	após	antes	após
I	150,14	150,16	150,10	150,10	150,06	150,12
II	150,12	150,14	150,20	150,10	150,02	150,06

* Média de 5 repetições

Tabela 5 - Número de UFC e valor D calculado pela fórmula

$$D = t / (\log a - \log b) \text{ para tratamento a } 128^{\circ}\text{C e}$$

$$Aa \text{ média} = 0,40$$

Tempo de tratamento (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
30	3,53.10E+3	5,99
40	1,22.10E+4	9,14
50	1,03.10E+4	11,29
60	4,00.10E+4	15,30
90	5,20.10E+2	15,57
95	1,50.10E+2	14,96
100	1,32.10E+2	15,75
180	3,90.10E+2	30,30
270	3,50.10E+2	42,17

Tabela 6 - Número de UFC e Valor D calculado pela fórmula

$$D = t / (\log a - \log b) \text{ para tratamento a } 137^{\circ}\text{C e}$$

$$Aa \text{ média} = 0,30$$

Tempo de tratamento (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
10	4,40.10E+7	11,50
20	5,20.10E+6	11,06
25	3,70.10E+6	12,48
30	1,60.10E+6	12,81
35	6,70.19E+5	13,19
40	1,20.10E+5	11,56

Tabela 7 - Número de UFC e Valor D calculado pela fórmula

$$D = t / (\log a - \log b) \text{ para tratamento a } 142^{\circ}\text{C e}$$

$$Aa \text{ média} = 0,25$$

Tempo de tratamento (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
5	3,20.10E+5	1,64
10	5,50.10E+5	3,43
13	1,30.10E+5	3,70
15	1,90.10E+4	3,46
30	1,90.10E+2	4,14
45	1,67.10E+2	6,16

Tabela 8 - Número de UFC e Valor D calculado pela fórmula

$$D = t / (\log a - \log b) \text{ para tratamento a } 150^{\circ}\text{C e}$$

$$Aa \text{ média} = 0,20$$

Tempo de tratamento (minutos)	UFC (média)	Valor D (minutos)
4	1,80.10E+4	0,93
5	5,00.10E+3	1,03
6	6,10.10E+3	1,26
7,5	4,10.10E+3	1,53
8	3,50.10E+3	1,62
10	3,10.10E+3	2,04
15	2,20.10E+2	2,42
20	2,72.10E+1	2,85
25	1,02.10E+1	3,47
30	5,75.10E+0	3,91

Gráfico 1 - Inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 128°C e Aa média = 0,40.

Gráfico 2 - Fração mais resistente da população de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 128°C e Aa média = 0,40.

Gráfico 3 - Inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 137°C e Aa média = 0,30.

Gráfico 4 - Resistência média da população de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 137°C e Aa média = 0,30, sem evidencia de fração mais resistente.

Gráfico 5 - Inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 142°C e Aa média = 0,25.

Gráfico 6 - Fração mais resistente da população de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 142°C e Aa média 0,25.

Grafico 7 - Inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 150°C e Aa média = 0,20

Gráfico 8 - Fração mais resistente da população de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 a 150°C

Tabela 9 - Valores D máximos, em minutos, calculados pela fórmula $D=t/(\log a-\log b)$, por extrapolação gráfica e pela equação de regressão linear.

Temperatura °C	D máximo pela fórmula	D máximo por extrapolação gráfica	D máximo pela regressão linear
128	42,17	194,35	195,31
137	12,10	12,50	12,34
142	7,27	16,20	15,86
150	13,91	42,30	39,30

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As Fotos 2, 3 e 4 mostram a câmara de tratamento montada e suas peças constituintes, e deixam perfeitamente claro sua simplicidade quando comparada com a câmara de tratamento usada nos estudos feitos por PRADO FILHO (1982a) e CONTIERO & PRADO FILHO (1987).

A massa da câmara e sua superfície são relativamente pequenas o que favorece o aquecimento e a estabilização da temperatura mais rápidos e, dispensa blindagem térmica para evitar oscilações devidas a variações da temperatura ambiental. Um isolamento leve com lã de vidro, no segmento anterior às gavetas, é suficiente para manter temperaturas bastante estáveis no interior da câmara mesmo durante a abertura das gavetas.

O uso de tubo de cobre permitiu a construção de sistema simples de introdução e retirada de amostras sem necessidade de peças fundidas. Isto torna a câmara extremamente barata quando comparada com o modelo anteriormente utilizado, além, de não exigir mão de obra especializada.

O sistema de duas gavetas permite que se trate duas amostras simultaneamente, o que representa uma economia de 50% de tempo para o tratamento das amostras necessárias para um dado experimento.

A estabilidade da temperatura durante as operações de

introdução e retirada de amostras é muito boa, como pode ser observado nas Tabelas 1 , 2 , 3 e 4, cujos resultados expressam a média de cinco determinações em cada posição do sensor e em cada temperatura.

O máximo desvio observado $-0,2^{\circ}\text{C}$ - com relação à média na menor temperatura - 128°C -, corresponde a menos que 0,2% do valor desejado no experimento. Nas temperaturas mais altas esta variação percentual é menor ainda.

Os valores D calculados pela fórmula $D=t/(\log a-\log b)$ crescem com o aumento do tempo de tratamento, como pode ser constatado nas Tabelas 5, 6 e 7. Isto demonstra que a fórmula não oferece resultados consistentes para o tipo de experimento conduzido no presente trabalho.

Este aumento do valor D com o aumento do tempo de tratamento é resultado da presença, na população tratada, de frações com resistência sensivelmente maior que a da média da população, o que não é um fato excepcional em se tratando de esporos do gênero *Bacillus* (VAZS & PROTZ 1957; ANGELOTTI et alii 1968; FOX & PLUF 1968; FOX & EDER 1969; LEVINSON & HYATT 1971; BOND et alii 1971; REYNOLDS et alii 1974; MOLIN & OSTLUND 1975; ORDONES & BURGOS 1976; PULEO et alii 1978; PRADO FILHO 1987b)

Nos experimentos a 137°C a presença de frações mais resistentes não foi evidenciada, simplesmente por que os tempos de tratamento não foram suficientemente longos, coincidindo, neste caso, os valores D calculados por quaisquer um dos métodos descritos em 2.2.6.

A presença de frações com maior resistência, na

população tratada, é mostrada claramente nos Gráficos 1, 5 e 7. O Gráfico 3 não oferece indício de fração mais resistente pelos motivos supracitados.

Outro motivo da não consistência dos valores D calculados pela fórmula de STUMBO (1973) é a ocorrência de fenômenos de ativação e inativação, quer sejam simultâneos quer sequenciais.

A 128°C (Gráfico 1), nos tempos de tratamento empregados, pode ser observada uma sequência definida : ativação > inativação; ativação = inativação; ativação > inativação; inativação > ativação. Entre 110 e 180 minutos de tratamento pode ser observada uma possível ativação maior que a inativação, contudo, o intervalo de tempo é muito dilatado, o que torna imprecisa uma afirmação categórica.

A 137°C os fenômenos de ativação e inativação não foram evidenciados pelo fato de os tempos não serem suficientemente curtos. Já a 142°C - Gráfico 5 - aparece nitidamente uma fase de ativação maior que inativação entre 5 e 10 minutos de tratamento. A 150°C ficou evidente, pelo menos, uma fase de ativação igual à inativação.

As diferenças na relação ativação/inativação nas diferentes temperaturas, excessão a 137°C , podem ser atribuídas ao fato de temperaturas diferentes acionarem diferentes mecanismos de ativação, conforme postulado por BERG & SANDINE (1970) e ADAMS & BUSTA (1972). Como fator adicional devemos considerar, na ativação, não apenas a temperatura, mas sim o binômio temperatura-atividade de água, cuja variação não é linear com aumento da temperatura.

A evidência de fenômenos de ativação e inativação simultâneos é um argumento a mais a favor do funcionamento satisfatório da câmara proposta e dos métodos de manuseio das amostras, uma vez que, mesmo em tempos de tratamento curtos o tempo consumido pela sequência "introdução da amostra - aquecimento à temperatura de tratamento - retirada da amostra - resfriamento à temperatura não letal", é mínimo, podendo ser descartada a necessidade de correções do tempo de tratamento no cálculo dos valores D.

Os valores D obtidos pela equação de regressão linear e por extrapolação gráfica, o foram considerando-se apenas a fração mais resistente detectada da população tratada.

O valor percentual dessas frações varia de temperatura para temperatura mas, em todas elas, na população tratada no presente trabalho, representa menos que um esporo por milhão de esporos tratados.

Os valores D obtidos pela equação de regressão e por extrapolação gráfica - Tabela 9 - são funções do número inicial de esporos nas lâminas portadoras, embora o mesmo não seja considerado no cálculo do citado valor D. Se o número de esporos inoculados fosse maior, existiria a possibilidade de serem detectados esporos ainda mais resistentes em tempos de tratamento maiores, o que aumentaria os valores D obtidos pela equação de regressão e por extrapolação. Essa dependência do valor D em função do número inicial de esporos tratados também é apontada por HACHIGIAN & SCHELINGER (1991).

Nos experimentos conduzidos, uma maior concentração de esporos, já no nível de $n.10E+9$, resultaria em uma camada

muito espessa de matéria orgânica que secaria e tornar-se-ia quebradiça durante o tratamento térmico, podendo ocasionar eventuais perdas de diminutas frações da amostra o que por sua vez, tornaria as contagens de UFC pouco confiáveis.

A ocorrência de frações mínimas muito resistentes em conjunto com fenômenos simultâneos de ativação e inativação são, em experimentos de determinação de valores D, responsáveis pela ocorrência de gráficos de destruição térmica de aparência sigmóide, e não retilínea como seria de se esperar para um fenômeno que é considerado como seguindo as leis que regem as reações de primeira ordem.

HACHIGIAN & SCHELINGER (1991) atribuem, em alguns casos, a aparência sigmoide dos gráficos de destruição térmica ao uso de papel semi-logarítmico na construção do gráfico, propondo, nestes casos, um parâmetro diferente para o eixo de Y e não simplesmente o logaritmo dos esporos sobreviventes.

Esta aparência geral sigmoide pode ser observada nos Gráficos 1, 5 e 7, não sendo notada no Gráfico 3 pelos motivos já discutidos.

Inferir o valor D de uma população de esporos considerando apenas a porção retilínea do gráfico de sobrevivência, pode conduzir a uma subestimação do valor D das frações mais resistentes, é o que sucede no Gráfico 3 para a temperatura de 137°C. Devido a isto considerou-se, no presente trabalho, os valores D das frações mais resistentes como os representantes da população testada, sendo os mesmos os considerados na montagem da Tabela 9.

Os valores D extremos não representam a média da

população tratada, porém, podem ser encarados como "fatores de segurança", uma vez que na eventual transposição dos resultados para condições práticas, onde se visa a destruição dos esporos mais resistentes e não apenas dos de resistência média, tais valores D diminuiriam as possibilidades de falhas devidas a não consideração de esporos de resistência muito superior àquela da média da população.

No caso de aplicação de calor seco em âmbitos de temperaturas nas quais a atividade de água varia sensivelmente, é necessário conduzir testes diretamente nas temperaturas de trabalho visadas, uma vez que não é possível o cálculo de um valor Z, como é usual na transposição de resultados de resistência a calor úmido de uma temperatura de teste para uma superior, de eventual aplicação prática.

A determinação do valor D, da fração mais resistente, por via da equação de regressão linear ou por extrapolação gráfica, oferece a vantagem, nos experimentos da natureza dos conduzidos neste trabalho, de os mesmos não serem influenciados diretamente pelo número de esporos inoculados nas lâminas portadoras.

O valor D determinado para 128°C são da mesma ordem de grandeza dos obtidos por PRADO FILHO (1987b), porém, mais elevado, o que mostra que no âmbito de maior resistência dos esporos ($A_a = 0,20$ a $0,40$), *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372 é mais resistente à $A_a = 0,40$ que a $A_a = 0,35$. A diferença de 2°C na temperatura não seria suficiente para justificar, uma diferença tão marcante de resistência. Isto deve ser atribuído a atuação complexa do binômio temperatura-

atividade de água e não apenas à primeira.

A 142°C e $A_a = 0,25$ os valores encontrados por PRADO FILHO (1987b) são coincidentes, já a 150°C os valores são completamente diferentes, o que pode ser atribuído a uma eventual insuficiência no tempo de tratamento para a detecção de frações mais resistentes, como sucedeu no presente trabalho a 137°C .

Embora relativamente alta, a resistência térmica não alcança os níveis determinados por outros autores para esporos do gênero *Bacillus* tratados por calor seco, como BOND et alii (1971) que determinaram um valor $D = 139$ h a 125°C para *Bacillus* sp ATCC 27380 isolados de solo ou BOND et alii (1973) que isolaram de solo espécime do gênero *Bacillus* com valor $D = 139$ h a 125°C , ou ainda, como REYNOLDS et alii (1974) que isolaram esporos com valor $D = 29$ h a 125°C , ou BOND & FAVERO (1975) que encontraram, em dependências de montagem de veículos espaciais, esporos do gênero *Bacillus* com um valor $D = 54$ h a 130°C , ou, também, PULEO et alii (1975) que determinaram para esporos de *Bacillus* sp valor $D=14$ h a 113°C e $D = 6,3$ h a 125°C .

Pelo acima exposto é necessário, quando se estuda resistência térmica de esporos do gênero *Bacillus* perante calor seco, levar em conta a história pregressa dos esporos, que se desejam inativar. O pré-condicionamento dos esporos "in vitro", em condições mais próximas possíveis daquelas que ocorrem "in natura", é uma condição desejável para a obtenção de valores mais próximos daqueles que poderiam, eventualmente, ser empregados com fins práticos.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - O modelo de câmara proposto é de baixo custo podendo ser construído, sem equipamento ou mão-de-obra especializada.

6.2 - As temperaturas desejadas para tratamento são muito estáveis, em quaisquer posições das amostras, não sendo alteradas, de maneira significativa, durante as operações de introdução e retirada das mesmas, alcançando plenamente os objetivos propostos.

6.3 - Os valores D calculados pela fórmula de STUMBO (1973) não são consistentes com a real resistência das frações mais resistentes da população, não devendo, portanto, ser empregados em experimentos como os realizados no presente trabalho.

6.4 - Nas temperaturas em que os tempos de tratamento foram suficientemente curtos, evidenciou-se a presença de fenômenos de ativação e inativação sequenciais ou simultâneos originando gráficos de destruição térmica de aparência geral sigmóide.

6.5 - Nas temperaturas de 128, 142 e 150°C foi verificada a existência de esporos muito mais resistentes que a média da população. Esta fração mais resistente representa menos que um esporo por milhão de esporos tratados. A 137°C tal fração mais resistente da população não foi detectada por insuficiência do tempo de tratamento.

6.6 - Embora não influenciando diretamente no cálculo do valor D pela equação de regressão linear e por extrapolação gráfica, da fração mais resistente da população, o número inicial de esporos inoculados nas lâminas portadoras pode influir na detecção de esporos de resistência extrema, muito superior à média da população estudada em um experimento.

6.7 - Os esporos de *Bacillus subtilis* var niger ATCC 9372 apresentaram, no presente trabalho, resistência térmica sensivelmente maior a 128°C e $Aa = 0,40$ que, em condições idênticas de tratamento a 130°C e $Aa = 0,35$ (PRADO FILHO, 1987b). Esta diferença de resistência deve ser atribuída à ação do binômio atividade de água - temperatura e não apenas à diferença de 2°C nesta última.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCOCK, S. Evaluation of heat resistance of *Clostridium sporogenes* following heat shock. *Food Microbiology*, Chicago, 1:39-41, 1984.
- ALDERTON, G & SNELL, N. Chemical states of bacterial spores; heat resistance and its kinetics of intermediate water activity. *Applied Microbiology*, Washington, 19:562-72, 1970.
- ALDERTON, G; CHEN, J.K.; ITO, K.A. Resistance forms de *Clostridium botulinum* 62A spores over the water activity range 0 to 0,9. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 30:511-5, 1980.
- ALDERTON, G.; ITO, K.A.; CHEN, J.K. Chemical manipulation of the heat resistance of *Clostridium botulinum* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 31:492-8, 1976.
- ANGELOTTI, R; MARYANSKI, J.H.; BUTLER, T.F.; PEELER, J.T.; CAMPBELL, J.E. Influence of spore moisture content of the dry-heat resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Applied Microbiology*, Washington, 15:735-45, 1968.

- BAYLISS, C.E. & WAITES, W.M. Effect of simultaneous high intensity ultraviolet irradiation and hydrogen peroxide on bacterial spores. *Journal of Food Technology*, Oxford, 17:467-70, 1982.
- BEAMAN, T.C. & GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 52(6):1242-6, 1980.
- BERG, R.W. & SANDINE, W.E. Activation of bacterial spores. A review. *Journal Milk. Food Technology*. Ames, 33:435-41, 1970.
- BOND, W.W. & FAVERO, M.S. Thermal profile of a *Bacillus* species (ATCC 27380) extremely resistance to dry heat. *Applied Microbiology*, Washington, 29:859-60, 1975.
- BOND, W.W.; FAVERO, M.S.; KORBER, M.R. *Bacillus* sp ATCC 27380: a spore with extreme resistance to dry heat. *Applied Microbiology*, Washington, 26(4):614-6, 1973.
- BOND, W.W.; FAVERO, M.S.; PETERSEN, N.J.; MARSHAL, J.H. Relative frequency distribution of D125 values for spores isolates from Mariner-Mars 1969 space craft. *Applied Microbiology*, Washington, 21:832-6, 1971.
- BRANNEM, J.R. & GARST, D.M. Dry heat inactivation of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores as a function of relative humidity. *Applied Microbiology*, Washington, 23:1125-30, 1972.

- BROWN, K.L. Use of a computer data file for storage of heat resistance data on bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 65:49-54, 1988.
- BROWN, K.L.; GAZE, J.E.; McCLEMENT, W.P. Construction of a computer-controlled thermoresistometer for the determination of the heat resistance of bacterial spores over the temperature range 100 to 150°C. *International Journal of Food Science and Thecnology*, London, 23:361-71, 1988.
- BRUCH, K.M. & SMITH, W.F. Dry heat resistance of spores of *Bacillus sbtilis* var. *niger* on Kapton and Teflon film at high temperatures. *Applied Microbiology*, Washington, 16:1841-6, 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 nitrite. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 49:55-63, 1980.
- COLLIER, C.P. & TOWNSEND, T. The resistance of bacterial spore to superheated steam. *Food Thecnology*, Chicago, 10:477-81, 1956.
- COLLINS, C.H. & LYNE, P.M. *Microbiological methods*. London, Butterworths, 1970. 454p.
- CONTIERO, J. Resistência térmica de conidiospóros de *Aspergillus parasiticus* Speare ao calor seco: desenvolvimento de equipamentos e ensaios. Piracicaba, 1984, 93 p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP).

- DRUMOND, D.W. & PFLUG, I.J. Dryheat destruction of *Bacillus subtilis* on surface effect of humidity in an open system. *Applied Microbiology*, Washington, 20:805-9, 1970.
- EMBORG, C. Inactivation of dried bacteria and bacterial spores by means of gamma-irradiation at high temperature. *Applied Microbiology*, Washington, 27:830-3, 1974.
- ETOA, F.X. & MICHIELS, L. Heat induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Letters in Applied Microbiology*, Washington, 6:43-5, 1988.
- FEEHERRY, F.E.; MUNSEY, D.T.; ROWLEY, D.B. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 53(2):365-70, 1987.
- FISHER, D.A. & PFLUG, I.J. Effect of combined heat and radiation on microbiology destruction. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 33:1170-6, 1977.
- HACHIGIAN, J. & SCHELINGER, R.J. Analysis of quantal response data from bacterial destruction studies in sterilization: the Stumbo estimate is biased. *Journal Applied Bacteriology*, London, 71:460-66, 1991.
- HARNULV, B.G.; JOHANSSON, M.; SNYGG, BG. Heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores at different water activities. *Journal of Food Science*, Champaign, 42:91-3, 1977.
- HOFFMAN, R.K.; GAMBILL, V.M.; BUCHANAN, L.M. Effect of cell moisture on the thermal inactivation rate of bacterial spores. *Applied Microbiology*, Washington, 16:1240-1, 1968.

- KHOURY, D.H.; LOMBARD, S.J.; SLEPECKY, R.A. Perturbation of the heat resistance of bacterial spores by sporulation temperature and ethanol. *Current Microbiology*, New York, 15:7-9, 1987.
- KING JUNIOR, A.D.; BAYNE, H.G.; ALDERTON, G. Non logarithmic death rate calculation for *B. fulva* and other microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 37:596-600, 1979.
- KREITH, F. *Princípios de transmissão de calor*. São Paulo, Edgard Blucher, 1973, 650p.
- LEAPER, S. Comparison of the resistance to hydrogen peroxide of wet and dry spores of *Bacillus subtilis* 5 A 22. *Journal of Food Technology*, Oxford, 19: 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*, Ames, 51(6): 475-80, 1988.
- MALLIDIS, C.G. & SCHOLEFIELD, J. Determination of the resistance of spores using a solid heating block system. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 59: 407-11, 1985.
- MALLIDS, C.S. & SCHOLEFIELD, J. Relation of the heat resistance of bacterial spores to chemical composition on structure. I. Relation to core components. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 62: 65-9, 1987.
- MICHENER, D.H. & KING JUNIOR, A.D. Preparation of free heat-resistance ascospores from *Byssoschlamys* asci. *Applied Microbiology*, Washington, 27: 671-3, 1974.

- MOLIN, G. Inherent genetic differences in dry heat resistance of some *Bacillus* spores. In: BARKER, A.N., ed. Spore research. London, Academic Press, 1977. p. 487-500.
- MOLIN, G. & OSTLUND, K. Dry-heat inactivation of *Bacillus subtilis* spores by means of infra-red heating. *Antonie von Leeuwenhoek*, Amsterdam, 41: 329-35, 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*, Champaign, 55(6): 1725-7, 1990.
- MURREL, W.G. & SCOTT, W.J. The resistance of bacterial spores at various water activities. *Journal of General Microbiology*, London, 43: 411-25, 1966.
- ODLANG, T.E.; CAPUTO, R.A.; GRAHAM, G.S. Heat resistance and population stability of lyophilized *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 41: 3374-7, 1981.
- OXBORROW, G.S.; PLACENCIA, A.M.; DANIELSON, J.W. Effects of temperature and relative humidity on biological indicators used for ethylene oxide sterilization. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 45: 546-9, 1982.
- PEELER, J.T.; REYES, A.L.; GRAWFORD, A.J.; WEHBY, A.J.; CAMPBELL, J.E. Thermal resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* in a closed system. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, 33: 52-8, 1977.

- PHEIL, C.G.; PFLUG, I.J.; NICHOLAS, R.C; AUGUSTIN, J.A.L.
Effect of various gas atmospheres on destruction of microorganisms in dry heat. *Applied Microbiology*, Washington, 15: 120-4, 1967.
- PFLUG, I.J. Thermal resistance of microorganisms to dry heat design of apparatus, operational problems and preliminary results. *Food Technology*, Chicago, 14: 483-7, 1960.
- PRADO FILHO, L.G. Estudo dos parâmetros termodinâmicos da inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* por calor seco. *Revista Brasileira de Tecnologia*, Brasília, 6:77-82, 1975a.
- _____. Die thermische Abtoetung von sporen von *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 in Gasphasen mit liner Wasseraktivitaet < 1,0. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, Zurich, 7: 29-33, 1975b.
- PRADO FILHO, L.G. & KIEFER, P. Versuchsanlage zur thermischem Behandlung von Bakteriensporen in Gasen mit liner Wasseraktivitaet < 1,0. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, Zurich, 7: 255-6, 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. 124p. (Livre Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.)
- PRADO FILHO, L.G. Resistência térmica de microorganismos em ambiente de baixa atividade de água. I. Montagem de equipamento específico e cálculos termodinâmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 7: 27-49, 1987a.

- _____. Resistência térmica de microrganismos em ambiente de baixa atividade de água. II. Resistência térmica de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 frente a vapor superaquecido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 7: 145-71, 1987b.
- PULEO, J.R.; BERGSTROM, S.L.; PEELER, J.T.; OXBORROW, G.S. Thermal resistance of naturally occurring airborne bacterial spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 36: 473-9, 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*, Washington, 30: 786-90, 1975.
- QUAST, D.G.; LEITÃO, M.F.F.; KATO, K. Death of *Bacillus stearothermophilus* 1518 spore on can covers exposed to superheated steam in on dole aseptic canning system. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, Zurich, 10: 198- 202, 1977.
- RANK, E. & PFLUG, I.J. Dry heat destruction of spores on metal surfaces and on potatoes during baking. *Journal of Food Protection*, Ames, 40: 608-13, 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*, Washington, 42(4): 692-7, 1981.

- REYNOLDS, M.C.; LINDELL, K.F.; DAVID, T.J.; FAVERO, M.S.;
BOND, W.W. Thermoradiation inactivation of naturally
occurring bacterial spores in soil. *Applied Microbiology*,
Washington, 28: 406-10, 1974.
- ROEMER, G.B. Heissluftsterilisation. *Deutsche Medizinische
Wochenschrift*, Stuttgart, 100: 709-10, 1975.
- SCHOLEFIELD, J. & ABDELGADIR, A.M. Heat resistance
characteristics of spores of rough and smooth variants of
B. stearothermophilus. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD
SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4., Valencia, 1974. *Proceedings*.
Madrid, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
c/ Jaime Roig, 1974. v.3, p. 71-8.
- SPIEGEL, M.R. Teoria da correlação. In: _____.
Estatística. São Paulo, Mc Graw-Hill do Brasil, 1974. cap.
14, 11. p. 401- 45. (Coleção Schaum).
- SRIMANI, B. & LONCIN, M. Determination of decimal reduction
time of *Bacillus subtilis* spores at 100°C. *Lebensmittel-
Wissenschaft und Technologie*, Zurich, 13: 190-2, 1980.
- SRIMANI, B.; STAHL, R., LONCIN, M. Death rates of bacterial
spores at high temperatures. *Lebensmittel Wissenschaft
und Technologie*, Zurich, 13: 186-9, 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, 329p.

VON SCHELHORN, M.L. & HEISS, R. The influence of relative humidity on the thermal resistance of mould spores. In: DUCKWORTH, R.B., ed. Water relation of food, London, Academic Press, 1975.