RESISTÊNCIA TÉRMICA DE CONIDIOSPOROS DE Aspergillus parasiticus
SPEARE AO CALOR SECO. DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTO E ENSAIOS.

JONAS CONTIERO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

Dissertação apresentada à Escola Su-
perior de Agricultura "Luiz de Quei-
roz", da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia - Área de Concentração:
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro, 1984

Aos meus pais

Primo e Ângela,

AGRADEÇO.

À minha esposa *Elíana* e

a meu filho *Matheus,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e, em especial, às seguintes pessoas e entidades.

- Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho, pela segura orientação recebida. Sua amizade e seus ensinamentos foram fatores preponderantes para a realização deste trabalho.

- Aos Profs. Drs. Antonio Joaquim de Oliveira e João Gustavo Brasil Caruso, pela amizade e apoio durante o trabalho.

- Ao Técnico do Instituto de Tecnologia de Alimentos Genevaldo de Souza, pelo auxílio na execução do resumo em inglês.

- Ao Sr. José Fernandes Vieira, Preparador do Departamento de Tecnologia Rural, pela colaboração prestada durante a execução do presente trabalho.

- Ao CNPq pela bolsa de pesquisa durante o referido trabalho.

- Ao Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ - USP pela disposição de seus laboratórios para que esse trabalho pudesse ser realizado.

- - Ao Departamento de Química Tecnológica e Aplicação do Instituto de Química da UNESP pela liberação concedida ao autor, para que pudesse realizar o presente trabalho de pesquisa.

- Ao Seminário Internacional (Internationales Seminar der Universität Karlsruhe) pela doação de parte do equipamento utilizado no presente trabalho.

Í N D I C E

	Página
RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. <u>Material</u>	25
3.1.1. Equipamento para tratamento térmico de esporos	25
3.1.1.1. Filtro de ar	26
3.1.1.2. Saturador	28
3.1.1.3. Umidificador	29
3.1.1.3.1. Banho termostatizado	30
3.1.1.4. Secção de aquecimento.....	30
3.1.1.5. Câmara de tratamento de conídios poros	33
3.1.1.6. Sistema de medição de temperatu ra	33
3.1.1.7. Sistema de controle de tempera- tura	35
3.1.2. Microrganismo estudado	41
3.1.3. Meio de cultura empregado.....	41

	Página
3.2. Métodos	41
3.2.1. Cálculos	41
3.2.2. Cálculos dos tempos de aquecimento das lâminas portadoras de conidiosporos.....	42
3.2.3. Cálculo dos tempos de resfriamento da lâ mina portadora de conidiosporos após o tratamento térmico	46
3.2.4. Produção de conidiosporos	51
3.2.5. Preparação das amostras para tratamento	51
3.2.6. Condições de tratamento	52
3.2.7. Tratamento das amostras	53
3.2.8. Manuseio das amostras após o tratamento.	54
3.2.9. Amostras tratadas	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Resultados relativos aos cálculos dos tempos de aquecimento e resfriamento da lâmina portadora de conidiosporos	56
4.2. Resultados relacionados ao estudo da resistência térmica de conidiosporos de <u>A. parasiticus</u>	61
5. DISCUSSÃO	68
5.1. Equipamento montado	68
5.2. Experimentos de resistência térmica.....	71
6. CONCLUSÕES	80
6.1. Equipamento	80
6.2. Microrganismo estudado	81
7. LITERATURA CITADA	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Número de REYNOLDS calculados para o ar fluindo na câmara de tratamento.....	57
Tabela 2 - Valores de $Re^{1/2}$, $Pr^{1/3}$ e Nu no âmbito de temperatura de trabalho do equipamento.....	58
Tabela 3 - Valores calculados para o coeficiente de transmissão de calor h, no processo de aquecimento da lâmina portadora de esporos.....	59
Tabela 4 - Velocidades calculadas de aquecimento da lâmina portadora de esporos com temperatura inicial $T_0 = 30^{\circ}\text{C}$, sendo $Bi \ll 0,1$	59
Tabela 5 - Valores calculados para o coeficiente médio de transmissão de calor $\bar{h}$ na fase de resfriamento da lâmina portadora de esporos. Cálculos com $T_{\infty} = 10^{\circ}\text{C}$ (50°F).....	60
Tabela 6 - Velocidades calculadas de resfriamento da lâmina portadora de esporos até a temperatura não letal $T = 25^{\circ}\text{C}$ sendo $Bi \ll 0,1$	60
Tabela 7 - Condições de temperaturas, atividade de água reinante nos experimentos e valores "D" calculados.....	61

Tabela 8 - Tempos de redução decimal - "D", de esporos de <i>Aspergillus parasiticus</i> 403	62
Tabela 9 - Contagens médias de conídiosporos inocula- dos nas lâminas	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema geral do equipamento montado	27
Figura 2 - Esquema do saturador (sem escala).....	31
Figura 3 - Esquema do umidificador (sem escala).....	31
Figura 4 - Filtro com chicana (sem escala).....	32
Figura 5 - Suporte da lâmina portadora de esporos (medidos em mm)	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Tempo de redução decimal de conídiosporos de <i>A. parasiticus</i> 403, tratados com ar superaquecido a $t = 100^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,032$	63
Gráfico 2- Tempo de redução decimal de conídiosporos de <u><i>A. parasiticus</i></u> 403, tratados com ar superaquecido a $t = 105^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0.027$	64
Gráfico 3- Tempo de redução decimal de conídiosporos de <u><i>A. parasiticus</i></u> 403 tratados com ar superaquecido a $t = 110^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,024$	65
Gráfico 4- Tempo de redução decimal de conídiosporos de <i>A. parasiticus</i> 403, tratados com ar superaquecido a $t = 115^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,019$	66
Gráfico 5- Curva de morte térmica	67

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	Página
Foto 1 - Saturador montado	36
Foto 2 - Umidificador	36
Foto 3 - Filtro com chicanas	37
Foto 4 - Vista geral do aparelho montado	37
Foto 5 - Secção de aquecimento sem blindagem térmica, conecção afunilada e cotovelo de união secção de aquecimento - Filtro do umidificador.....	38
Foto 6 - Secção de aquecimento com blindagem térmica..	38
Foto 7 - Resistências internas de aquecimento do ar...	39
Foto 8 - Camada de tratamento montada	39
Foto 9 - Câmara de tratamento (aberta, sem chapa de blindagem térmica frontal).....	40
Foto 10- Montagem do equipamento para aferição dos ter- moelementos	40

RESISTÊNCIA TÉRMICA DE CONIDIOSPOROS DE Aspergillus parasiticus
SPEARE AO CALOR SECO. DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTO E ENSAIOS.

CANDIDATO: JONAS CONTIERO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a montagem de um aparelho para tratamento térmico de esporos, que instalasse uma atividade de água no ar, a ser utilizado como meio de aquecimento. O tratamento térmico segue o princípio de aquecimento e resfriamento instantâneo.

Outro objetivo foi estudar a resistência térmica de conídiosporos de Aspergillus parasiticus 403, produtor de aflatoxina B₁ e G₁, em ar superaquecido.

O equipamento é constituído basicamente de um saturador, um umidificador, um termostato, uma secção tubular de aquecimento e uma câmara de tratamento.

O tempo de aquecimento da lâmina de alumínio de 10 x 15 x 0,02 mm, nas temperaturas de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 110, 115 e 120°C não ultrapassava 3,2 segundos, sendo que nas temperaturas testadas, as atividades de água

no ar superaquecido foram 0,270; 0,160; 0,105; 0,068; 0,046; 0,032; 0,027; 0,024; 0,019 e 0,017, respectivamente.

O tempo de resfriamento pós-tratamento, nas temperaturas testadas não ultrapassou 2,2 segundos, incluindo-se o tempo de transferência da amostra.

Para o estudo da resistência térmica de A. parasiticus 403, os conidiosporos estocados em suspensão aquosa acerca de 5°C, antes de serem submetidas aos tratamentos térmicos, eram pipetados nas lâminas de alumínio e secas a vácuo, sendo pré-condicionados por 48 horas em ambiente de $a_w = 0,75$. Após o tratamento, a contagem dos conidiosporos viáveis, foi feita em meio CZAPECK. O cálculo de "D" foi feito através da fórmula $D = \frac{t}{\log a - \log b}$ e retas de quadrados mínimos.

Os valores "D" encontrados foram 24 min a 100°C e $a_w = 0,032$; 22,5 min a 105°C e $a_w = 0,027$; 11,5 min a 110°C e $a_w = 0,024$, 9,0 min a 115°C e $a_w = 0,019$.

O uso da fórmula $D = \frac{t}{\log a - \log b}$ é limitado, não permitindo a constatação de fenômenos de ativação e inativação simultâneos, ou a eventual presença de frações de resistência média diferentes.

Nas temperaturas de 105°C, 110°C e 115°C, os conidiosporos de A. parasiticus 403 apresentaram duas frações de resistências médias diferentes.

O valor $Z = 32^{\circ}\text{C}$ calculado para o microrganismo em estudo, tem um valor relativo, podendo ser válido apenas em espaço muito limitado de temperatura.

Aspergillus parasiticus, *SPEARE* CONIDIOSPOROS THERMAL RESISTANCE
TO DRY HEAT. EQUIPMENT DEVELOPMENT AND ESSAYS

CANDIDATE: JONAS CONTIERO

ADVISER: PROF. DR. LUIZ GONZAGA DO PRADO FILHO

SUMMARY

The present study had the objective of setting an equipment for heat treatment of spores, which installed an water activity in the air to be used as the heating medium. The heat treatment follows the principle of instantaneous heating and cooling.

The other objective was to study the heat resistance of the conidiospores of the Aspergillus parasiticus 403, producer of the aflatoxins B₁G₁ in superheated air.

The equipment is basicaly constituted of a saturator, a humidifier, a thermostat, a tubular section for heating of the air and a chamber for the heat treatment of the spores.

The time of heating of the aluminum plate of 10 x 15 x 0,02 mm, in the temperatures of 50; 60; 70; 80;

90; 100; 105; 110; 115 and 120°C did not pass 3,2 seconds, the water activities in the superheated air for the temperatures mentioned above, were 0.270; 0.160; 0.105; 0.068; 0.046; 0.032; 0.027; 0.024; 0.019 and 0.017, respectively.

The time of cooling after treatment, in the tested temperatures did not pass 2,2 seconds, inducing the time of samples transferring.

To the study of heat resistance of A. parasiticus 403, the conidiospores stored in water suspension at about 5°C, before being submitted to heat treatment, were transferred to the aluminum plate by means of a pipet and vacuum dried, being pre-conditioned, for 48 hours in environment of water activity 0.75. After the treatment the counting of the viable conidiospores were made in CZAPECK medium. The D value was calculated through the formula $D = \frac{t}{\log a - \log b}$ and linear regression.

The found values for D were 24 min at 100°C and $a_w = 0.032$; 22.5 min at 105°C, and $a_w = 0.027$; 11.5 min at 110°C and $a_w = 0.024$; 9.0 min at 115°C and $a_w = 0.019$.

The use of the formula $D = \frac{t}{\log a - \log b}$ is limited, not permitting the constancy of phenomena simultaneous of activation and inactivation, or of eventual presence of fraction of different average resistances.

At the temperatures of 105°C , 110°C and 115°C , the conidiospores of A. parasiticus 403 presented two fractions of different average resistances.

The Z value 32°C calculated to the microorganism in study, has a relative value, that can be valid only in a very limited space of temperature.

1. INTRODUÇÃO

A presença de água é indispensável para o desenvolvimento da vida, e no caso de alimentos, é um fator básico na evolução de diversos fenômenos que levam à deterioração dos mesmos. Contudo, a água presente nos alimentos precisa estar "disponível", e esta disponibilidade é expressa em termos de atividade de água (a_w).

A atividade de água (a_w) é definida como a relação entre o teor da umidade existente em um ambiente e o teor que deveria existir se o ambiente estivesse saturado. Portanto, os conceitos "atividade de água" (a_w) e umidade relativa (UR) equivalem-se, sendo este expresso em porcentagens e aquele em frações de umidade.

A influência da atividade de água (a_w) sobre a resistência térmica de esporos de microrganismos, é um fator de muita importância a ser considerado nos processos

que visam a inativação dos mesmos. É fato conhecido que a resistência térmica de esporos de microrganismos aumenta com a diminuição da atividade de água no ambiente. Na maioria dos casos, a resistência máxima é atingida no intervalo $a_w = 0,2$ a $a_w = 0,4$.

É de grande importância, no campo de estudo da resistência térmica de microrganismos e seus esporos, o conhecimento do comportamento dos mesmos em matérias primas e em alimentos desidratados ou liofilizados, e como esses microrganismos e esporos poderiam ser destruídos ou inativados sem o emprego dos métodos úmidos de descontaminação.

Na pesquisa sobre a resistência térmica de microrganismos em ambiente de $a_w < 1,0$, 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.

Um dos objetivos do presente trabalho é apresentar os planos de construção de um equipamento que permite o tratamento térmico de esporos de microrganismos, de modo a minimizar a necessidade de correções dos tempos de aquecimento e resfriamento das amostras, trabalhando com ar aquecido a pressão de 40 (lb). Um segundo objetivo é determinar a resistência térmica de esporos de Aspergillus parasiticus, produtor de micotoxinas B₁G₁ que ocorre em matérias primas

das indústrias de alimentos, e também em alimento cujo processamento não inclui a esterilização, como por exemplo, carnes e vegetais desidratados, tortas de oleaginosas empregadas no arroçoamento de animais, etc.

O conhecimento da resistência térmica é de interesse para o estudo da possibilidade de aplicação do calor seco, para diminuir ou mesmo eliminar totalmente a incidência desses microrganismos em matérias primas e alimentos infestados.

Especificamente no tocante aos fungos produtores de micotoxinas, os dados relativos à resistência térmica em ambiente $a_w < 1,0$ praticamente inexistem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Há centenas de anos são conhecidas as atividades de fungos que ocasionam alterações na qualidade dos alimentos. Às vezes, essas alterações são desejáveis como por exemplo para o desenvolvimento característico do sabor de alguns queijos. Porém, na maior parte dos casos, os fungos ocasionam alterações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis, causados por diferentes graus de deterioração.

A contaminação de alimentos com fungos, pode ocasionar, além de problemas de saúde, perdas consideráveis do ponto de vista econômico. Tais perdas decorrentes da contaminação de alimentos com micotoxinas são de difícil avaliação, devido à extensão de sua ocorrência e grande número de áreas afetadas.

Os dados de toxidades aguda em relação à ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas em seres humanos são raros. Porém, existem registros de uma hepatite epidêmica fatal, que ocorreu na Índia Ocidental, nos Estados de Gujarat e Rajastam, no outono de 1974, FAO-WHO-UNEP (1977). Aproximadamente 400 pessoas foram afetadas pela doença que apresentou uma taxa de mortalidade de 20%. Investigações posteriores revelaram que o milho, componente principal da alimentação das comunidades afetadas, estava altamente contaminado com aflatoxina, em concentrações de 0,25 a 15,6 mg/kg. As aflatoxinas também podem relacionar-se com uma doença aguda que envolve encefalopatias e degeneração gordurosa das víceras, a qual causa a morte de várias centenas de crianças por ano na Tailândia, FAO-WHO-UNEP (1977). Mortes de crianças devido a essa mesma causa também foram registradas na Tcheco-Eslováquia, FAO-WHO-UNEP (1977).

A resistência de microrganismos à ação de calor seco, ou seja, tratamento térmico em condições de atividade de água (a_w) menor que 1,0, constitui até há cerca de três décadas um campo de interesse muito limitado dentro do contexto da esterilização de alimentos. O problema estava principalmente afetando a área das indústrias farmacêuticas. 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 ainda seja res-

trito, pois o calor úmido é melhor bactericida que este, há necessidade de estudos com o mesmo, pois existem determinados produtos, os quais sofrem contaminação, e não podem ser esterilizados por calor úmido. Portanto, no presente trabalho procuramos fazer uma revisão, onde damos ênfase aos trabalhos relativos ao emprego de calor seco na inativação de esporos de fungos e bactérias de interesse na conservação de alimentos.

COLLIER e TOWNSEND (1955) estudaram o comportamento de esporos de PA 3675, Bacillus stearothermophilus 1518 e B. polymyxa em um sistema de enlatamento asséptico fabricado pela firma James Dole Engineering Company. No trabalho ficou evidenciado a variação de resistência de B. polymyxa e de B. stearothermophilus 1518 em função da umidade do meio de tratamento. Este trabalho praticamente desperta o interesse de pesquisadores para o estudo do comportamento de microrganismos sob tratamento térmico em ambiente de atividade de água menor que 1,0, ou umidade relativa menor que 100%.

PFLUG (1960) construiu um termoresistometro 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 experimentos. O valor D exato não pode ser calculado, sendo

a resistência expressa com LD₅₀ a 350°F (176,6°C).

MURREL e SCOTT (1966) trabalhando com Bacillus megaterium, B. stearothermophilus ATCC 7953, B. coagulans, Clostridium botulinum E ATCC 9564 C. botulinum B ATCC 7949 e C. bifermentans 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 B. 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 atividades de água.

PFEIL et alii (1967) empregaram esporos de Bacillus subtilis 5230 e Clostridium sporogenes PA 36 79-45 para estudar o efeito de gases (ar, He, N, O e CO₂) sobre a inativação térmica por calor seco. Os esporos eram inoculados em cadinhos de estanho (11 x 8 mm) e após secagem a vácuo a 25°C por 25 h, dez 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°C, 143,3°C, 148,9°C, 154,5°C e 160°C. A resistência de B. subtilis 2530 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°C, em função de seu valor "Z" maior. Os valores "D" são maiores em He e N para ambos os microrganismos.

mos, não influenciando o peso molecular na distribuição energética, nem mostrando o oxigênio, especial efeito inativador como anteriormente era suspeito.

HOFFMANN et alii (1968) pesquisaram a resistência de esporos de Bacillus subtilis var. niger condicionados antes do tratamento a 25⁰C por 48 horas em ambientes com 11%, 33% e 85% de umidade relativa. 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 (125⁰C, 135⁰C e 164⁰C) correspondia a uma aw 0,03. Nas condições experimentais não houve influência da atividade de água sobre a resistência durante o tratamento, contudo a aw do condicionamento teve influência marcante, apresentando os esporos mais úmidos, maior resistência térmica.

ANGELOTTI et alii (1968) publicaram um trabalho, considerado clássico no campo, com vistas ao estudo de problemas de descontaminação de veículos espaciais. As amostras foram tratadas em tubos TDT imersos em banho de silicone com temperatura de 105⁰C a 160⁰C. Em esporos equilibrados a diversas atividades de água, a maior resistência térmica detectada a 135⁰C foi a dos esporos equilibrados entre aw = 0,2 e aw = 0,4. Os esporos estudados eram de Bacillus subtilis var. niger.

Para estudar o efeito da temperatura e da velocidade de gases sobre a resistência térmica de esporos de B. subtilis 5230 FOX e PFLUG (1968) construíram um equipamento constituído de um bloco de alumínio provido de barras do mesmo metal deslizando como gavetas para o interior do bloco, e suportando cadinhos de estanho (11 mm de diâmetro x 8 mm de altura) que recebia a suspensão de esporos liofilizados. Arou nitrogênio escoando sobre as amostras tinham suas velocidades variadas em função da vazão dada em pe^3/min , não havendo controle da umidade dos gases.

Os autores encontraram dificuldades em recuperar os esporos após o tratamento, devido à fixação dos mesmos ao fundo dos cadinhos, determinando também uma diminuição da resistência com o aumento da vazão dos gases. Uma diferença de resistência devido à propriedade dos gases não foi claramente estabelecida. A 140°C detectaram uma fração de cerca de 1% da população, que apresentou resistência maior que o restante, sendo esta fração a considerada para os cálculos de "D".

BRUCH e SMITH (1968) trabalhando com esporos de Bacillus subtilis var. niger inoculados sobre pedaços de filme de Kapton e Teflon, verificaram que ocorriam divergências 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 divergência estaria relacionada com a atividade de água reinante no ambiente em que o esporo se encontrava.

No caso do filme de Kapton; este é permeável ao vapor d'água formado durante o processo, enquanto que no caso de Teflon este por ser impermeável permitia o aquecimento dos esporos em um ambiente de aw intermediária, dando assim alta resistência.

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 os diferentes "strains" obtidos de coleção de culturas, os valores de "D" encontrados a 87,8°C variavam de 4,8 min a 8,5 min, enquanto que para o "strain" original do suco, o valor de "D" encontrado foi de 11,3 minutos.

DRUMOND e PFLUG (1970) trabalhando com esporos de Bacillus subtilis conservados vários meses em etanol 95%, sendo depois lavados e em seguida congelados a - 10°C, descongelando-os no momento de uso, verificaram uma variação de resistência em amostras do mesmo lote, quando tratados em dias diferentes. As amostras eram incubadas em chapas de aço inox de 25,4 x 50,8 mm e posteriormente equilibrados a 2% e 89% de umidade relativa por 12 horas. A atividade de água era de 0,011 e 0,0034.

ALDERTON e SNELL (1970) estudaram a resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus NCA 1518 em ambientes com atividades de água intermediária ($a_w < 1,0$), utilizando tubos apropriados (TDT tubos) 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.

Os experimentos foram conduzidos às temperaturas de 125°C, 130°C, 135°C, 140°C, 145°C, 150°C, 154°C e 160°C, sendo a atividade de água 0,28.

Os autores determinaram que em $a_w = 1,0$ e $a_w = 0,0$, o valor "Z" do microrganismo é apenas função da temperatura, mas quando a atividade da água passa a ser função da temperatura, a dependência de "Z" é muito mais complexa.

A justificativa para trabalhar com $a_w = 0,28$, era de que em experimentos preliminares os esporos apresentaram maior resistência a essa atividade de água.

PITT e CHRISTIAN (1970) desenvolveram uma técnica, para estudo de resistência térmica de esporos de fungos. Os esporos eram aquecidos e subsequentemente incubados no mesmo meio. As temperaturas de aquecimento eram: 50, 60, 70, 75 e 80°C. Dos esporos testados, os que apresentaram maior resistência térmica foram: ascosporos de Asper-

gillus chevalieri, A. mangini e Xeromyces bisporus.

A curva de redução decimal para A. chevalieri apresentava um valor "Z" de 23⁰F e um F₁₈₀ de 2,2 min.

A atividade de água reinante no ambiente em que era incubado após tratamento foi de 0,98.

BOND et alii (1971) estudaram a resistência térmica de esporos de Bacillus sp ATCC 27380, coletados de amostra de solo de Cabo Kennedy, e verificaram serem esses esporos extremamente resistentes ao calor seco, sendo o valor D₁₂₅ = 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 era aplicada em tiras de aço (0,5 pol x 0,5 pol) para posterior tratamento.

BRANNEN e GARST (1972) usaram esporos de Bacillus subtilis var. niger para estudar a possibilidade de equacionar um modelo cinético incorporando a umidade relativa como um dos parâmetros. Tal modelo poderia ser útil na estimativa da esterilização de espaçonaves em ciclos de 115⁰C e 125⁰C, partindo de dados obtidos a 105⁰C. Foi usada estufa a 105⁰C 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 em temperaturas tais que após o aquecimento a 105⁰C, os valores deseja

dos eram obtidos.

Os esporos estocados em etanol 95% foram inoculados em discos de alumínio em 31,7 mm de diâmetro x 0,047 mm de espessura e recobertos por outro disco, sendo as menores resistências detectadas no intervalo de $a_w = 0,0002-0,0008$.

MICHENER e KING (1974) estudaram a resistência térmica de ascospores 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 e 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) publicaram os resultados de pesquisas de inativação, por calor seco, de esporos isolados do solo de dependências para montagem de veículos espaciais, no Centro Espacial de Cabo Kennedy. O equipamento usado foi estufa com volume de 0,016 m³ com recirculação de ar que a 25°C tinha UR = 30%. As temperaturas empregadas foram 105°C, 110°C, 115°C, 120°C 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.

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 folhas de polietileno, equilibrado por cerca de 12 horas e UR = 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.

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 de ativação (ΔF^*) para a 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 (ΔS^*) indicavam que a inativação se dava pelo rompimento de poucas liga

ções importantes para a atividade biológica, mas sem influência marcante na formação das moléculas envolvidas.

MOLIN e OSTLUND (1975) montaram um equipamento experimental para estudar o emprego de radiação infravermelho na esterilização por calor seco. O microrganismo empregado foi Bacillus subtilis ATCC 6333, inoculado em lâminulas de microscopia, 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 0,005. Nos valores baixos de atividade de água reinante, a resistência era função apenas da temperatura, porém, em todas as temperaturas foi detectada uma fração da população com resistência maior. Os autores atribuíram esta diferença na resistência à diferença fisiológica dos esporos no momento da coleta.

BOND e FAVERO (1975) estudando a resistência térmica de Bacillus, isolados do solo do Centro Espacial de 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 ($a_w < 0,01$) foi caracterizada por um valor D extremamente alto ($D = 54 \text{ h}$). Nas condições experimentadas a resistência foi uma função apenas da temperatura, tendo sido possível o cálculo de um $Z = 15^{\circ}\text{C}$.

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 CO₂. 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°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 diferente em ar e CO₂, em cada gás ela foi função apenas da temperatura e do teor de umidade dos esporos, sendo que o teor de umidade dos esporos foi de 37,2%, 13,8% e 5,0%.

VON SCHELHORN e 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 Byssochlamys fulva, sendo que foi usado H₂SO₄ e P₂O₅ 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 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 Byssochlamys fulva foi de 25 min a 0% de umidade relativa e temperatura de 120°C.

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

HAN (1977) estudou a resistência térmica de Bacillus subtilis var. niger ATCC 9372, B. stearothermophilus 1518, Clostridium sporogenes ATCC 19404 ao calor seco (120°C $a_w < 0,012$) e ao vapor superaquecido (120°C, $a_w = 0,51$), com e sem tratamento prévio com ácido paracético ou água oxigenada. Os esporos foram previamente condicionados por 48 h em ambiente de atividade de água 1,0; 0,76; 0,33 e 0,0. O equipamento utilizado foi descrito por PRADO FILHO e KIEFER (1974) com entrada adicional de vapor fluente. Em ar com atividade de água baixa (120°C, $a_w < 0,012$) esporos de B. subtilis var. niger ATCC 9372 apresentaram maior resistência que esporos de B. stearothermophilus 1518. Em vapor superaquecido (120°C, $a_w = 0,51$) 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 e PFLUG (1977) trabalhando com esporos de Bacillus subtilis var. niger pesquisaram o efeito sinérgico de tratamento térmico úmido e seco conjugados com radiação. As doses de radiação foram de 5,10 e 20 krad/h e as temperaturas em experimentos prévios variavam entre 76°C e 125°C em atividade de água variando de 0,25 a 0,82 nos tratamentos por calor seco. Os esporos eram inoculados em plaquetas de aço de 12,7 x 12,7 mm e equilibrados a $a_w = 0,5$ por 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 para esporos que apenas receberam tratamento térmico a 90°C, 105°C, 110°C e 125°C. Os autores estabeleceram um coeficiente de sinérgismo SI, o qual demonstrou que maiores efeitos sinérgicos são obtidos com o binômio calor seco-radiação (SI = 2,5) do que com o binômio calor úmido-radiação (SI = 1,5).

Também 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 P_2O_5 ou água em quantidade necessária para obter-se várias ativida-

des de água no ambiente, nas temperaturas desejadas. Em experimentos preliminares a 113⁰C e 125⁰C a aw variou de 0,0 a 1,0 e nos experimentos definitivos a 85⁰C, 90⁰C e 95⁰C, 100⁰C, 105⁰C e 120⁰C, aw < 0,01 e aw = 1,00. O aquecimento foi feito em banho de silicone, havendo necessidade de correção do tempo de aquecimento e resfriamento das latas.

MOLIN (1977 a) fez um estudo comparativo da resistência térmica de esporos do gênero Bacillus ao calor seco, empregando equipamento de radiação infra-vermelho (MOLIN e OSTLUND, 1975). Os microrganismos estudados foram: Bacillus cereus NCTB 9372, B. coagulans NCTB 9365; B. megaterium NCTB 9376, B. polimyxa 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 condicionados a 20-24⁰C e aw = 0,33 por 3-10 dias, foram tratados em temperaturas variando de 90⁰C a 180⁰C. Neste intervalo de temperatura, esporos de B. subtilis var. niger ATCC 9372, tiveram um valor "D" maior que para outros microrganismos. O autor verificou ainda que os valores de "Z" dependiam da capacidade de retenção de água pelo esporo.

Em outro trabalho, o mesmo autor (MOLIN, 1977b) usando o mesmo equipamento e esporos de Bacillus subtilis var. niger e Bacillus stearothermophilus, estudou a variação do valor "Z" em calor seco; em intervalos grandes de temperaturas. Para B. subtilis var. niger o gráfico de "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 $Z = 23^{\circ}\text{C}$ é constante. Para B. stearothermophilus, o gráfico é função linear entre 150°C e 180°C com $Z = 29^{\circ}\text{C}$, mas desvia-se da linearidade a temperaturas mais baixas, com decréscimo de valor Z . Se os esporos fossem previamente secos, Z , na faixa linear ($150^{\circ}\text{C} - 180^{\circ}\text{C}$), baixava para 23°C .

QUAST et alii (1977) utilizaram um equipamento asséptico marca DOLE para estudar a resistência térmica de esporos de Bacillus stearothermophilus 1518 ao vapor superaquecido. Nas temperaturas estudadas (152°C , $155,6^{\circ}\text{C}$, 159°C) 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 pesquisado.

RANK e 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 de Bacillus subtilis var. niger são mais resistentes ao calor seco, quando inoculados sobre a superfície de batata, do

que sobre superfície de metal. Após o inóculo sobre a superfície da batata e do metal, ambos eram equilibrados a 22°C com 50% de umidade relativa por 18 e 24 horas; para depois sofrerem o 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 reinante, no ar do forno, enquanto que no caso da batata, este ambiente que os cerca está com uma umidade mais baixa que a atmosfera reinante no ar, pois a água difunde continuamente da batata para o ar do forno.

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 1,2 mg H₂O/l e as temperaturas foram 105°C, 111,7°C, 130°C 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 isolados de espaçonaves, tem resistência menor ou no máximo igual a B. subtilis var. niger.

KING et alii (1979) estudaram a resistência térmica de Byssochlamys fulva nas temperaturas de 80; 85,2;

87,8; e 90°C. Os autores verificaram que em temperaturas baixas, um "ombro" precedia o período de inativação dos esporos. A medida que a temperatura aumentava, o "ombro" diminuía, e a curva de morte térmica aproximava-se de uma reta. O método utilizado para calcular a taxa de morte para B. fulva foi o mesmo utilizado por ALDERTON e SNELL (1970).

BAYNE e MICHENER (1979) trabalhando com esporos de Byssochlamys fulva, verificaram que para alguns "strains" ocorria uma maior resistência térmica em pH 5,0, quando em um meio definido. Para cálculo de taxa de morte, os autores usaram o método descrito por ALDERTON e SNELL (1970) e verificaram também que a taxa de morte não seguia uma ordem logarítmica.

A resistência térmica de esporos de Clostridium botulinum G 2A foi estudada por ALDERTON et alii (1980). Os esporos liofilizados foram submetidos a temperaturas de 125°C a 160°C em ambientes com atividades de água variando de 0,0 a 0,9. Os métodos de trabalho são os mesmos descritos em trabalhos anteriores (ALDERTON e SNELL, 1970). Os autores encontraram em $a_w = 0,1$ um valor "D" maior que em $a_w = 0,0$ e estabeleceram, que com a diminuição da umidade ambiental, a resistência do microrganismo cresce, apresentando a 130°C e $a_w = 0,4$ um $D = 24,4$ min.

REYES et alii (1981) pesquisaram a resistência térmica de Bacillus sp ck4-6, B. cereus, B. stearothermophilus NCA 1518, B. megatium HTCC 6458, B. subtilis var. ni-

ger, usando equipamento e manuseio de amostras propostos por PEELER et alii (1977).

A atividade de água no ambiente durante o tratamento variou de 0,001 a 1,00 e a temperatura variou de 100°C a 125°C. Para o B. subtilis var. niger ATCC 9372 verificou-se um $F = 19,4$ h a $a_w = 0,07$ e para Bacillus sp ck4-6 um $F = 99,4$ h a $a_w = 0,01 - 0,07$. 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 Bacillus subtilis var. niger ATCC 9372 sendo que as temperaturas empregadas no tratamento foram: 100°C, 110°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C e 160°C. O método utilizado consistia de inóculo em 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 verificou que a maior resistência térmica ocorria quando a temperatura era de 130°C e $a_w = 0,355$, tendo encontrado um $D = 123,7$ minutos para esporos inoculados diretamente de suspensão aquosa e $D = 149,8$ minutos 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 (1983) pesquisaram o efeito da 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 incremento de 10°C. Eles verificaram que para temperatura acima de 50°C e umidade relativa variando entre 30 e 70%, havia pouca influência, sobre o valor D. Testes verificados com umidade relativa baixa (10 a 30%), mostravam um valor de "D" alto. Determinaram D = 15,0 min a 30°C e 60% UR e D = 1,1 min a 70°C e 60% UR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item será descrita a montagem do equipamento de tratamento térmico, assim como apresentado os cálculos relativos a esse equipamento, e os métodos microbiológicos empregados.

3.1. Material

3.1.1. Equipamento para tratamento térmico de esporos

O equipamento consta basicamente de um filtro de ar, o qual permite regulagem de velocidade; de um saturador, de um banho termostatizado com recirculação da solução através de uma bomba; um umidificador; uma secção tubular de ajustagem da temperatura do ar, portanto, da atividade de água do mesmo, e de uma câmara de tratamento de esporo.

A secção tubular e a câmara de tratamento foram protegidas por resistências externas de aquecimento, as quais geravam calor quando acionadas, funcionando assim como uma "blindagem térmica", evitando a necessidade de um isolamento mais pesado. A ausência dessa "blindagem térmica" poderia fazer com que houvesse perda de calor através da secção tubular e da câmara de tratamento, e também evitar que em temperaturas altas, o tempo necessário para que o equipamento atingisse a temperatura necessária fosse demasiadamente longo.

Para o controle das voltagens das "blindagens térmicas", foram usados reguladores marca KELDIAN. Para aquecimento do ar na secção tubular, foram usados reguladores da marca VARIVOLT. A Figura 1 mostra um esquema simplificado do conjunto, cujos componentes são descritos a seguir.

3.1.1.1. Filtro de ar

O filtro utilizado foi o de marca DEVILBISS, com capacidade para 50 pés/min, tendo uma pressão de linha de 250 lb/pol² e pressão máxima regulada de 135 lb/pol². Esse filtro tinha a finalidade de controlar a velocidade, e permitir que o ar que passa pelo menos seja livre de impurezas, tais como, gotículas de óleo, gotículas de água, etc. Durante o experimento, o filtro trabalhou com uma pressão de 40 lb/pol², sendo que a velocidade de ar foi regulada de

Figura 1 - Esquema geral do equipamento montado

tal maneira que na câmara de tratamento tínhamos uma velocidade de 3,1 a 3,5 m/s.

3.1.1.2. Saturador

Foi construído de tubo de PVC, de 4 pol(101,6 mm) de diâmetro, tendo 400 mm de altura.

O saturador possuía $3/4$ de seu volume preenchido com anéis de Raschig de 25 mm, destinados a melhorar a superfície de troca entre a fase líquida e gás (YOSHIDA e TANAKA, 1951; MULTON et alii, 1971). O ar penetra através da base do saturador, sendo essa admissão feita através de uma válvula; passando em seguida por uma placa de PVC perfurada, a qual toma toda área da seção circular, que sustenta os anéis de Raschig. O saturador possuía uma solução de NaCl, a qual fornecia uma atividade de água de 0,75 e que era colocada até um nível que encobrisse os anéis de Raschig.

Foi necessário colocar um outro tubo do mesmo diâmetro e altura acoplado ao saturador por meio de luva, para evitar que o ar carregasse consigo gotículas da solução. A saída do ar do saturador era feita por um tubo de PVC de $1/2$ polegada (12,7 mm) de diâmetro, colocado no centro da tampa superior do saturador.

A Figura 2 mostra o esquema do saturador, sendo que o mesmo pode ser visto na Foto 1.

3.1.1.3. Umidificador

O umidificador foi construído também em tubo de PVC de 4 polegadas (101,6 mm) de diâmetro, possuindo 400 mm de altura.. Ele possuía em seu interior esferas de vidro, as quais tinham por objetivo permitir um maior contato entre as fases líquida e gasosa.FOUST et alii (1975). Assim, como no saturador, 3/4 do volume era ocupado por essas esferas, cujo diâmetro era de aproximadamente 17 mm. A entrada do ar no umidificador era feita lateralmente, a 100 mm da base, enquanto que a saída era através de uma luva de redução de 4 polegadas (101,6 mm) para 3 polegadas (76,2 mm) de diâmetro ajustada ao topo do umidificador. Na base inferior do umidificador, era retirada a solução saturada de NaCl, passando em seguida pelo banho termostatizado a 30°C, sendo então bombeada de volta para o topo do umidificador. A solução era admitida ao umidificador por meio de um tubo perfurado de cobre de 10 mm de diâmetro, situado a 100 mm abaixo da redução, o qual aspergia a mesma na corrente de ar que fluía no umidificador.

Um tubo de 3 polegadas (76,2 mm) de diâmetro e 400 mm de altura era conectado ao umidificador através da luva de redução, e fazia a conexão do mesmo à seção tubular de ajustagem da temperatura. Esse tubo possuía em seu interior meias circunferências de PVC, separadas uma da outra por uma distância de 50 mm e colocadas opostas uma a outra formando uma chicana. O espaço entre as meias circunferências

era preenchido por lã de vidro, para evitar que o ar carregasse solução de NaCl. As meias circunferências eram presas por uma barra de ferro, totalmente preenchida de rosca. Esse tubo era acoplado ao cotovelo da secção tubular de ajustagem de temperatura por meio de uma flange fundida em latão.

As Figuras 3 e 4 mostram o esquema do umidificador e do tubo contendo as chicanas. Sendo que os mesmos podem ser vistos nas Fotos 2 e 3.

3.1.1.3.1. Banho termostatizado

O banho termostatizado usado era o de marca LAUDA modelo WB-20, controlado por relês eletrônicos marca LAUDA modelos R 2U e R 20/2 e termômetro de resistência de platina de 100 ohm a 0°C, como sensor.

3.1.1.4. Secção de aquecimento

A secção de aquecimento utilizada no experimento, que compreende a secção tubular, as resistências internas de aquecimento, bem como, o cotovelo que une o umificador à secção de aquecimento, foi descrita por PRADO FILHO (1982) sendo que os componentes da mesma podem ser vistos nas Fotos 4, 5 e 6. A Foto 7 mostra os suportes e a disposição das resistências de aquecimento nos mesmos.

Figura 2 - Esquema do Saturador (sem escala)

Figura 3 - Esquema do Umidificador (sem escala)

Figura 4 - Filtro com chicana (sem escala)

3.1.1.5. Câmara de tratamento de conidiosporos

A câmara utilizada, foi aquela que PRADO FILHO (1982) usou em seu experimento para determinar a resistência térmica de B. subtilis var. niger ATCC 9372.

As Fotos 8 e 9 mostram a disposição da câmara de tratamento, bem como, a conexão afunilada que faz a união secção tubular de aquecimento - câmara de tratamento.

A Figura 5 mostra o esquema do suporte no qual a amostra a ser tratada era depositada.

3.1.1.6. Sistema de medição de temperatura

A medição das temperaturas nos pontos de interesse foi feita por termoelementos constituído de fios níquel - cromo - níquel - (Ni-Cr-Ni) marca DEGUSSA de 0,2 mm de diâmetro, soldado por fusão em chama de oxigênio - acetileno, tendo gelo fundente acondicionado em frasco de DEWARD como temperatura de referência.

Os termoelementos foram aferidos contra termômetro padrão ASTM com correção térmica da coluna de mercúrio emergente, construindo-se gráficos dos valores mV versus temperatura em $^{\circ}\text{C}$, para o intervalo de 10°C - 175°C .

Figura 5 - Suporte da lâmina portadora de esporos (medidos em mm)

A aferição foi feita em banho de óleo mineral, utilizando-se um termostato marca LAUDA modelo WB-20, controlado por relês eletrônicos marca LAUDA R 2U e R 20/2 e termômetro de resistência de platina de 100 ohm a 0^o, como sensor. Os registros gráficos das temperaturas expressas em mV foram feitos por registrador da PHILIPS modelo PM 8235 de doze canais.

Durante os experimentos as temperaturas de tratamento foram medidas por termoelementos posicionados cerca de 5 mm à frente da amostra, sem tocar as paredes da câmara. A Foto 10 mostra a montagem do equipamento para a aferição dos termoelementos.

3.1.1.7. Sistema de controle de temperatura

Os ajustes de temperatura nas "blindagens térmicas" da secção de aquecimento e da câmara de tratamento eram feitos utilizando-se reostato de marca KELDIAM.

Os ajustes de diversas temperaturas de ar na secção de aquecimento durante os tratamentos eram feitos por dois sistemas distintos. Um constituído pela resistência interna de 750 W de potência controlado por reostato VARIVOLT e o outro constituído por outra resistência interna de 500 W controlado por outro reostato marca VARIVOLT.

Foto 1 - Saturador montado

Foto 2 - Umidificador

Foto 3 - Filtro com chicanas

Foto 4 - Vista geral do aparelho montado

Foto 5 - Secção de aquecimento sem blindagem térmica, conexão afunilada e cotovelo de união secção de aquecimento - Filtro do umidificador.
Fonte: PRADO FILHO (1982).

Foto 6 - Secção de aquecimento com blindagem térmica.
Fonte: PRADO FILHO (1982).

Foto 7 - Resistências internas de aquecimento do ar.
Fonte: PRADO FILHO (1982).

Foto 8 - Câmara de tratamento montada.
Fonte: PRADO FILHO (1982)

Foto 9 - Câmara de tratamento (aberta, sem chapa de blindagem térmica frontal).
Fonte: PRADO FILHO (1982).

Foto 10 - Montagem do equipamento para aferição dos termoelementos.

3.1.2. Microrganismo estudado

O microrganismo estudado e que serviu para teste de equipamento montado foi o Aspergillus parasiticus 403 da coleção do Instituto de Tecnologia de Alimentos, cedido pela Doutora Mirtha Nelly Uboldi Eiroa. Esta cepa de fungo esporulado é produtora de aflatoxina B₁ e G₁, sendo que inexistem trabalhos, que se referem à sua resistência térmica.

3.1.3. Meio de cultura empregado

Para a produção e contagem de conídiosporos viáveis após tratamento térmico foi usado o meio CZAPECK, citado por THOM e RAPER (1945), sendo que o método utilizado foi o de Diluição e Plaqueamento. No caso da lâmina testemunha era feita contagem através de diluição e plaqueamento e através de lâmina de Neubauer.

3.2. Métodos

3.2.1. Cálculos

Para confirmação do funcionamento do equipamento montado no sistema de aquecimento e resfriamentos instantâneos das amostras, foram feitos cálculos descritos a seguir.

Para calcular-se a velocidade de aquecimento de um corpo mergulhado em um fluido, deve-se conhecer vários dados básicos. No caso presente, o primeiro dado necessário foi a velocidade do ar dentro da câmara nas diversas temperaturas estabelecidas de tratamento. Foi fixada a velocidade

do ar como 3 m/s, a qual permitia que o tratamento fosse feito, sem que se carregasse o material depositado nas lâminas (suspensão de conídiosporos previamente secos).

3.2.2. Cálculos dos tempos de aquecimento das lâminas portadoras de conídiosporos

Através de experimentos prévios, feito com um anemômetro técnico marca DWYER, as velocidades do ar na câmara de tratamento foram fixadas em 3 m/s e 4 m/s, sendo calculado a partir dessas velocidades os números de REYNOLDS - Re, considerando o comprimento da lâmina portadora de conídiosporos como comprimento de referência e as temperaturas entre 50°C e 120°C.

$$Re = \frac{v \cdot L}{\nu}$$

v = velocidade do fluido
 ν = viscosidade cinemática
 L = comprimento de referência

Os números de Reynolds calculados para a velocidade fixada são mostrados na Tabela 1.

Os valores da Tabela 1 mostram que nas condições propostas não era atingido o valor crítico $Re > 10^4$. Portanto, para o cálculo do número de NUSSELT - Nu - pode ser empregada a equação proposta por LONCIN (1969) para fluxo laminar.

$$Nu = 0,664 Re^{1/2} Pr^{1/3}$$

Nu = número de NUSSELT
 Re = número de REYNOLDS
 Pr = número de PRANDT

Os números de PRANDT utilizados nos cálculos de Nu foram obtidos através da fórmula

$$Pr = \frac{c_p \cdot \mu}{K}$$

c_p = calor específico
 μ = viscosidade absoluta
 K = condutividade térmica

A partir dos valores citados por KREITH(1973) para ar aquecido. Os valores calculados para $Re^{1/2}$, $Pr^{1/3}$ e Nu para as condições propostas são apresentados na Tabela 2.

Como o número de Nu é definido por

$$Nu = \frac{h \cdot L}{K}$$

h = coeficiente de transmissão de calor
 L = comprimento da lâmina
 K = condutibilidade térmica do ar superaquecido

Rearranjando a equação citada podemos isolar h , que é o fator indispensável nos cálculos de velocidade de aquecimento de corpos mergulhados em fluidos mais quentes que os mesmos.

$$h = \frac{Nu \cdot K}{L}$$

Tomando-se os valores de K para ar superaquecido, tabelados em SILVA (1972), calculamos os valores de h nas temperaturas supra citadas, as quais são apresentadas na Tabela 3.

O tempo de aquecimento de um corpo, mergulhado em um fluido de temperatura maior e constante, pode ser calculado por mais de um tipo de equação. O tipo de equação a ser utilizado é ditado por características do próprio corpo a aquecer.

O número de BIOT-BI - que estabelece a relação entre a resistência interna e a externa de um corpo, condiciona o tipo de equação a ser empregada no cálculo do tempo de aquecimento desse mesmo corpo.

$$Bi = \frac{h \cdot L}{K}$$

h = coeficiente de transmissão de calor e a uma temperatura considerada

K = condutibilidade térmica do alumínio

L = comprimento característico do corpo, igual volume/área

No caso da lâmina de alumínio portadora de esporos, tínhamos para a temperatura de 100°C (212°F).

$$Bi_I = \frac{0,0027414 \times 3,281 \times 10^{-5}}{3,3055 \times 10^{-2}} = 2,72 \times 10^{-6}$$

$$Bi_{II} = \frac{0,0031822 \times 3,281 \times 10^{-5}}{3,3055 \times 10^{-2}} = 3,78 \times 10^{-6}$$

Portanto, $Bi \ll 0,1$

Ficou evidenciado que para as demais temperaturas a serem consideradas, Bi seria sempre menor que 0,1. Esta evidência permitiu no cálculo do tempo de aquecimento da

lâmina o emprego da seguinte equação proposta por KREITH (1973):

$$\frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}} = e^{-(Bi) (Fo)}$$

onde temos:

T = temperatura a ser atingida pelo corpo após decorrido o tempo θ

T_0 = temperatura do corpo no tempo $\theta = 0$, isto é, no início do processo de aquecimento

T_{∞} = temperatura do fluido tomada distante do corpo a aquecer

Bi = número de BIOT

Fo = número de FOURIER

o número de FOURIER é definido como

$$Fo = \frac{K \theta}{c_p \rho \cdot L^2}$$

K = condutibilidade térmica do corpo a aquecer

c_p = calor específico do corpo

ρ = densidade do corpo

L = comprimento característico

θ = tempo.

Portanto:

$$(Bi) (Fo) = \frac{h \cdot L \cdot K \theta}{K \cdot c_p \cdot L^2}$$

Simplificando e rearranjando a equação anterior podemos isolar o tempo θ

$$\theta = \frac{(Bi) (Fo) cp. \rho. L}{h}$$

O valor do produto $(Bi) (Fo)$ em função da razão adimensional $T - T_{\infty}/T_0 - T_{\infty}$ é determinável por solução gráfica apresentada por KREITH (1973).

Para que a solução gráfica de $(Bi) (Fo)$ seja aplicável, o termo $T - T_{\infty}$ deve ser diferente de zero. Escolhemos $0,1^{\circ}\text{C}$, como valor limite suficiente, e a temperatura inicial $T_0 = 30^{\circ}\text{C}$.

Segundo a linha de cálculo indicada acima, os tempos de aquecimento calculados para a lâmina de alumínio portadora de conídiosporos, são os que podem ser vistos na Tabela 4.

3.2.3. Cálculo dos tempos de resfriamento da lâmina portadora de conídiosporos após o tratamento térmico

Para o cálculo do tempo de resfriamento da lâmina portadora de conídiosporos após o tratamento térmico, temos que considerar transmissão de calor por convecção natural, enquanto que na fase de aquecimento a convecção é forçada.

Na convecção natural a força que move o fluido é o empuxo devido à diferença de densidade causada por diferenças de temperaturas dentro do mesmo. Quando o empuxo é a única força motora, a velocidade de deslocamento do fluido é determinada inteiramente pelas grandezas contidas no número de GRASHOF - Gr, sendo o número de REYNOLDS supérfluo.

O número de GRASHOF é definido como:

$$Gr = \frac{g \cdot \beta \cdot L^3 \rho^2 \Delta T}{\mu^2} \quad \text{onde,}$$

g = aceleração da gravidade

β = coeficiente de expansão do fluido

L = comprimento do corpo

ρ = densidade do fluido

μ = viscosidade do fluido

ΔT = temperatura do corpo mergulhado menos temperatura do fluido $T - T_{\infty}$

Os valores das grandezas envolvidas na determinação de Gr devem ser tomadas a temperatura média $\frac{T - T_{\infty}}{2}$

Na convecção natural o escoamento é laminar até valores $Gr \leq 10^8$, no intervalo $10^8 \leq Gr \leq 10^{10}$ o escoamento é intermediário, tornando-se turbulento quando $Gr > 10^{10}$.

Para o cálculo do coeficiente de transmissão de valor no sistema laminar - fluido, podemos usar a equação de ECKERT, citada por KREITH (1973) para um Nu localizado.

$$Nu = 0,508 \left(\frac{Pr^2}{0,952 Pr} \cdot Gr Pr \right)^{1/4}$$

ou a solução gráfica que fornece Nu médio como função do produto $Gr \cdot Pr$ calculado na região laminar pela equação:

$$Nu = 0,555 (Gr \cdot Pr)^{1/4}$$

Esta solução apontada por KREITH (1973) foi mais interessante no caso em discussão.

Como já foi visto

$$Nu = \frac{h \cdot L}{K} \quad \text{sendo,}$$

h = coeficiente de transmissão de calor

L = comprimento do corpo

K = condutibilidade térmica do fluido

Desta equação podemos isolar o coeficiente médio de transmissão de calor h da lâmina para a água fria. Os valores de h são apresentados na Tabela 5.

Para calcular h tivemos que estabelecer uma temperatura para a água que recebia as lâminas aquecidas, após o término do tratamento térmico. Por ser facilmente atingível em refrigerador, sem maiores cuidados, consideramos uma temperatura de 10°C como satisfatória.

Sob esta condição pré-fixada, os valores calculados do tempo de aquecimento, foi necessário determinar a grandeza do número de BIOT para o processo de resfriamento.

$$Bi = \frac{\bar{h} L}{K}$$

$\bar{h}$ = coeficiente médio de transmissão de calor

L = comprimento característico do corpo, igual a volume/área

K = condutibilidade térmica do alumínio.

No caso da lâmina de alumínio no processo de resfriamento com uma temperatura inicial de 100°C e 10°C na água de resfriamento, temos:

$$Bi = \frac{0,0023011 \times 3,281 \times 10^{-5}}{3,3055 \times 10^{-2}} = 2,28 \times 10^{-6}, \text{ portanto, } Bi < 0,1$$

Evidentemente, para as demais temperaturas no presente processo de resfriamento, Bi foi sempre menor que 0,1, o que nos permitiu empregar no cálculo do tempo de resfriamento a já conhecida equação:

$$\frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}} = e^{-(Bi)(Fo)} \quad \text{onde,}$$

T = temperatura a ser atingida pelo corpo após decorrido o tempo θ

T_0 = temperatura do corpo no tempo $\theta = 0$, isto é, no início do processo de resfriamento

T_{∞} = temperatura do fluido, fixada no caso em 10°C

Bi = número de BIOT

Fo = número de FOURIER

Para o cálculo do tempo de resfriamento da lâmina portadora de conidiosporos, fixamos $T = 25^{\circ}\text{C}$, como

uma que não seria prejudicial aos conídiosporos, já danificados no tratamento térmico.

Então, tínhamos o caso em que, embora a temperatura do fluido fosse bem menor, só interessava o tempo necessário para a lâmina atingir a temperatura estabelecida como não mais vital aos conídiosporos eventualmente sobreviventes, $T = 25^{\circ}\text{C}$, e não o tempo necessário para igualar a temperatura àquela do fluido, $T = 100^{\circ}\text{C}$.

Dando à equação

$$\frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}} = e^{-(Bi)(Fo)}$$

empregada no processo de resfriamento, o mesmo encaminhamento que lhe foi dado no processo de aquecimento obtivemos os tempos de resfriamento apresentados na Tabela 6.

Por meio de experimentação foi determinado que o tempo máximo necessário para que a amostra atingisse a água, após a abertura do sistema de introdução, foi sempre menor que 1,5 segundos, descendo a menos de 1,0 segundo com treinamento. Por esse motivo, foi estabelecido 1,0 segundo como média de correção do tempo de resfriamento, caso tal correção do tempo se fizesse necessária.

É preciso frisar que durante esse tempo de transferência, a amostra já começou a esfriar. Portanto, 1,0 segundo em caso de correção já oferecia boa margem de segurança.

3.2.4. Produção de conidiosporos

Os conidiosporos foram produzidos em placas de Petri, utilizando o meio CZAPECK. As placas com meio de cultura eram inoculadas com o microrganismo e incubadas em estufa a 28⁰C por uma semana. Os conidiosporos eram então retirados das placas através de uma leve agitação das mesmas com 5 a 10 ml de uma solução 0,1% de detergente TRITON x -100. Após a agitação, o material era recolhido em tubo.

O volume total foi centrifugado (2.100 G por 5 minutos) separando-se a massa de conidiosporos. O precipitado era retornado em 5-7 ml de água destilada e de novo centrifugado. Essa operação foi repetida mais duas vezes, sendo que a temperatura não ultrapassou a 10⁰C durante toda a lavagem dos conidiosporos. Executada a última centrifugação, os conidiosporos foram suspensos em cerca de 5 ml de solução TRITON X-100 e estocados a cerca de 5⁰C até sua utilização.

3.2.5. Preparação das amostras para tratamento

A preparação de cada amostra para tratamento era feita imediatamente antes do início do mesmo, e seguia o método descrito a seguir:

Cinco lâminas de alumínio medindo 10x15x0,02mm, fixadas em suportes de arame descritos por PRADO FILHO(1982)

eram colocadas em placas de Petri, apoiadas em canaleta de alumínio para não rolar e o conjunto era esterilizado por calor seco a 180°C por 3 horas.

A suspensão de conidiosporos do microrganismo testado era agitada vigorosamente para homogeneização e com o emprego de uma pipeta de Pasteur marca SCIENTIFIC PRODUCTS código P5205-2 designação ASTM E 438-71, era depositado rapidamente uma gota de suspensão em cada lâmina.

A seguir, a placa de Petri era transferida para a estufa a vácuo com pressão residual à cerca de 100 milibares até que a água da gota evaporasse, deixando, contudo, os conidiosporos ainda reunidos. Neste ponto, admitia-se ar filtrado em algodão para a quebra de vácuo.

Das lâminas prontas, três eram tratadas, uma era de reserva e uma usada para determinação do número inicial de conidiosporos viáveis antes do tratamento térmico.

3.2.6. Condições de tratamento

As temperaturas programadas de trabalho foram: 50° , 60° , 70° , 80° , 90° , 100° , 105° , 110° , 115° e 120°C .

A atividade de água nas temperaturas citadas foram calculadas através de carta psicrométrica, sendo conhecido inicialmente a temperatura do ar e a umidade relativa desse ar. Como foi planejado inicialmente trabalhar com uma

condição a mais próxima da ambiental, a temperatura do ar era de 30°C e a sua umidade relativa 75%, umidade essa verificada através de temperatura de bulbo úmido e de bulbo seco.

3.2.7. Tratamento das amostras

Escolhida a temperatura em que seria efetuado o experimento, o equipamento era acionado para que atingisse o equilíbrio.

Atingidas as condições desejadas, com o auxílio de uma pinça flambada, era tomado um suporte com a lâmina respectiva, e o mesmo colocado na face superior da barra do sistema de introdução de amostra o qual só era aberto neste instante. A amostra era posicionada de modo que a lâmina portadora de conidiosporos permanecesse na horizontal. Imediatamente o sistema era fechado e acionado um cronômetro elétrico com marcação em segundos, e o interruptor e impressão do registrador.

De trinta a quarenta segundos antes do término do tratamento, era posicionado um tubo na saída do sistema de transferência para receber a amostra tratada, terminando o período estabelecido de tratamento, era aberto o sistema de introdução e o suporte empurrado para a entrada do sistema de transferência, por meio de cabeçote de chapa de alumínio fixado embaixo da câmara.

3.2.8. Manuseio das amostras após o tratamento

Terminado o tratamento e transferência da amostra, a mesma era recebida em tubo resfriado de 10 a 15°C, contendo 10 ml de uma solução TRITON X-100 a 0,01% em água e contendo cerca de 0,5 g de areia lavada, com granulação menor que malha 100 TYLER.

Após um intervalo de 15-20 minutos, por meio de agitação vigorosa, os conidiosporos aderidos à lâmina eram suspensos no líquido. A seguir, eram feitas diluições consecutivas em tubos com 9 ml de solução de TRITON X-100 sem conter areia, cada diluição era plaqueada em triplicata em meio CZAPECK e incubada a 28°C por 48 horas.

3.2.9. Amostras tratadas

Para a determinação da resistência térmica pelo cálculo de D, que é o número de unidades de tempo para reduzir 90% dos esporos viáveis de uma população tratada a uma temperatura fixa qualquer, foi empregada a fórmula:

$$D = \frac{t}{\log a - \log b} \quad \text{citada por STUMBO (1973).}$$

t = tempo total de tratamento da amostra à temperatura escolhida

a = número de conidiosporos no início do tratamento

b = número de conidiosporos viáveis no fim do tratamento.

Para aplicação da fórmula citada, foi tomado como número inicial de esporos, o total germinado da lâmina de alumínio testemunha, número esse que não diferia da contagem feita por lâmina de Neubauer. O número inicial de esporos para cada temperatura pode ser visto na Tabela 9.

A Tabela 7 mostra os valores encontrados para "D", bem como as condições observadas para a obtenção desses valores.

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em dois sub-
itens, sendo um sub-item relativo ao aparelho construído e
o outro relacionado com a resistência térmica dos conidiospo-
ros de Aspergillus parasiticus 403.

4.1. Resultados relativos aos cálculos dos tempos de aque- cimento e resfriamento da lâmina portadora de coni- diosporos

Tabela 1 - Número de REYNOLDS calculados para o ar fluindo na câmara de tratamento

Temperatura na Câmara de Tratamento °C	$Re_I \times 10^{-3}$	$Re_{II} \times 10^{-3}$
50	2,50	3,34
60	2,38	3,18
70	2,26	3,01
80	2,15	2,87
90	2,06	2,74
100	1,96	2,61
105	1,90	2,54
110	1,87	2,49
115	1,82	2,43
120	1,78	2,33

Obs.: $Re_I \times 10^{-3}$ - Para velocidade de 3 m/s (9,843 ft/s)

$Re_{II} \times 10^{-3}$ - Para velocidade de 4 m/s (13,124 ft/s)

Tabela 2 - Valores de $Re^{1/2}$, $Pr^{1/3}$ e Nu no âmbito de temperatura de trabalho do equipamento

Temperatura na Câmara de Tratamento °C	$Re_I^{1/2}$	$Re_{II}^{1/2}$	$Pr^{1/3}$	Nu_I	Nu_{II}
50	50,00	57,79	0,89628	29,75	34,39
60	48,78	56,39	0,89628	29,03	33,56
70	47,53	54,86	0,89628	28,29	32,65
80	46,36	53,57	0,89628	27,59	31,88
90	45,38	52,34	0,89628	28,01	31,15
100	44,27	51,08	0,89628	26,34	30,40
105	43,60	50,39	0,89628	25,94	29,98
110	43,24	49,89	0,89628	25,73	29,69
115	42,65	49,29	0,89628	25,38	29,33
120	42,19	48,27	0,89628	25,10	29,03

Tabela 3 - Valores calculados para o coeficiente de transmissão de calor h , no processo de aquecimento da lâmina portadora de esporos

Temperatura na Câmara de Tratamento $^{\circ}\text{C}$	h na interface-lâmina ($\text{Btu}/\text{ft}^2\text{ }^{\circ}\text{F}$)	
	h_I	h_{II}
60	0,0028209	0,0031822
100	0,0027414	0,0031639
120	0,0027143	0,0031393

Tabela 4 - Velocidades calculadas de aquecimento da lâmina portadora de esporos com temperatura inicial $T_0 = 30^{\circ}\text{C}$, sendo $\text{Bi} \ll 0,1$

T_{∞} em $^{\circ}\text{C}$	T em $^{\circ}\text{C}$	$\frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}}$	$(\text{Bi})(\text{Fo})$	θ_I em segundos	θ_{II} segundos
60	59,9	0,0033	5,7	2,6	2,3
100	99,9	0,00143	6,6	3,1	2,7
120	119,9	0,00111	6,8	3,2	2,7

Tabela 5 - Valores calculados para o coeficiente médio de transmissão de calor $\bar{h}$ na fase de resfriamento da lâmina portadora de esporos. Cálculos com $T_{\infty} = 10^{\circ}\text{C}$ (50°F)

Temperatura na Câmara de Tratamento $^{\circ}\text{C}$	Gr.Pr	Nu	$\bar{h}$ para a interface-lâmina/água Btu/s ft^2 $^{\circ}\text{F}$
60	$1,87 \times 10^6$	20,51	0,0019864
100	$2,52 \times 10^6$	22,11	0,0023011
140	$2,73 \times 10^6$	22,55	0,0024386

Tabela 6 - Velocidades calculadas de resfriamento da lâmina portadora de esporos até a temperatura não letal $T = 25^{\circ}\text{C}$ sendo $\text{Bi} \ll 0,1$

T_{∞} $^{\circ}\text{C}$	T_0	$\frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}}$	$(\text{Bi})(\text{Fo})$	θ em segundos
10	60	0,300	1,4	0,91
10	100	0,166	1,9	1,07
10	120	0,136	2,2	1,18

4.2. Resultados relacionados ao estudo da resistência térmica de conidiosporos de *Aspergillus parasiticus* 403

Tabela 7 - Condições de temperaturas, atividade de água reinante nos experimentos e valores D calculados

Temperatura de Tratamento °C	Tempo de tratamento de cada amostra segundo	Atividade de água no experimento	Valor D médio (p/ fórmula)
50	1.200	0,270	*
60	1.200	0,160	*
70	900	0,105	*
80	900	0,068	*
90	900	0,046	*
100	3.600	0,032	29,67
105	3.000	0,027	20,79
110	3.000	0,0211	10,23
115	1.800	0,019	6,97
120	600	0,017	**

* Não houve redução no tempo de tratamento.

** Não houve viáveis.

Tabela 8 - Tempos de redução decimal - D, de esporos de Aspergillus parasiticus 403

Temperatura de Tratamento °C	Atividade de água	Tempo de redução decimal (minutos)	
		Calculado por $D = \frac{t}{\log a - \log b}$	Calculado pela equação de mínimos quadrados
100	0,032	29,67	24
105	0,027	20,79	22,5
110	0,024	10,23	11,5
115	0,016	6,97	9,0

Tabela 9 - Contagens médias de conidiosporos inoculados nas lâminas

Temperatura de Tratamento °C	Conidiosporos contados em placa (Testemunha)
50	$4,5 \times 10^7$
60	$3,9 \times 10^7$
70	$1,0 \times 10^7$
80	$9,1 \times 10^6$
90	$1,1 \times 10^7$
100	$2,5 \times 10^7$
105	$1,9 \times 10^7$
110	$1,1 \times 10^7$
115	$4,4 \times 10^7$
120	$3,3 \times 10^7$

Gráfico 1 - Tempo de redução decimal de conidiosporos de A. parasiticus 403, tratados com ar superaquecido a $t = 100^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,032$.

Gráfico 2 - Tempo de redução decimal de conidiosporos de *A. parasiticus* 403, tratados com ar superaquecido a $t = 105^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,027$

Gráfico 3 - Tempo de redução decimal de conidiosporos de A. parasiticus 403 tratados com ar superaquecido a $t = 110^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,024$.

Gráfico 4 - Tempo de redução decimal de conidiosporos de *A. parasiticus* 403, tratados com ar superaquecido a $t = 115^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0,019$.

Gráfico 5 - Curva de morte térmica

5. DISCUSSÃO

5.1. Equipamento montado

Os cálculos dos parâmetros envolvidos no cálculo do tempo de aquecimento e resfriamento da lâmina portadora de esporos foram feitos após instalado o equipamento planejado e determinada sua característica básica, que era o fornecimento de ar a uma velocidade fixa, com uma atividade de água constante.

A escolha da velocidade do ar variando entre 3 m/s a 4 m/s, era necessária para que não houvesse perda de conidiosporos durante o tratamento.

Diversas particularidades do funcionamento do equipamento não eram previsíveis "a priori", e só foram constatadas durante o transcorrer dos experimentos.

Um primeiro problema observado foi que o ar carregava consigo "vapor" de NaCl. Esse problema foi sanado através do acoplamento entre o umidificador e o cotovelo (ligado à secção de aquecimento) de um filtro contendo em seu interior "chicanas" juntamente com lã de vidro nos espaços entre uma chicana e outra.

Outra particularidade observada experimentalmente foi a não necessidade de medir-se a temperatura antes e depois da lâmina portadora de conidiosporos com o equipamento de medição utilizado, pois não foram detectadas diferenças de temperatura entre dois pontos situados no local de tratamento da amostra e distante 30 mm um do outro. Por esse motivo as temperaturas foram medidas apenas à frente da lâmina, a uma distância de 4 a 7 mm.

Outro detalhe importante observado experimentalmente diz respeito às temperaturas das paredes da secção de aquecimento e da câmara de tratamento. Não havia necessidade de procurar-se igualar estas temperaturas àsquelas de tratamento. Diferenças de cerca de 10°C abaixo das temperaturas de tratamento foram plenamente aceitáveis.

Com base nos tempos calculados para resfriamento das lâminas, foi evidenciado experimentalmente que à exceção dos tratamentos de curta duração, nos demais as lâminas portadoras podiam ser transferidas para os tubos receptores após o tratamento simplesmente com pinça flamba-

da, sem passar pelo sistema de transferência, o que com algum treino consome cerca de 2 segundos no máximo.

Através dos cálculos indicados na secção 3.2.1. e cujos resultados podem ser vistos nas Tabelas 1, 2 e 3, chegamos aos tempos de aquecimento mostrados na Tabela 4.

Esses tempos são evidentemente calculados, não tendo sido viável sua medição prática de maneira confiável. Um termoelemento encostado a uma lâmina portadora, não apresentava bom contato, além de serem as massas e superfícies diferentes daquelas usadas nos cálculos, o mesmo era válido para um termoelemento colocado entre duas lâminas.

KREITH (1973) afirma que a precisão de cálculos de transmissão de calor não é melhor que 20%.

Os tempos de aquecimento calculados e mostrados na Tabela 4, mesmo considerando um desvio maior que 20%, não influenciam de maneira considerável os valores de D apresentados na Tabela 7. Contudo, tempos de tratamento mais curtos podem ser influenciados mais marcadamente.

Não foi necessário fazer correções nos tempos de tratamentos, pois essas correções eram pequenas, diante dos menores tempos de tratamentos empregados. Também podemos fazer as mesmas considerações com relação ao tempo de resfriamento mostrados na Tabela 6, sendo que os

mesmos não foram utilizados para quaisquer correções dos valores D encontrados.

Pelos cálculos efetuados fica evidenciado matematicamente, que o equipamento montado no presente trabalho, pode ser empregado seguramente para experimentos envolvendo outros microrganismos, com a finalidade de determinar a inativação térmica em ambiente de $a_w < 1,0$.

5.2. Experimentos de Resistência Térmica

Para uma análise a respeito dos resultados obtidos nos experimentos realizados, faz-se necessário considerar possíveis parâmetros que influenciaram a obtenção dos valores "D", bem como do valor "Z" encontrado para o microrganismo em questão.

Devido a inexistência de trabalhos semelhantes na literatura pesquisada, os dados obtidos têm um valor relativo, servindo como ponto de partida, para estudos mais abrangentes sobre a resistência térmica de esporos A. parasiticus.

Apesar das populações iniciais nos diversos experimentos serem originárias de mais de uma suspensão de conidiosporos, suas variações são relativamente pequenas, como pode ser visto pela Tabela 9. o que permite considerar os valores D encontrados, como expressão média da resistên-

cia térmica de Aspergillus parasiticus 403 nas condições experimentadas.

Os valores D a temperaturas baixas não puderam ser determinados em vista de não ter havido reduções das populações no tempo empregado para tratamento. Provavelmente estes valores D são bem maiores que o calculado para 100°C. Contudo, uma extrapolação direta dos valores D a partir da reta calculada para determinação de "Z" (Gráfico 5) pode levar a erros bastante notáveis, uma vez que com o abaixamento da temperatura aumenta o valor de aw da corrente de ar.

A atuação conjunta do binômio temperatura-atividade de água sobre uma população com resistência térmica não uniforme pode levar ao aparecimento de resultados aleatórios, como foi constatado por COLLIER e TOWNSEND (1956), QUAST et alii (1956) e PRADO FILHO (1977) em esporos do gênero Bacillus.

O emprego de um valor "Z" para extrapolação só é viável quando o valor de aw é mantido abaixo de um valor crítico como foi preconizado por MOLIN (1977a). Este fenômeno está bem caracterizado nos trabalhos de PRADO FILHO (1975b, 1982) nos quais esporos de B. subtilis var. niger ATCC 9372 comportam-se completamente diferente em corrente de ar e CO₂ secos, e em corrente de vapor superaquecidos. Neste último caso, houve variação de aw com o aumento da temperatura, o que tornou totalmente inviável o cálculo de um valor

"Z" nos padrões tradicionais.

Pelos motivos supracitados é possível que o valor D a 120°C seja menor que o que seria esperado pelo desenvolvimento normal do valor "Z", determinado entre 100 e 115°C. Embora tal fato não tenha sido citado para Aspergillus parasiticus, MOLIN (1977b) cita variação do valor "Z" para Bacillus stearothermophilus em função da umidade reinante durante o tratamento térmico.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado para a faixa de temperatura inferior a 100°C. Um abaixamento da temperatura corresponde a um aumento da aw, sendo esperada uma maior eficiência do tratamento com calor mais úmido, contudo a temperatura baixa pode anular essa eficiência.

Para esporos de bactérias, a faixa de maior resistência térmica situa-se entre $aw = 0,2$ e $aw = 0,4$, e VON SCHELHORN e HEISS (1975) citam o mesmo fenômeno para conidiosporos de Aspergillus niger e clamidiosporos de Humicola fuscoatra, para os quais, aliás, os valores "Z" são completamente distintos, 12°C e 28°C, respectivamente.

Outros fatores podem influir sobre a resistência térmica de esporos, causando irregularidades na determinação dos valores "D" e "Z". Dentre eles podem ser destacados: o efeito da concentração da população testada (COLLIER e TOWNSEND, 1956; MOLIN e ÖSTLUND, 1976); ativação e inativação simultâneas (HAN, 1977); diferenças na relação constante de

ativação/constante de inativação a diferentes temperaturas (HERRMANN et alii, 1978); não homogeneidade das populações tratadas (SHULL et alii, 1963; EDWARD et alii, 1965; ALDER-TON e SNELL, 1970; OTDA, 1970; BERG e SANDINE, 1970; BOND et alii, 1971; ADAMS e BUSTA, 1972; STUMBO, 1973; PULEO et alii, 1975; MOLIN e ÜSTLUND, 1975; SHARPE e BEKTASH, 1977; PEELER et alii, 1977; PULEO et alii, 1978); diferentes mecanismos de ativação a baixas e altas temperaturas (BERG e SANDINE, 1970; ADAMS e BUSTA, 1972); eficiência diferente na ativação por choque térmico úmido e seco (FOX e EDER, 1969); condicionamento prévio intencional ou acidental (PRADO FILHO, 1975b; REYS et alii, 1981; PRADO FILHO, 1982).

Em vista dos numerosos fatores que influem na resistência térmica, algumas considerações devem ser feitas a respeito dos resultados obtidos no presente trabalho.

Em ordem de grandeza, há uma concordância razoável entre os valores D encontrados pela fórmula

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

e pela reta dos quadrados mínimos, como pode ser visto pela Tabela 8. Contudo, os valores calculados pela fórmula estão mais sujeitos a desvios.

A presença de fenômenos de ativação e inativação simultâneas, causadores de "ombros", bem como frações da população com resistências diferentes, não são detecta -

dos e alguns casos podem levar a desvios sérios como os citados por PRADO FILHO (1982).

No caso específico de conidiosporos de fungos, mais uma limitação é imposta pelo tamanho dos mesmos.

Segundo PRADO FILHO (1975b), para que represente uma média satisfatória da resistência da população, é necessário que o "D" calculado seja resultante de uma redução de no mínimo 5 potências de 10 na placa inoculada. No caso de bactérias é possível inocular as placas com até 10^9 esporos, sem que haja despreendimento dos esporos durante o manuseio e tratamento, o que permite contagens confiáveis nas diluições menores.

Já no caso do fungo estudado é mais difícil conseguir valores tão altos de conidiosporos em uma simples gota, e o máximo conseguido de conidiosporos em uma lâmina, sem perdas no manuseio e tratamento, foi 10^7 conidiosporos.

Outra desvantagem do emprego da fórmula, é a necessidade de conhecer a população inicial através de contagem microscópica ou em placa. No presente trabalho, contudo, este problema não apareceu, tendo havido concordância em ordem de grandeza entre as contagens em placas e microscópio.

O cálculo de valor D por meio de uma reta de quadrados mínimos apresenta algumas vantagens. Não há

necessidade de uma contagem da população inicial, se houver uniformidade de inóculo, permite visualizar a ocorrência de fenômenos de ativação e inativação simultâneos, bem como a presença de frações mais resistentes na população tratada. Neste caso é vantajoso considerar a resistência da população como igual àquela da fração mais resistente, o que em eventuais aplicações práticas constitui um fator de segurança.

A principal desvantagem do método reside na maior exigência em trabalho e material.

Nas condições experimentais do presente trabalho, o prolongamento das retas de mínimos quadrados interceptam as ordenadas em valores de y_0 igual a menores que o número médio de conidiosporos inoculados, não sendo aparentes, portanto, fenômenos de ativação e inativação simultâneos.

A 100°C (Gráfico 1) o prolongamento da reta de mínimos quadrados mostra um y_0 praticamente igual ao número inicial de conidiosporos inoculados. O alto valor do coeficiente de correlação ($r = -0,91793$) reforça estatisticamente a exatidão do valor $D = 24$ min como expressão da resistência média dos conidiosporos de Aspergillus parasiticus 403. Nas condições estudadas, nas quais não houve indícios de fenômenos de ativação e inativação simultâneos, nem da presença de fração mais resistente.

Já a 105, 110 e 115⁰C (Gráficos 2, 3 e 4) os valores de D_0 menores que os números médios dos conidiosporos inoculados mostram a presença típica de duas frações de resistências médias diferentes, sendo quantificada apenas a mais resistente.

Embora não relatado especificamente para A. parasiticus 403, a presença de frações resistentes foi detectada em pesquisas com o gênero Bacillus por diversos autores (VAZ e PROSZT, 1957; ANGELOTTI et alii, 1968; LEVINSON e HYATT, 1971; BOND et alii, 1971; REYNOLDS et alii, 1974; MOLIN e ØSTLUND, 1975; ORDONES e BURGOS, 1976; PULEO et alii, 1978; PRADO FILHO, 1982). A fração resistente dentro de uma população não é quantitativamente igual em todas as temperaturas, mas é a resistência dessa fração que deve ser considerada quando dá eventual aplicação prática de resultados de pesquisa.

Em vista da deficiência das pesquisas no campo da inativação térmica de esporos de fungos, os valores encontrados no presente trabalho não podem ser comparados, devendo ser considerados como expressão da resistência térmica de conidiosporos de Aspergillus parasiticus 403 na faixa de temperaturas testadas.

O valor $Z = 32^0\text{C}$ calculado para o microrganismo em estudo tem um valor relativo, podendo ser válido apenas em espaço muito limitado de temperatura, o que é

comprovado pelo fato de a 120°C o valor D não ter podido ser determinado nas condições testadas. A validade limitada do valor "Z" também foi constatada por LICCIARDELLO e NICKERSON (1963), EDWARD JR. et alii (1965, ANGELOTTI et alii (1968), FOX e PFLUG (1968), HOFFMANN et alii (1968), FOX e EDER (1969), BURTON et alii (1977), DAUDIN e CERF (1977), JONSSON et alii (1977) e MOLIN (1977b).

Em vista do que foi exposto e da limitação (exigüidade) de dados sobre a destruição térmica de esporos fúngicos por calor seco, a transposição direta de resultados de pesquisa para uma eventual aplicação prática deve ser encarada com cuidados especiais. Fatores ambientais como superfícies diferentes, gordura, umidade, etc, podem causar em esporos na natureza, respostas diferentes daquelas obtidas com esporos produzidos em laboratório sob condições mais controladas.

A exposição mais ou menos prolongada a fatores ambientais diferentes - um acondicionamento natural, pode causar sensível variação na resistência térmica de esporos em geral. Este fato foi constatado em diversas pesquisas (MURREL e SCOTT, 1966; FOX e PFLUG, 1968; ANGELOTTI et alii, 1968; HOFFMAN et alii, 1968; SOPER e DAVIES, 1963; PRADO FILHO, 1975b; MOLIN, 1977; KOOIMAN e JOCOBS, 1977; REYES et alii, 1981; PRADO FILHO, 1982).

Deste modo os valores D encontrados no presente trabalho para conidiosporos de A. parasiticus 403 servem como parâmetros básicos para eventuais futuros estudos sobre o assunto.

6. CONCLUSÕES

6.1. Equipamento

6.1.1. O equipamento satisfaz os objetivos propostos para sua montagem, funcionando segundo o princípio de aquecimento e resfriamento instantâneos e possibilitando o ajuste de uma UR desejada na corrente de ar de tratamento.

6.1.2. A variação da solução salina saturada permite uma variação limitada da atividade de água nas temperaturas de tratamento.

6.1.3. O tempo máximo calculado de aquecimento da amostra, na faixa 50 - 120°C, é de 3,2 segundos para um fluxo de 3 m/s e 2,7 segundos, para um fluxo de 4 m/s.

6.1.4. O tempo máximo calculado de resfriamento da amostra até 25°C é menor que 2,2 segundos, incluindo-se o tempo de transferência do canal da câmara de tratamento para a solução resfriadora.

6.2. Microrganismo estudado

6.2.1. Conidiosporos de Aspergillus parasiticus 403 mostraram as seguintes resistências térmicas nas condições experimentadas:

100°C e $a_w = 0,032$	$D = 29,67 \text{ min};$
105°C e $a_w = 0,027$	$D = 20,79 \text{ min};$
110°C e $a_w = 0,024$	$D = 10,23 \text{ min};$
115°C e $a_w = 0,019$	$D = 6,97 \text{ min}.$

6.2.2. A resistência térmica expressa em termos de valor "D", pode ser mais seguramente avaliada pelo emprego de retas de mínimos quadrados, cujos coeficientes de correlação mostraram alta dependência do número de conidiosporos viáveis, como função do tempo de tratamento, dentro do âmbito 100 - 115°C. A fórmula $D = \frac{t}{\log a - \log b}$ tem uso limitado, não permitindo a constatação de fenômenos de ativação e inativação simultâneos ou a eventual presença de frações de resistências médias diferentes.

6.2.3. Nas temperaturas de 105°C , 110°C e 115°C , os conidiosporos de Aspergillus parasiticus 403 apresentaram duas frações de resistências médias diferentes. As frações mais resistentes da população nas três temperaturas, representando em média são: 20% da população a 105°C , 20% a 110°C e 5% a 115°C .

6.2.4. O valor $Z = 32^{\circ}\text{C}$ calculado a partir dos valores D das retas de mínimos quadrados, não é válido para âmbitos amplos de temperatura, e a extrapolação de resultados de pesquisas para uma eventual aplicação prática pode ocasionar desvios sérios dos resultados.

7. LITERATURA CITADA

ADAMS, D.M. e BUSTA, F.F., 1972. Ultrahigh temperature activation of a low-temperature Bacillus subtilis spore germination system. Applied Microbiology, Washington, 24:418-23.

ALDERTON, G. e SNELL, N., 1970. Chemical states of bacterial spores; heat resistance and its kinetics of intermediate water activity. Applied Microbiology, Washington, 19: 562-72.

ALDERTON, G. et alii, 1980. Heat resistance of the chemical resistance forms of Clostridium botulinum 62 A spores over the water activity range 0 to 0.9. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 30:511-15.

ANGELOTTI, R. et alii, 1968. Influence of spore moisture content of the dry-heat resistance of Bacillus subtilis var. niger. Applied Microbiology. Washington, 15:735-45.

BAYNE, H.G. e MICHENER, H.D., 1979. Heat resistance of Byssosclamyces ascospores. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 37:449-53.

BERG, R.W. e SANDINE, W.E., 1970. Activation of bacterial spore. A review. Journal Milk Food Technology. Ames, Iowa, 33:435-41.

BOND, W.W. e FAVERO, M.S., 1975. Thermal profile of a Bacillus species (ATCC 27380) extremely resistance to dry heat. Applied Microbiology, Washington, 29:859-60.

BOND, W.W. et alii, 1971. Relative frequency distribution of D_{125} values for spores isolates from Mariner-Mars 1969 space craft. Applied Microbiology, Washington, 21:832-36.

BRANNEN, J.R. e GARST, D.M., 1972. Dry heat inactivation of Bacillus subtilis var. niger spores as a function of relative humidity. Applied Microbiology. Washington, 23:1125-30.

BRUCH, K.M. SMITH, W.F., 1968. Dry heat resistance of spores of Bacillus subtilis var. niger on Kapton and Teflon film at high temperatures. Applied Microbiology. Washington, 16:1841-46.

- BURTON, H. et alii, 1977. Thermal death kinetics of Bacillus stearothermophilus spores at ultrahigh temperature . Relationship between data from capillary tube experiments and from UHT sterilizers. Journal Food Technology. Oxford, 12:149-161.
- COLLIER, C.P. e TOWNSEND, T., 1956. The resistance of bacterial spore to superheated steam. Food Technology, Chicago, 10:477-81.
- DAUDIM, J.D. e CERF, O., 1977. Influence of chocs thermiques sur la destruction des spores bacteriennes par la chaleur. Lebensur-wiss und Technol. Zurich, 10:203-207.
- DRUMOND, D.W. e PFLUG, I.J., 1970. Dry-heat destruction of Bacillus subtilis on surfaces-effect of humidity in an open system. Applied Microbiology, Washington, 20:805-9.
- EDWARD Jr., J.L. et alii, 1965. Thermal inactivation characteristics of Bacillus subtilis spores at ultra-high temperatures. Applied Microbiology, Washington, 13:851-57.
- EMBOG, C., 1974. Inactivation of dried bacteria and bacterial spores by means of gamma-irradiation at high temperature. Applied Microbiology, Washington, 27:830-3.
- FAO - WHO - UNEP., 1977. Conference of Mycotoxins. Nairobi, Kenya, 19-27.

- FISHER, D.A. e PFLUG, I.J., 1977. Effect of combined heat and radiation on microbial destruction. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 33:1170-6.
- FOX, K. e EDER, B., 1969. Comparison of survivor curves of Bacillus subtilis spores subjected to wet and dry heat. Journal Food Science. Chicago, 34:518.
- FOX, K. e PFLUG, I.J., 1968. Effect of temperature and gas velocity on the dry-heat destruction rate of bacterial spores. Applied Microbiology, Washington, 16:343-8.
- FOUST, A.S. Coord. 1975. Princípios de operaciones unitárias. México, Compañía Editorial Continental S.A., 704p.
- HAN-BONG-HO. 1977. Abtötung von mikroorganismen auf festen oberflächcn. Karlsruhe, Fakultät für chemieingenieurwesen, Univ. (TH.) Karlsruhe, 90p. (Tese de Doutorado).
- HERMANN, J. et alii. 1978. Zur kinetic der temperaturabhängigkeit der Hrtzaktivierung u.-enaktivierung von bacteriensporen als Folgereaktion. Die Nahrung. Berlin, 22:89-99.
- HOFFMAN, R.K. et alii, 1968. Effect of cell moisture on the thermal inactivation rate of bacterial spores. Applied Microbiology, Washington, 16:1240-41.

- JONSSON, V. et alii, 1977. Testing two models for the temperature dependence of the heat inactivation rate of Bacillus stearothermophilus spores. Journal Food Science. Chicago, 42:1251-63.
- KING Jr., A.D. et alii, 1968. Control of Byssochlamys and related heat-resistance fungi in grape products. Applied Microbiology. Washington, 18:166-173.
- KING Jr., A.D. et alii, 1979. Non logarithmic death rate calculation for B. fulva and other microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 37:596-600.
- KOOIMAN, W.J. e JACOBS, R.P.W.M., 1977. The heat resistance of B. subtilis, 1-12 in relation to the water activity during pre equilibration and during exposure to heat. In: BARKER, A.N. ed. Spore Research, London, Academic Press, p.477-85.
- KREITH, F. 1973. Princípios de transmissão de calor. São Paulo. Edgard Blücher. 650p.
- LEVINSON, H.S. e HYATT, M.T. 1971. Distribution and correlation of events during thermal inactivation of Bacillus megaterium spores. Journal Bacteriology, Baltimore, 108:111-121.

- LICCIARDELLO, J.J. e NICKERSON, J.T.R., 1963. Some observations on bacterial thermal death time curve. Applied Microbiology Washington, 11:476-80.
- LONCIN, M. 1969. Die Grundlagen der verfahrenstechnik in der Lebensmittelindustrie. Frankfurt am Main, Sauerlander p. 976.
- MICHENER, D.H. e KING Jr., A.D., 1974. Preparation of free heat-resistance ascospores from Byssochlamys asci. Applied Microbiology, Washington, 27:671-73.
- MOLIN, G., 1977. Inherent genetic differences in dry heat resistance of some Bacillus spores. In: BARKER, A.N. et alii ed. Spore Research, London, Academic Press., p.487-500.
- MOLIN, G., 1977b. Inactivation of Bacillus subtilis spores in dry system at low and high temperatures. Journal General Microbiology. London, 101:227-31.
- MOLIN, G. e ÖSTLUND, K., 1975. Dry-heat inactivation of Bacillus subtilis spores by means of infra-red heating. Antonie von Leeuwonhaek, Amsterdam, 41:329-335.
- MOLIN, G. e ÖSTLUND, K. 1976. Dry-heat inactivation of Bacillus subtilis var. niger spores with special reference to spore density. Canadian Journal Microbiology. Ottawa, 22:359-63.

- MULTON, J.L. et alii, 1977. Méthode rapide de détermination des isothermes de sorption de l'eau par les solides. Lebensun-wiss und Technol. Zurich, 4:184-89.
- MYRREL, W.G. e SCOTT, W.J., 1966. The heat resistance of bacterial spores at various water activities. Journal General Microbiology. London, 43:411-25.
- ORDONES, J.A. e BURGOS, J., 1976. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of Bacillus spores. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 32:183-4.
- OXBORROW, G.S. et alii, 1983. Effects of temperature and relative humidity on biological indicators used for ethylene oxide sterilization. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 45:546-49.
- PEELER, J.T. et alii, 1977. Thermal resistance of Bacillus subtilis var. niger in a closed system. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 33:52-58.
- PFLUG, I.J., 1960. Thermal resistance of microorganisms to dry heat design of apparatus, operational problems and preliminary results. Food Technology, Chicago, 14:483-87.
- PHEIL, C.G. et alii, 1967. Effect of various gas atmospheres on destruction of microorganisms in dry heat. Applied Microbiology. Washington, 15:120-124.

- PITT, J.T. e CHRISTIAN, J.M.B., 1970. Heat resistance of xerophilic fungi based on microscopical assessment of spores survival. Applied Microbiology. Washington, 20:682-86.
- PRADO FILHO, L.G. 1975a. Estudo dos parâmetros termodinâmicos da inativação de esporos de Bacillus subtilis var. niger por calor seco. Revista Brasileira de Tecnologia, Brasília, 6:77-82.
- PRADO FILHO, L.G. 1975b. Die thermische Abtötung von sporen von Bacillus subtilis var. niger ATCC 9372 in Gasphasen mit einer wasseraktivität $< 1,0$. Lebensin-wiss und technol. Zurich, 7:29-33.
- PRADO FILHO, L.G., 1982. Resistência de esporos de Bacillus subtilis var. niger ATCC 9372 ao tratamento por vapor superaquecido. Montagem de equipamento específico e ensaios. Piracicaba, ESALQ/USP, 125p. (Tese de Livre-Docência).
- PRADO FILHO, L.G. e KIEFER, P., 1974. Versuchsanlage zur thermischen Behandlug von Bakteriensporen in gasen mit einer wasseraktivität 1.0. Lebensin-wiss und technol. Zurich, 7:255-6.
- PULEO, J,R. et alii, 1975. Method for collecting naturally occurring airborne bacterial spores for determining their thermal resistance. Applied Microbiology. Washington, 30:786-90.

PULEO, J.R. et alii, 1978. Thermal resistance of naturally occurring airborne bacterial spores. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 36:473-9.

QUAST, D.G. et alii, 1977. Death of Bacillus stearothermophilus 1518 spores on can covers exposed to superheated steam in a dole aseptic canning system. Lebensun-wiss und Technol. Zurich, 10:198-202.

RANK, E. e PFLUG, I.J., 1977. Dry heat destruction of spores on metal surfaces and on potatoes during baking. Journal of Food Protection. Ames, 40:608-13.

REYES, A.L. et alii, 1981. Heat resistance of Bacillus spres at various relative humidity. Applied and Environmental Microbiology. Washington, 42:692-7.

REYNOLDS, M.C. et alii, 1974. Thermoradition inactivation of naturally occurring bacterial spores in soil. Applied Microbiology. Washington, 28:406-410.

ROEMER, G.B., 1975. Herssluftsterilisation. Deutsche Med. Wochensch. Sttutgart, 100:709-10.

SENHAJI, A.F., 1977. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria II. Journal Food Technology. Oxford, 12:217-20.

- SHARPE, K. e BEKTASH, R.M., 1977. Heterogenity and the modelling of bacterial spore death, the case of contennosh, decreasing death rate. Canadian Journal Microbiology. Ottawa, 23:1501-7.
- SHULL, J.J. et alii, 1963. Kinectics of heat activation and thermal depth of bacterial spores. Applied Microbiology Washington, 11:485-7.
- SILVA, R.B., 1972. Manual de termodinâmica e transmissão de calor. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo.
- SOPER, J.C. e DAVIES, D.J.G., 1973. The effect of rehydration and oxygen on the heat resistance of high vacuum treated spores. Journal Applied Bacteriology. London, 36:119-30.
- SPICHER, G. e PETER, J., 1978. Anwendung eines neues verfahrens zur Berechnung und Beschreibung der Widenstand fähigkeit mikrobiologischer Indikatoren I - Untersuchungen an einigen gebrächlichen mikrobiologischen sterilisation indikatoren. Zentralblatt bakteriol. parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I, Abt. B. Stuttgart, 167:63-82.
- SPIEGEL, M.R., 194 . Estatística. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil. 580p.

STUMBO, C.R., 1973. Thermobacteriology in Food Processing.

New York, Academic Press, 3259.

TODA, K., 1970. Studies on heat sterilization VIII - Complex reaction model for heat inactivation of bacterial spores.

Journal Ferment. Technol. Japan, 48:511-18.

THOM, C. e RAPER, K., 1945. A manual of Aspergilli. Baltimore, The William and Wilkins Co.

YOSHIDA, F. e TANAKA, T., 1951. Air-water contact operations in a packed column. Industrial and Engineering Chemistry,

Washington. 43:1467-73.

VAZ, K. e PROSZT, G., 1957. Observations on the heat destruction of spores of Bacillus cereus. Journal Applied Bacteriology.

London, 21:431-41.

VON SCHELHORN, M.L. e HEISS, R. 1975. The influence of relative humidity on the thermal resistance of mould spores.

In: Water Relation of Food. Edited by R.B. DUCKWORTH,

Academic Press. Inc. London, 726p.