

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO DE FILME DE POLIETILENO
COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Claudio Fernandes Cardoso
ENGENHEIRO DE ALIMENTOS

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
ORIENTADOR

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C179a Cardoso, Claudio Fernandes
Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta / Cláudio Fernandes Cardoso. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: José de Assis Fonseca Faria
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Esterilização. 2. Polietileno de baixa densidade. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Radiação ultravioleta. 5. Bacillus subtilis. I. Faria, José de Assis Fonseca. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Sterilization evaluation of low density polyethylene film with hydrogen peroxide and ultraviolet radiation

Palavras-chave em inglês (Keywords): Sterilization, Low density polyethylene, Hydrogen peroxide, Ultraviolet radiation, Bacillus subtilis

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: José de Assis Fonseca Faria
Rodrigo Rodrigues Petrus
Carlos Alberto Rodrigues Anjos
Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

(Orientador)

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus

(Membro)

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos

(Membro)

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

(Membro)

“Errar é humano, mas quando a borracha se gasta mais do que o lápis, você está positivamente exagerando.”

J. Jenkis

“No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

Para Altamiro, Lúcia e Eduardo, pais e irmão, razões da minha vida;

Para Danielle, pelo carinho, presença e ajuda de grande valia;

Com especial carinho dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de todas as coisas;

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso;

Ao Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria pela amizade, pela transmissão de conhecimentos fundamentais para a realização do trabalho e pela confiança em mim depositada;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus, pela atenção, pelas sugestões e esclarecimentos de dúvidas;

Aos Profs. Drs. Carlos Alberto Rodrigues Anjos e Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pelas sugestões;

Ao amigo Eduardo (o Coco), meu braço direito, o agradecimento especial pela presença constante durante a elaboração e desenvolvimento do trabalho, ajuda imprescindível sem a qual este seria muito mais difícil;

À amiga Luciene Nishi (a Lu), por me escutar, pela ajuda nos cálculos dos processamentos, pelo apoio e amizade;

Aos funcionários da FEA

Alice Shiosawa, Adauto, Bernadete, Ana Lourdes, Bete, Renata, Marlene e Ana Maria, pela colaboração, apoio técnico indispensável em todos os momentos e pela paciência;

Aos colegas e amigos Caiçara, Otávio, Lucielen, Tati, Raquel, Leila, Batavo, Camila, Lu Esper, Vanessa, Sergio, Carol, Luciana, Gaby, Guilherme, Georgiana, Gustavo, Marina, Lauro, Marcio Scucuglia e Zé Henrique;

À todos os colegas que participaram das análises sensoriais;

À Laura Abreu da Embrapa Amazônia Oriental, pelas sugestões e esclarecimento de dúvidas quanto as metodologias empregadas;

À Peróxidos do Brasil Ltda, representada pelo Afonso Matsura, pelo fornecimento de materiais e informações técnicas;

À Johnson Diversy, representada pela Carolina Annunziato;

À Sumá Indústria e Comércio Ltda, representada pelo Paulo;

À Phipils do Brasil Ltda, pelo fornecimento das lâmpadas UVC;

À Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos e reserva técnica concedida.

À todos que de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente para a execução desta pesquisa.

“...e o bom de viver é estar vivo, ter irmãos, ter amigos vivendo em paz e prontos pra lutar...”

MUITO OBRIGADO.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMO.....	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Sistemas assépticos.....	9
2.2. Esterilização comercial do produto	12
2.3. Áreas limpas	13
2.4. Embalagens plásticas para sistemas assépticos	14
2.5. Contaminação de embalagens	16
2.6. Esterilização de embalagens.....	17
2.7. Testes de esterilidade	21
2.8. Agentes químicos de esterilização	21
2.8.1. Peróxido de hidrogênio	22
2.8.2. Ácido peracético	26
2.8.3. Ácido peroctanóico	29
2.8.4. Toxicidade dos compostos peroxigenados.....	30
2.9. Agentes físicos de esterilização	30
2.9.1. Radiação ultravioleta (UV)	30
2.9.2. Mecanismo de ação da radiação ultravioleta	31
2.10. Efeito do sinergismo da radiação UV e do H ₂ O ₂	32

2.11. <i>Bacillus subtilis</i>	33
2.12. Verificação da eficácia de esterilizantes	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. MATERIAL	36
3.1.1. Material de embalagem.....	36
3.1.2. Solução de esterilização	36
3.1.3. Sistema de esterilização e envasadora.....	36
3.1.4. Microrganismo de inoculação.....	40
3.1.5. Lâmpada Ultravioleta	40
3.1.6. Enzima catalase para neutralização.....	40
3.1.7. Água mineral.....	40
3.2. MÉTODOS	40
3.2.1. Experimento 1 – Avaliação da influencia de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem.....	41
3.2.1.1. Caracterização do material.....	43
3.2.1.2. Preparo e análise das soluções de H ₂ O ₂	43
3.2.2. Tratamentos.....	43
3.2.3. Determinações experimentais.....	44
3.2.3.1. Teste de integridade da embalagem	44
3.2.3.2. Teste de resistência da embalagem à compressão	44
3.2.3.3. Análise da impressão da embalagem.....	45
3.2.3.4. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio	45
3.2.4. Planejamento e análise estatística.....	46
3.2.5. Experimento 2 – Avaliação da eficácia do H ₂ O ₂ e da radiação UV na esterilização de filme de PEBD inoculado com <i>Bacillus subtilis</i>	46
3.2.5.1. Planejamento experimental	46

3.2.5.2. Planejamento fatorial completo.....	47
3.2.5.3. Preparo da suspensão de esporos	48
3.2.5.4. Esterilização das superfícies-teste de PEBD	49
3.2.5.5. Inoculação das superfícies-teste de PEBD	53
3.2.5.6. Tratamento das superfícies-teste de PEBD	53
3.2.5.7. Preparo da solução de recuperação	54
3.2.5.8. Quantificação de esporos sobreviventes	54
3.2.5.9. Preparo e análise das soluções de peróxido de hidrogênio	55
3.2.5.10. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio	55
3.2.5.11. Verificação da atividade da solução de recuperação	55
3.2.5.12. Testes de identificação do <i>Bacillus subtilis</i>	56
3.2.5.13. Teste da evaporação do etanol	56
3.2.6. Intensidade da radiação ultravioleta.....	56
3.2.7. Análise estatística dos dados.....	57
3.2.3. Experimento 3 – Avaliação sensorial	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Experimento 1 – Avaliação da influência de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem	59
4.1.2. Caracterização do material de embalagem	59
4.1.3. Preparo e análise das soluções esterilizantes.....	59
4.1.4. Efeito dos tratamentos	62
4.1.5. Teste de integridade das embalagens	63
4.1.6. Teste de resistência da embalagem a compressão	63
4.1.7. Análise da impressão da embalagem	71
4.1.8. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio no produto.....	72

4.2. Experimento 2 – Avaliação da eficácia do H ₂ O ₂ e da radiação UV na esterilização de filme de PEBD inoculado com <i>Bacillus subtilis</i>	74
4.2.1. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio	88
4.2.2. Verificação da atividade do neutralizante	89
4.2.3. Testes de identificação do <i>Bacillus subtilis</i>	89
4.2.4. Teste para verificação de evaporação do etanol	90
4.2.5. Intensidade da radiação ultravioleta.....	91
4.3. Experimento 3 – Avaliação sensorial.....	92
5. CONCLUSÕES	95
6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
7. ANEXOS	110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Meios empregados no tratamento de esterilização de embalagens.....	20
Tabela 2 – Valores D para diferentes concentrações e temperaturas do H ₂ O ₂	26
Tabela 3 - Valores de D para diferentes concentrações e temperaturas de ácido peracético.....	29
Tabela 4 – Interação esporocida da irradiação UV e do H ₂ O ₂	32
Tabela 5 – Delineamento das variáveis do planejamento fatorial completo 2 ³	47
Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³	48
Tabela 7 – Espessura e gramatura do filme de PEBD.....	59
Tabela 8 – Concentração de H ₂ O ₂ no banho de imersão durante o tratamento químico com 5% de H ₂ O ₂	60
Tabela 9 – Concentração de H ₂ O ₂ no banho de imersão durante o tratamento químico com 15% de H ₂ O ₂	60
Tabela 10 – Concentração de H ₂ O ₂ no banho de imersão durante o tratamento químico com 25% de H ₂ O ₂	61
Tabela 11 – Concentração de H ₂ O ₂ no banho de imersão durante o tratamento químico com 35% de H ₂ O ₂	61
Tabela 12 – Opacidade (%) de embalagens tratadas quimicamente com H ₂ O ₂	71
Tabela 13 – Opacidade de embalagens para os tratamentos combinados de H ₂ O ₂ com radiação UV.....	72
Tabela 14 – Residual de H ₂ O ₂ (mg/L) em embalagens tratadas quimicamente com H ₂ O ₂	73

Tabela 15 – Residual de H ₂ O ₂ (mg/L) em embalagens tratadas pela combinação de H ₂ O ₂ e radiação UV.....	73
Tabela 16 – Influência dos tratamentos químicos com H ₂ O ₂ sobre a descontaminação das superfícies-teste, contaminadas com 100µL de <i>Bacillus subtilis</i> , em função do número de reduções decimais, segundo planejamento fatorial completo 2 ³	75
Tabela 17 – Influência dos tratamentos combinados de H ₂ O ₂ com radiação UV sobre a descontaminação das superfícies-teste, contaminadas com 100µL de <i>Bacillus subtilis</i> , em função do número de reduções decimais, segundo planejamento fatorial completo 2 ³	76
Tabela 18 – Coeficientes de regressão do modelo do planejamento 2 ³ para os tratamentos químicos com H ₂ O ₂	78
Tabela 19 – Coeficientes de regressão do modelo do planejamento 2 ³ para os tratamentos combinados de H ₂ O ₂ com radiação UV.....	79
Tabela 20 – Comparação do estudo de Han <i>et al.</i> (1980), com o modelo quadrático desenvolvido neste experimento.....	87
Tabela 21 – Comparação dos resultados obtidos por estudos realizados por via úmida (suspensão) com os obtidos pelos modelos quadráticos desta pesquisa.	88
Tabela 22 – Resultado dos testes de identificação do <i>B. subtilis</i>	90
Tabela 23 – Análise sensorial de água mineral envasada em filme de PEBD esterilizado com solução de H ₂ O ₂ (20%) a 60°C e radiação UV.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama simplificado de um sistema asséptico (Romano <i>et al.</i> , 1998).	11
Figura 2. Mecanismo de ação do radical hidroxil.....	23
Figura 3 – Efeito da temperatura sobre esporos de <i>B. subtilis</i> expostos a solução de 10% de H ₂ O ₂ a 50°C (●), 60°C (▲), 70°C (○) e 80°C (Δ).....	25
Figura 4 – Efeito da concentração de H ₂ O ₂ sobre esporos de <i>B. subtilis</i> a 24°C.....	25
Figura 5 – Mistura estabilizada de ácido acético, ácido peracético e H ₂ O ₂	27
Figura 6 – Efeito da temperatura sobre esporos de <i>B. subtilis</i> var. <i>globigii</i> expostos a solução de ácido peracético 0,03%. 8°C (▼), 20°C (●) e 40°C (◆).....	28
Figura 7 – Destruição de esporos de <i>B. subtilis</i> 706 por irradiação UV com H ₂ O ₂ . Irradiação por 60s com a lâmpada a 30cm acima da suspensão com (○,●) ou sem (Δ,▲) H ₂ O ₂ (1%).....	33
Figura 8 – Design do sistema de esterilização.	38
Figura 9 – Sistema de esterilização de filme de PEBD, com H ₂ O ₂ e radiação UV.....	39
Figura 10 – Interior da envasadora automática: a) lâmpada de radiação UV, a 2,5cm da superfície-teste de PEBD.....	39
Figura 11 – Diagrama do Experimento 1 – Avaliação da influência de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem.....	42
Figura 12 – Fluxograma da Fase 1 do procedimento para preparo, inoculação e quantificação de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> inoculados nas superfícies-teste de PEBD.....	50

Figura 13 – Fluxograma da Fase 2 da avaliação da eficiência dos tratamentos químicos com H ₂ O ₂ e combinados com H ₂ O ₂ e exposição à radiação UV sobre superfícies-teste inoculadas com esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	51
Figura 14 – Módulo para exposição das superfícies-teste à radiação UV: a) disposição da lâmpada de radiação UV no interior do modelo, a 2,5cm da superfície-teste de PEBD.	52
Figura 15. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 5% de H ₂ O ₂ e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).	63
Figura 16. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 5% de a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).H ₂ O ₂ a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).	64
Figura 17. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 15% de H ₂ O ₂ e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).	65
Figura 18. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 15% de H ₂ O ₂ a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).....	66
Figura 19. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 25% de H ₂ O ₂ e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).	67
Figura 20. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 25% de H ₂ O ₂ a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).....	68
Figura 21. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 35% de H ₂ O ₂ a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).....	69
Figura 22. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 35% de H ₂ O ₂ e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).	70

Figura 23 – Superfície de resposta e curvas de nível do modelo ajustado, para os tratamentos sem radiação UV, no tempo de 12 segundos (ponto central).....	82
Figura 24 – Superfície de resposta e curvas de nível do modelo ajustado, para os tratamentos com radiação UV, no tempo de 12 segundos (ponto central).....	84
Figura 25 – Redução da intensidade da radiação UV com o tempo de uso.	91

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 – Ficha do teste “Diferença do Controle” para seleção de provadores 110

Anexo 2 – Ficha do teste “Diferença do Controle” para avaliação das amostras de água mineral..... 111

LISTA DE ABREVIATURAS

PEBD – polietileno de baixa densidade

LDPE – *low density polyethylene*

ANOVA – análise de variância

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

C – concentração de peróxido de hidrogênio

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

ATCC – *American Type Culture Collection*

FDA – *Food and Drug Administration*

ISO – *International Standard Organization*

NBR – Norma Brasileira

PET – polietileno tereftalato

PCA – *plate count agar*

UHT – *ultra high temperature*

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

D – tempo de redução decimal

UFC – unidades formadoras de colônia

N₀ – população inicial

N – população final

t – tempo

T – temperatura

γ - número de reduções decimais

p – probabilidade de erro

p1 – padrão 1

p2 – padrão 2

F – fator de distribuição

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu no processamento e avaliação de desempenho de um sistema asséptico piloto para filme de polietileno de baixa densidade (PEBD). Através da metodologia de planejamento experimental fatorial foram feitas variações de tempo de contato, temperatura do banho e concentração da solução esterilizante, bem como a variação do tempo de exposição à radiação ultravioleta (UVC). Estas variações tiveram por finalidade promover de 4 a 6 reduções decimais na população inicial de esporos de *Bacillus subtilis* var. *globigii* ATCC9372, em um curto espaço de tempo, gerando o menor residual do esterilizante em água envasada. Foram inoculados uniformemente 100µL do microrganismo teste em uma superfície de 16cm². Testou-se como agente de esterilização química, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e, como agente físico, a radiação UVC, sendo o primeiro aplicado na forma de banho de imersão e o segundo, por uma exposição a 2,5cm de distância do filme de PEBD logo após o banho de imersão. O sistema utilizado constituiu em uma envasadora automática e um protótipo com um tanque em aço inoxidável, desenvolvido especialmente para este tipo de teste. O H₂O₂ e a radiação UVC apresentaram ação esporicida significativa. O H₂O₂ demonstrou ação esporicida entre as concentrações de 18 e 35%, em um intervalo de temperatura de 46 a 70°C, promovendo de 3 a 7 reduções decimais de *Bacillus subtilis*. A concentração de 20% de H₂O₂ não conferiu sabor estranho à água mineral envasada em embalagens de PEBD sanificadas, não diferindo, significativamente (p<0,05), do padrão. O residual de H₂O₂ das superfícies-teste sanificadas com soluções contendo de 18 a 35% de H₂O₂ foi superior a 0,5mg/L, nível máximo permitido pela FDA presente em água envasada sob as condições de produção. Os dados obtidos forneceram dois modelos matemáticos quadráticos, representativos da ação do H₂O₂ e radiação UVC, em função do tempo e da temperatura, sobre esporos de *B. subtilis*. Tais modelos, com R² de 0,9349 para os

tratamentos sem radiação UVC, e R^2 de 0,9763 para os tratamentos com radiação UVC, limitaram-se a uma concentração de 35% de H_2O_2 e tempo máximo de exposição à radiação UVC de 8s. Superfícies-teste sanificadas com soluções de 28% de H_2O_2 a 60°C, por 8s sem exposição à radiação UVC apresentaram 4 ciclos de redução decimal. Para as mesmas condições, porém com exposição à radiação UVC por 8s, este valor elevou-se para 7, demonstrando a existência do sinergismo entre a associação destes dois agentes. O sistema de esterilização testado apresentou desempenho satisfatório, podendo ser perfeitamente utilizado por indústrias de pequeno e médio porte na esterilização de filmes plásticos, sendo capaz de promover até 7 reduções decimais na população de esporos bacterianos.

SUMMARY

The aim of this research consisted in the processing and performance evaluation of an aseptic pilot system for Low Density Polyethylene film (LDPE). Through the screening design methodology, variations of contact time, bath temperature, sanificant concentration and exposition time variation of ultraviolet radiation (UVC) was made. Such variations had as purpose to promote from 4 to 6 decimal reductions in the *Bacillus subtilis* var. *globigii* ATCC9372 spores, when applied to the LDPE film surface, in a short time, generating the minor residual of the sanificant in the plastic surface. Was evaluated as chemical agent, the hydrogen peroxide (H₂O₂) and as physical agent, UVC radiation, being the first one applied as immersion bath and the second one as an exposition after the immersion bath, with 2,5cm of distance of the PEBD film. The system used was constituted in an automatic filling machine and an equipment with a stainless steel tank, especially developed for this type of test. H₂O₂ showed sporicidal action in from 18 to 35%, in temperatures of 46 to 70°C, causing from 3 to 7 decimal reductions. The H₂O₂ 20% did not confer off-taste in mineral water used as filling product, as well no significant difference from the standard was observed ($p < 0,05$). The hydrogen peroxide residual surface-test after sanitation with 18 to 35% H₂O₂ was higher than 0,5mg/L. However, the use of hot air knives or roller pressers after the immersion bath will be able to diminish this residual. The quadratic model, with R² of 0,9349 for the treatments without UVC radiation and R² of 0,9763 for the treatments with UVC radiation are restricted to 35% H₂O₂ and UVC maximum exposition time of 8s. Surface-test treated with 28% H₂O₂ / 60°C / 8s without UVC radiation exposition had presented 4 decimal reduction. In the same conditions, however with UVC radiation exposition (8s), this value was raised for 7, demonstrating the existence of synergism between these two agents. The sanification system tested showed satisfactory

performance, effective to be used in small and medium industries, being capable to promote up to 7 decimal reductions in spores population.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento no consumo de produtos que proporcionam maior conveniência e praticidade ao consumidor final tem sido notável na última década. Os alimentos que apelam à praticidade, como o leite longa vida, são os que mais crescem no mercado brasileiro, porque são ideais para uma era em que o tempo é cada vez mais escasso. Visto isto, produtos comercialmente estéreis, estáveis a temperatura ambiente, têm sido introduzidos no mercado há um longo período (Faria, 1993; Brody, 2006; Von bockelmann e Von bockelmann, 1986).

Existe uma grande preocupação com a segurança dos alimentos disponíveis ao consumidor, em relação às características físicas, químicas e microbiológicas. Assim, a indústria alimentícia deve agir de forma preventiva nas diversas etapas da produção dos alimentos, atuando em pontos onde é possível reduzir a contaminação com microrganismos patogênicos e/ou deterioradores. Essas contaminações podem veicular enfermidades transmitidas por alimentos, apresentar problemas de diminuição da vida útil ou ainda, não atender à legislação vigente.

Várias são as técnicas utilizadas na conservação dos alimentos, dentre elas incluem: os processos químicos (uso de aditivos químicos, salga e defumação) e processos físicos (pasteurização, refrigeração), entre outros. De maneira geral, empregam-se métodos combinados, sendo necessária a proteção física através de embalagem adequada (Sobral *et al.*, 1997).

Em princípio, desenvolveu-se o sistema asséptico para melhoria da qualidade de alguns alimentos enlatados, cuja qualidade final era afetada pelo calor em termos de perdas sensoriais e nutricionais. Entretanto, através do desenvolvimento do processo de alta temperatura e curto tempo (*Ultra High Temperature – UHT*) e pelo acondicionamento

asséptico, tem-se conseguido produtos microbiologicamente estáveis e com boa qualidade (Faria, 1993).

O controle microbiológico das embalagens pode ser efetuado por meio de tratamentos químicos e físicos. Nos tratamentos químicos, destaca-se o uso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A aplicação do H_2O_2 em sistemas assépticos é de grande valor. É considerado um oxidante de alta eficiência e em elevadas concentrações, em contato com a superfície aderida ao alimento, pode ser utilizado para esterilizar poliolefinas em geral, como o polietileno (FDA, 1981 citado por Brown, 1992). Nos tratamentos físicos, o emprego da radiação ultravioleta (UV) tornou-se bastante comum. A radiação UV é um agente sanificante físico que elimina bactérias, bolores, leveduras e vírus, não deixando resíduos nas superfícies aplicadas (Silva, 2000).

No sistema asséptico, as embalagens cartonadas são as mais utilizadas, e em seu processo de esterilização, o H_2O_2 é amplamente utilizado em elevadas temperaturas por um tempo reduzido (Brody, 2006).

O desenvolvimento de novos métodos para esterilização de embalagens, principalmente daqueles onde se faz uso de temperaturas moderadas, colaboraram em muito para a introdução de novos tipos de materiais de embalagens, que podem ser utilizados nos sistemas assépticos, como filmes e garrafas plásticas (Romano *et al.* 1998). As embalagens plásticas têm algumas vantagens sob as cartonadas, como a possibilidade de várias opções de volume e formatos; possibilidade de ser produzida pelo próprio usuário ou ser adquirida facilmente por fornecedores; ser de fácil reciclagem; ter a possibilidade de ter a esterilização sem o uso de agentes químicos ou com concentrações reduzidas destes e ser de fácil manuseio. Já as cartonadas, indiscutivelmente, poderiam apresentar melhor barreira aos gases, aromas e vapor de água se não fosse o aparecimento de problemas de microfuros e trincas na folha de alumínio e defeitos nas regiões de solda, provocados pelas dobras após a termossoldagem. Além disso, pela

possibilidade de enchimento a frio, o sistema asséptico permite a utilização de alguns materiais sensíveis ao calor em combinação com outros não sensíveis, como o polietileno de baixa densidade (PEBD) (Faria, 1993; Padula *et al.*, 1989).

No sistema de acondicionamento asséptico, a esterilização da embalagem é uma etapa de suma importância, pois tem como objetivo eliminar uma fonte de contaminação potencial, já que neste sistema, o produto, após seu acondicionamento, não passará por nenhuma outra etapa capaz de eliminar a contaminação proveniente da embalagem (Reuter, 1988a; Joyce, 1993; Roland, 1996).

Devido à necessidade da indústria alimentícia de embalagens com reduzidos valores de contaminantes para uso em sistemas assépticos, sistemas de acondicionamento para produtos minimamente processados sob atmosfera modificada, massas e produtos de panificação, dentre outras aplicações, o emprego de embalagens esterilizadas poderá contribuir para uma maior vida útil do produto. Este tratamento poderá proporcionar mais uma barreira efetiva, com base no conceito de aplicação de métodos combinados visando melhoria da qualidade dos produtos industrializados.

O PEBD continua com um bom crescimento no mercado de embalagens para alimentos. Segundo dados do Datamark (2003), houve aumento de 36% no volume deste filme consumido pelas indústrias dentre os anos de 1982 e 2002. O mercado onde o PEBD mais cresce é o de leite aromatizado (473%), destacando-se também o de creme pasteurizado (51%). No mercado de embalagens assépticas, só no Brasil houve um crescimento de 1100% em consumo de embalagens, deste segmento somente entre os anos de 1990 e 2005, sendo que o consumo de leite no Brasil, em 2002, chegou a 5,7 bilhões de litros, demonstrando-se assim, a importância do desenvolvimento de tecnologias voltadas para os sistemas assépticos.

Os processos químicos de esterilização de embalagem com produtos peroxigenados são amplamente utilizados pelas unidades processadoras de alimentos.

Existem outros métodos e a associação de alguns deles, porém de custo mais elevado e com tecnologia mais avançada, limitando-se seu uso às indústrias de grande porte.

Com a expansão do segmento de produtos obtidos por sistemas assépticos, tanto no mercado nacional como mundial, e com a tendência de redução de custos na produção de embalagens plásticas, indústrias de pequeno e médio porte poderão aumentar sua atuação neste setor, o que traz a necessidade do desenvolvimento de processos de esterilização de embalagens de baixo custo e de tecnologia acessível às indústrias.

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de um sistema de esterilização para a assepsia de filme de PEBD inoculado com esporos de *B. subtilis*. Os testes foram conduzidos através da metodologia de planejamento experimental fatorial, para definir a melhor concentração do agente de esterilização (H_2O_2), e as condições de tempo e temperatura de aplicação deste agente químico, além da avaliação do tempo de exposição à radiação UV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMAS ASSÉPTICOS

O processamento asséptico pode ser resumido como o acondicionamento de um produto comercialmente estéril, em uma embalagem também estéril, sendo que este acondicionamento é realizado em um ambiente controlado, seguido de um fechamento asséptico e hermético. Assim, ao final do processo, é alcançada a esterilidade comercial, ou seja, a esterilidade necessária para que o produto esteja em condições de estocagem e distribuição sem refrigeração (Buchner, 1993).

A esterilidade comercial visa a destruição de microrganismos, incluindo os esporos, e a inativação de enzimas que podem causar alterações indesejáveis ao produto, podendo incluir desde modificações nas características sensoriais até a produção de toxinas. A esterilização térmica, ultrafiltração e a irradiação figuram entres as principais tecnologias aplicadas para atingir tal condição (Reuter, 1993a).

A embalagem asséptica não é um conceito recente. Dunkley em 1917 esterilizou latas metálicas e suas respectivas tampas com vapor saturado e subseqüente enchimento das mesmas com um produto pré-esterilizado, patenteando assim o processo de esterilização. Com o passar das décadas, um grande desenvolvimento tem ocorrido nesse campo, principalmente a introdução das embalagens cartonadas. Isto fez com que a indústria alimentícia passasse a considerar a embalagem asséptica como uma parte essencial de todo o processo tecnológico (Reuter, 1989b).

Além disso, o sistema de acondicionamento asséptico é utilizado para produtos que receberam ou não tratamento térmico, e que terão um longo período de armazenamento à temperatura ambiente, ou quando se quer uma elevada preservação da qualidade do produto (Reuter, 1988c).

Há alguns anos, a implementação de processos de embalagem asséptica foi motivada pelo desejo de se utilizar materiais termoplásticos. Atualmente, a aplicação de processos assépticos com o objetivo de melhorar a qualidade do produto conquistou grau de importância similar (Bischoff, 1988).

No acondicionamento asséptico, há uma exigência muito maior quanto às medidas de higiene do que em outros processos de embalagem. Isto é justificado principalmente devido à ameaça de esporos de bolores, que são microrganismos presentes em grande quantidade no ar do ambiente, podendo contaminar o produto. Maior controle dos processos de tratamento térmico do produto e de assepsia da embalagem tornam-se necessários para se obter a devida eficiência industrial (Petrus, 2004). Isso exige um investimento elevado, com custos operacionais superiores aos sistemas tradicionais. Os equipamentos incorporam um maior número de fontes potenciais de contaminação, no qual o envase asséptico apresenta-se como a etapa mais crítica, necessitando-se de mão-de-obra técnica especializada (Romano *et al.*, 1998).

O processamento asséptico consiste basicamente das seguintes etapas conforme a Figura 1.

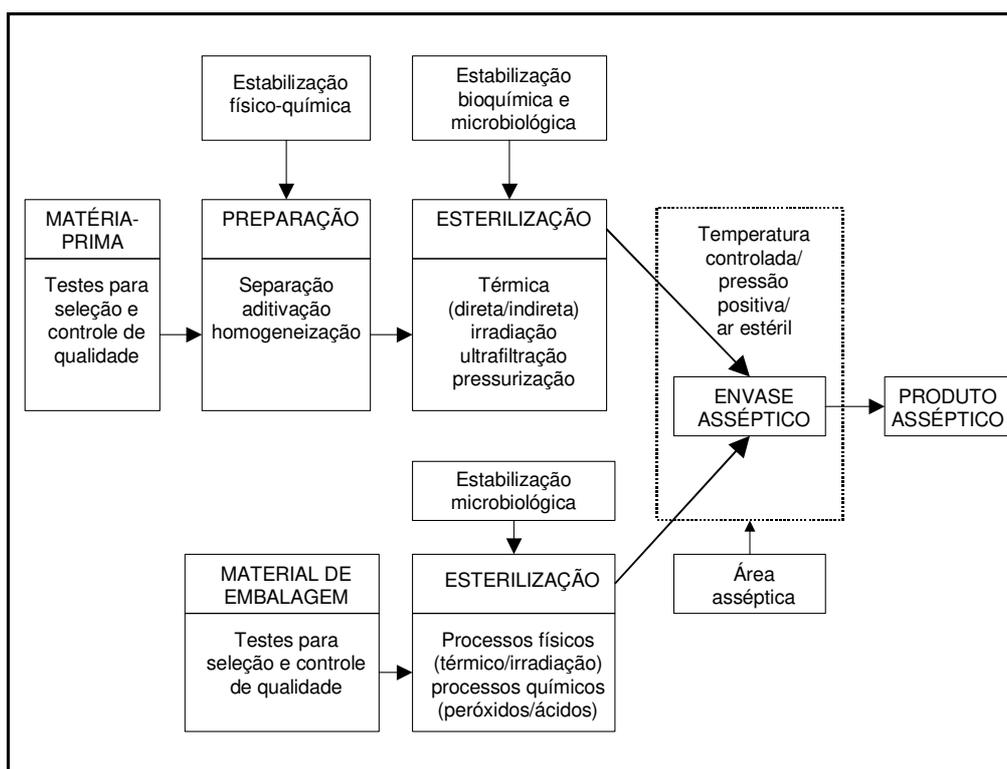


Figura 1 – Diagrama simplificado de um sistema asséptico (Romano *et al.*, 1998).

Verifica-se que na implementação do sistema, há uma redução no consumo de energia durante as diferentes etapas do processo produtivo, tais como na esterilização do produto, na produção e esterilização da embalagem, no transporte e armazenamento, visto que os produtos processados assepticamente são estáveis à temperatura ambiente (Reuter, 1989b).

É um pré-requisito da tecnologia das embalagens assépticas que o material de embalagem que irá conter o produto estável esteja estéril ou pelo menos livre de qualquer microrganismo capaz de contaminar o produto. Isto significa que este material tem que ser tratado para se reduzir consideravelmente a sua carga microbiana. Em algumas situações, o material de embalagens é contaminado com microrganismos principalmente veiculados pelo ar e pelo contato com máquinas ou pessoas (Cerny, 1985).

Métodos de esterilização têm sido cada vez mais desenvolvidos no envase de produtos em embalagens plásticas simples ou convertidas, como as cartonadas. Este crescimento tem sido estimulado tanto pela indústria alimentícia, para estender a vida útil dos produtos, um fator essencial para o ramo atacadista, quanto pelo alto nível da esterilização demandada no envase de fármacos (Guise, 1986). Além disso, a produção de alimentos em sistemas assépticos possibilita a ausência ou a redução da cadeia de frio e o decréscimo dos conservadores químicos. Este sistema tem sido mais utilizado para produtos líquidos (leites, sucos, vinhos, etc), pastosos (produtos de leite, iogurtes, queijos, produtos de tomate, purê de frutas) e ainda produtos particulados (purê de frutas com pedaços). Entretanto, a complexidade do sistema requer um alto capital de investimento, assim como um treinamento intensivo de pessoal (Reuter, 1989b; Buchner, 1993; Grimm, 1998; Romano *et al.*, 1998).

2.2. ESTERILIZAÇÃO COMERCIAL DO PRODUTO

Tem por objetivo destruir ou inativar, enzimas e microrganismos, incluindo seus esporos, que podem causar alterações indesejáveis ao produto, podendo incluir desde modificações no aroma e sabor até a produção de toxinas. Exemplos de tecnologias aplicadas para se atingir esta condição são a esterilização térmica, ultrafiltração, irradiação e utilização de altas pressões (Petrus, 2004).

Na esterilização de alimentos líquidos para sistemas assépticos, tem-se como principal característica, a preservação ao máximo das características naturais do produto sem utilizar aquecimento ou quando isto ocorre, utilizam-se altas temperaturas por um curto espaço de tempo, com rápido resfriamento (Abreu, 2001).

Como processos de esterilização para líquidos mais utilizados, destacam-se os trocadores de calor tipo placas, injeção de vapor, infusão de líquido no vapor, aquecimento por fricção e filtração estéril. Estes métodos são convenientemente

aplicados aos produtos líquidos, livres de partículas. Os líquidos particulados exigem processos de esterilização mais complexos, devido à falta de homogeneidade na distribuição do calor (Buchner, 1993).

2.3. ÁREAS LIMPAS

O ar é sem dúvida, um grande veículo de microrganismos, especialmente esporos de bolores. Estes microrganismos presentes no ambiente representam um obstáculo aos sistemas de acondicionamento porque o ar, normalmente, contém um grande número deles. Devido ao potencial de recontaminação do produto após o processamento, o resultado final seria sua deterioração. Outro aspecto a considerar é que a contaminação não pode ser visualmente detectada por causa do tamanho microscópico das partículas suspensas no ar (Grimm, 1998, Roland, 1996).

As partículas suspensas no ar podem apresentar tamanhos entre 0,1 e 10 μ m, e assim são capazes de carrear microrganismos aderidos a elas. Bactérias geralmente possuem também essas dimensões. Somente partículas maiores que 30 μ m podem ser detectadas a olho nu. Em razão da sedimentação, partículas maiores que 10 μ m dificilmente são encontradas em suspensão na atmosfera. As áreas limpas são classificadas de acordo com o número de partículas suspensas por volume de ar e esta classificação segue a norma ISO 14644-1 de maio de 1999 (Bennet, 2002; Roland, 1996; Blumke, 1993).

Em conjunto com o processo de tratamento térmico do produto e da esterilização da embalagem, a eficiência do sistema asséptico depende também da qualidade do ar utilizado na sala de acondicionamento, sendo recomendado o uso de ar livre de microrganismos. Tal necessidade é crucial, pois uma vez que estes microrganismos são veiculados através de partículas em suspensão no ar, a recontaminação do produto poderá ocorrer (Faria, 1993).

Uma potencial fonte de contaminantes é o sistema de ar condicionado ou ventilação do ambiente em questão. Existe uma relação dinâmica entre a quantidade de ventilação necessária e os contaminantes presentes no ar: quanto mais contaminantes presentes, maior a carga de ventilação necessária para atingir um certo nível de qualidade do ar (Faria, 1993, Petrus, 2004; Petrus e Faria, 2005).

A tecnologia de salas limpas é uma alternativa moderna, embora os seus conceitos já estejam disseminados há muitas décadas. Uma sala limpa é definida como aquela na qual a concentração de partículas no ar é controlada dentro de limites específicos, construída e utilizada de forma a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas no ambiente, onde a temperatura, umidade e pressão devem ser controladas, quando necessário (Whyte, 1991).

Petrus e Faria (2003) avaliaram as condições operacionais de uma sala limpa em planta piloto quanto à pressurização da sala de envase, taxa de recirculação de ar, contagem de partículas totais e monitoramento de partículas viáveis. Os resultados indicaram a conformidade do ambiente avaliado, satisfazendo às normas internacionais vigentes e apresentando, portanto, as condições necessárias para que seja utilizada no processamento e envase asséptico de alimentos líquidos.

2.4. EMBALAGENS PLÁSTICAS PARA SISTEMAS ASSÉPTICOS

O desenvolvimento de novos métodos de esterilização do material de embalagem, principalmente aqueles que poderiam ser realizados à baixa temperatura, bem como o aprimoramento das máquinas de envase asséptico, colaboraram definitivamente para a introdução de novos materiais de embalagem no mercado de assépticos (Anon, 1971). Segundo Rice (1993), a tecnologia asséptica permitiu que materiais de embalagens de baixa resistência térmica fossem utilizados em processos que, tradicionalmente,

utilizavam o enchimento a quente, e agora poderiam fazê-lo a frio, como ocorreu, há alguns anos, com as embalagens de polietileno tereftalato (PET).

As embalagens plásticas vêm conquistando espaço no segmento asséptico por apresentarem a possibilidade de se obter uma variedade de volumes e formatos com várias opções de *design*. Além disso, estas embalagens permitem a produção pelo próprio usuário ou podem ser facilmente adquiridas de vários fornecedores; apresentam também maiores possibilidades de reciclagem e maior facilidade de manuseio e fechamento depois de abertas (Chamber e Nelson, 1993).

Os materiais componentes dos laminados flexíveis, mais utilizados pelas indústrias de alimentos são: o polietileno de alta densidade (PEAD) monocamada e multicamada, o polietileno de baixa densidade (PEBD) monocamada e multicamada, o policloreto de vinila (PVC), o polietileno tereftalato (PET) e o polipropileno (PP) (Brown, 1992; Turtle, 1993).

Dentre os materiais flexíveis, o PEBD é bastante utilizado por apresentar um menor custo e algumas vantagens funcionais (Sarantoupolos & Soler, 1989).

O PEBD apresenta ponto de fusão em torno de 115°C, densidade na faixa de 0,91 a 0,94g/cm³, índice de refração de 1,51 a 1,52, alta resistência a substâncias ácidas e alcalinas, sendo um sólido com 50 a 60% de cristalinidade (Billmeyer, 1984).

O impedimento espacial provocado pelas ramificações na estrutura molecular do PEBD dificulta o “empilhamento” das cadeias poliméricas. Por esta razão, as forças intermoleculares que mantêm as cadeias poliméricas unidas tendem a ser mais fracas, tornando este material bastante flexível (Mano, 1991).

Como aplicações típicas, pode-se citar o uso na fabricação de filmes plásticos e laminados para embalagens de produtos alimentícios líquidos e sólidos, filmes termoencolhíveis, filmes laminados e plastificados para produtos farmacêuticos e hospitalares, filmes para embalagens industriais e agrícolas, utensílios domésticos,

brinquedos, sacos para lixo, revestimento de fios e cabos, tubos e mangueiras (Mano, 1991).

2.5. CONTAMINAÇÃO DE EMBALAGENS

Logo após à fabricação, algumas embalagens são consideradas estéreis, em virtude das altas temperaturas atingidas durante o processo de extrusão. Devido à deposição de partículas e microrganismos presentes no ar, as embalagens podem ser facilmente recontaminadas durante o manuseio e estocagem. De maneira geral o nível de contaminação destas embalagens varia de 1 a 10 microrganismos por cm² de superfície do material que ainda não foi manuseado (Joyce, 1993).

Delgado (2001), analisando a superfície interna de laminados destinados a confecção de embalagens, detectou de 0,7 a 1 UFC/100cm², no qual menos de 10% das amostras estavam contaminadas com bolores. Petrus *et al.* (2001) detectaram de 19 a 210UFC por garrafa de PET de 500mL.

Laminados submetidos a testes logo após o processo de fabricação, apresentaram cerca de 160 microrganismos por embalagem, nos quais 68,8% eram bactérias, sendo que deste total, 3 a 5% eram esporos de *Bacillus* (Von bockman, 1973). Todavia, experimentos realizados com a superfície interna de laminados destinados a confecção de embalagens, detectaram de 0,7 a 1 microrganismo por 100 cm², nos quais menos de 10% das amostras estavam contaminadas com bolores (Delgado, 2001).

O grau de desinfecção de embalagens depende da quantidade inicial de microrganismos e da área da embalagem. O *US-Food Drug Administration* (FDA), recomenda um total de 5 reduções decimais em embalagens de 1-10dm². Para o *Clostridium botulinum* são requeridas 10 reduções decimais no material de embalagem, segundo a FDA. Contudo, o este microrganismo é 2,5 vezes menos resistente ao H₂O₂

que o *B. subtilis* var. *globigii*, que é considerado o microrganismos mais resistente a este agente químico (Buchner, 1993).

Segundo Cerny (1993), existem três pontos principais onde problemas microbianos podem surgir no decorrer do processamento e envase asséptico:

- Durante a esterilização do produto, este pode ser insuficientemente aquecido no trocador de calor, caracterizando um subprocessamento;
- Após a esterilização e durante o enchimento o produto pode ser recontaminado após o processamento térmico, através de tubulações e tanques sem a adequada assepsia. Durante a operação de enchimento, a contaminação de origem aérea no local de embalagem também pode ocorrer;
- Após o envase o produto pode ser recontaminado com microrganismos presentes no material de embalagem se essa não tiver sido adequadamente esterilizada. Embalagens seladas não hermeticamente também podem levar o produto à deterioração, se contaminadas por microrganismos de origem aérea.

Vários processos vêm sendo desenvolvidos para obtenção de esterilidade comercial, ou na descontaminação do material de embalagem, imediatamente anterior ao acondicionamento do produto (Joyce, 1993).

2.6. ESTERILIZAÇÃO DE EMBALAGENS

Os processos de esterilização da superfície do material de embalagem que entrará em contato com o alimento podem ser divididos em processos físicos e químicos, como já mencionados.

A escolha de um adequado processo de esterilização de embalagens para acondicionamento asséptico deve levar alguns pontos em consideração, como a boa eficiência esporicida (reduzidos valores D); permitir uma alta produção de acordo com o desempenho dos equipamentos de acondicionamento; ou seja, requerer um curto espaço

de tempo para uma esterilização contínua (valores $D \leq 1$ segundo); compatibilidade com o material de embalagem; fácil remoção de resíduos da superfície da embalagem; não oferecer perigo à saúde dos operadores e consumidores; não prejudicar a qualidade do produto devido a uma alta concentração de resíduos; ser compatível com o meio ambiente; não ter efeito corrosivo sobre o material e ter aplicação segura e econômica (Reuter, 1988c; Reuter, 1993a).

Incluem-se entre os agentes químicos líquidos usados no controle de processos de adesão microbiana na indústria de alimentos os compostos clorados iodados, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, etanol, óxido de etileno e ácido acético. O uso de H_2O_2 é considerado procedimento-padrão na descontaminação de embalagens sensíveis a descontaminação por aquecimento (Fluckiger, 1995).

Gases como óxido de etileno, óxido de propileno e ozônio são também apontados como possíveis alternativas para a descontaminação de embalagens (Toledo, 1975; Guzel-seydim *et al.*, 2003).

Já para os processos físicos, o calor nas formas de água quente, ar quente, vapor e radiações ionizantes, como a radiação gama e não-ionizantes, são empregados na destruição de microrganismos aderidos às superfícies. Como exemplo de radiação não-ionizante, tem-se a radiação UV, que é amplamente empregada na indústria de alimentos para descontaminação de embalagens e de algumas superfícies de equipamentos, ambientes e água (Andrade e Macedo, 1996; Silva, 2000).

-Banho de imersão

Considerado como um processo físico de esterilização, mas que também é incluído entre os processos químicos, onde é realizada a eliminação de sujidades e microrganismos. Há a imersão do material de embalagem em líquidos e a posterior remoção dos resíduos do líquido esterilizante por meio de ar estéril ou dispositivo de pressão. O *banho de imersão* é um processo mais utilizado para esterilizar embalagens

laminadas, como as do tipo *Tetra Pak*. A priori é realizada com H₂O₂, mas em alguns processos pode-se fazer uso do ácido peracético em baixas concentrações ou da combinação destes dois agentes. O H₂O₂ em concentração de 15 a 30% é o mais utilizado, podendo ser aplicado por meio de imersão ou *spray*. O sistema *Tetra Pak* esteriliza o laminado de suas embalagens por imersão em um banho de H₂O₂, que em seguida é removido mecanicamente com o auxílio de rolos espremedores ou por jatos de ar estéril; o líquido que fica aderido é seco com ar quente. O processo de imersão pode promover de 4 a 5 reduções decimais, mas o *spray* é normalmente utilizado para embalagens preformadas. Depois de aplicado à superfície do material, o peróxido é ativado pela ação do calor, geralmente por meio de aquecimento por radiação infravermelha ou ar quente estéril, pois o calor potencializa a ação do peróxido, além de reduzir o seu residual. Assim sendo, a grande desvantagem deste processo quando aplicado às embalagens termossensíveis, é a baixa resistência dessas embalagens ao calor que é essencial nesta etapa (Reuter, 1988B; Rammert, 1996; Swartling e Lindgren, 1968; Wakabayashi, 1993).

A irradiação de embalagens com radiação UV ($\lambda=254\text{nm}$), combinada ao uso de agentes esterilizantes como o H₂O₂, é uma prática comum para a esterilização. Contudo, este processo é recomendado para superfícies lisas, planas e livres de poeira, sendo possível uma fácil adaptação para filmes bobinados (Reuter, 1988c; Joyce, 1993).

A eficiência dos sistemas de esterilização é determinada pelo tempo necessário para que ocorra uma redução de 90% das células viáveis, a uma dada temperatura ou concentração. Este parâmetro é denominado de tempo de redução decimal (D), servindo para representar tanto os processos térmicos como químicos. Desta forma, quanto menor o valor D mais eficiente será o processo (Reuter, 1988c).

Em geral, a inadequação ou a ausência de um sistema de esterilização de embalagens poderá resultar no aumento da contaminação do produto e,

conseqüentemente, redução de sua vida útil (Petrus *et al.*, 2003). Pesquisas têm comprovado que o grau de esterilização obtido na embalagem depende do nível de contaminação inicial, da área da embalagem e da eficiência do processo de esterilização. A Tabela 1 lista os processos classificados como físicos e químicos na assepsia de embalagens.

Tabela 1 – Meios empregados no tratamento de esterilização de embalagens.

MÉTODOS FÍSICOS	MÉTODOS QUÍMICOS
<i>Processos Mecânicos</i>	• tratamento com H ₂ O ₂ (15 - 35%)
• enxágüe com água	• H ₂ O ₂ + ultravioleta
• jato de ar	• tratamento com ácido peracético (0,1 - 1%)
• ultra som	• ácido peracético + álcool
<i>Processos Térmicos</i>	• ácido peracético + H ₂ O ₂
• vapor saturado	• álcoois
• vapor superaquecido	• óxido de etileno
• ar quente	• ozônio
• misturas de ar quente e vapor	• cloro
• aquecimento por extrusão	
• gases aquecidos (N ₂ , He, O ₂ , CO ₂)	
<i>Processos por Irradiação</i>	
radiação ionizante	
• raios gama	
• raios X	
radiação ultravioleta	
radiação infravermelho	

Fonte: PETRUS, 2004.

Os métodos químicos e físicos, particularmente os que utilizam H₂O₂ e radiação UV, respectivamente, como meios ativos de esterilização, foram os de maior interesse para o

desenvolvimento desta pesquisa, baseado em testes realizados por Abreu (2001) e Silva (2000).

2.7. TESTES DE ESTERILIDADE

São vários os processos utilizados para a validação do processo de esterilização, dentre eles se destacam o teste desafio e o teste do produto (CFDRA, 1989 citado por Joyce, 1993; Bernard *et al.*, 1990).

O primeiro caso consiste em semear o material com um microrganismo teste e verificar se ele está sendo eliminado durante a operação normal do sistema. Para selecionar o microrganismo-teste, é necessário saber o tipo de esterilizante a ser usado e a resistência do microrganismo a ele, a acidez do meio, a resistência térmica do microrganismo, os microrganismos que potencialmente estariam presentes no material e a reologia do produto. O microrganismo-teste pode ser introduzido no processo por várias maneiras, a saber: seco sobre a superfície, inclusive de embalagens, na forma de discos ou folhas impregnadas da própria planta ou incorporados ao produto (Bernard *et al.*, 1990).

Já no teste do produto, este pode ser feito inoculando-se em um meio de cultura, o produto ou parte dele, diretamente ou pelo uso de membrana de filtração, seguido-se de incubação e posterior verificação de crescimento microbiano (Holdsworth, 1992).

2.8. AGENTES QUÍMICOS DE ESTERILIZAÇÃO

A aplicação de agentes químicos é realizada para a esterilização nos processos químicos. Geralmente para sistemas assépticos, estes agentes químicos são combinados ao calor ou à radiação UV.

2.8.1. Peróxido de hidrogênio

Introduzido em 1961 e aprovado em 1981 pela FDA como meio de esterilização de materiais de embalagens, o H_2O_2 é utilizado como uma das técnicas mais convenientes para o tratamento asséptico em linha, principalmente para materiais cartonados (Brody, 2006; Fluckiger, 1995; Chambers e Nelson, 1993).

A solução de H_2O_2 à concentração não superior a 35%, em contato com a superfície aderida ao alimento, pode ser utilizada para esterilizar poliolefinas em geral, tais como: PEBD, PEAD e PP (FDA CFR 21, 1981).

O H_2O_2 tem sido utilizado com sucesso quando comparado aos outros esterilizantes químicos de eficiência similar, especialmente porque os resíduos após o processo de esterilização são menos problemáticos do que os deixados pelos outros produtos. A regulamentação do FDA estabelece um limite não superior a 0,5mg/L após o processo de enchimento em testes realizados com água envasada sob as condições de produção (FDA CFR 21, 1981).

A estabilidade, a temperatura e a concentração da solução são essenciais para a boa eficiência do peróxido, sendo que todos estes fatores são de fácil controle para o referido agente (Chambers e Nelson, 1993). Muitos sistemas de envase utilizam o peróxido em concentrações de 30 a 35% associado a uma elevação da temperatura (70 a 90°C), seguido de uma corrente de ar quente, rolos de pressão ou enzimas como a catalase para dissipar o residual do produto (Nicolas, 1995). Tais concentrações são utilizadas em processos de assepsia por imersão ou *spray* (Chambers e Nelson, 1993), sendo que no primeiro caso, todo o corpo da embalagem é esterilizado através de imersão direta em um banho contendo a solução de H_2O_2 aquecido e, no segundo, há uma aspersão do sanitizante por toda a superfície do material na forma de gotículas. Toda

a sanitização acontece em câmara com entrada contínua de ar estéril promovendo uma pressão positiva no interior desta (Fluckiger, 1995).

No sistema Tetra Pak, o material de embalagem é guiado através de um banho de peróxido em concentração de 35% a uma temperatura aproximada de 75°C. O tempo de passagem do material de embalagem através do banho é determinado por um controle automático do equipamento no qual se garante um fator de destruição de 10^6 a 10^7 para o *Bacillus subtilis*. Após o banho e ao entrar na câmara estéril, o material de embalagem é submetido à pressão de rolos e a uma faca de ar para diminuir o residual de peróxido (Reuter, 1993a; Toledo e Chapman, 1973).

O H_2O_2 se decompõe prontamente em água e oxigênio altamente reativo, que elimina os microrganismos pelo seu forte potencial oxidativo, não sendo nocivo ao meio ambiente (Block, 1992).

Uma das propostas de mecanismo para explicar a participação do H_2O_2 na destruição de microrganismos envolve a reação do íon superóxido (O_2^-) com o H_2O_2 (Figura 2) para a produção do radical hidroxil (OH^\bullet), considerado como o mais forte oxidante.

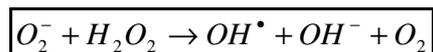


Figura 2. Mecanismo de ação do radical hidroxil.

O radical hidroxil é altamente reativo e pode atacar a membrana lipídica, o DNA e outros componentes essenciais da célula. Estudos também indicam um aumento da formação de radicais hidroxil e da eficiência biocida do H_2O_2 na presença de metais de transição. O H_2O_2 poder ser facilmente eliminado por aquecimento ou pela ação da

enzima catalase dando como produto final, água e oxigênio (Melly *et al.*, 2002; Block, 1991).

A ação da catalase é influenciada pelo pH e pela temperatura. Recomenda-se trabalhar em torno de pH 7 e a 25°C, aproximadamente, (Toledo *et al.*, 1973). Outra forma de diminuir ou eliminar o residual de H₂O₂ é através da aplicação de calor, removendo-o por evaporação. O sistema Tetra Pak utiliza ar quente estéril para reduzir o residual a valores menores que 0,5mg/L, em laminados destinados à fabricação de embalagens. A aplicação deste processo para embalagens termossensíveis, como alguns plásticos, é dificultada devido às temperaturas atingidas que são superiores a 100°C (Reuter, 1988c).

É grande a quantidade de estudos demonstrando a relação direta do efeito biocida do H₂O₂ com a sua concentração, temperatura, tempo de aplicação e o tipo de microrganismo. Swartling e Lindgren (1968), estudando as relações entre estes parâmetros, determinaram que com o aumento da temperatura e da concentração do H₂O₂, os valores D diminuam. Na Figura 3 pode-se observar a influência da temperatura na ação do H₂O₂. Toledo *et al.* (1973) determinaram a influência da concentração do H₂O₂ sobre a resistência dos esporos estudados, que pode ser observado na Figura 4.

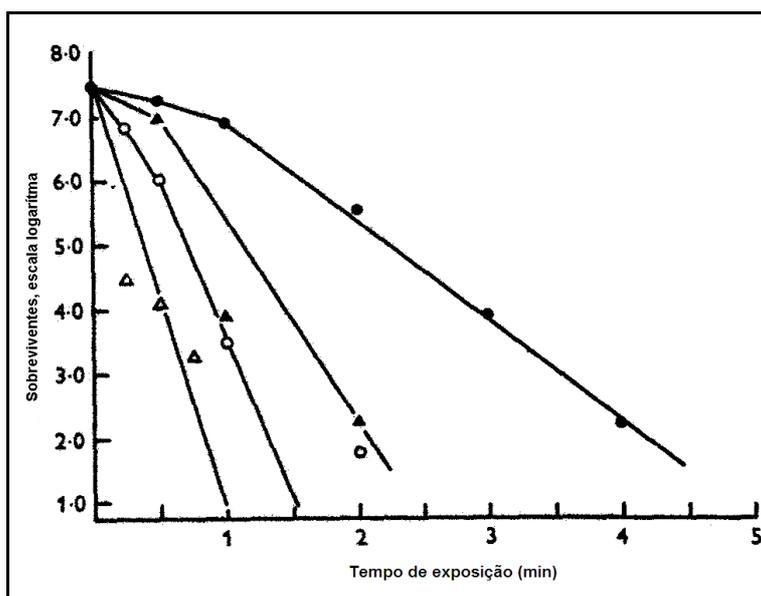


Figura 3 – Efeito da temperatura sobre esporos de *B. subtilis* expostos a solução de 10% de H₂O₂ a 50°C (●), 60°C (▲), 70°C (○) e 80°C (△) (Swartling e Lindgren, 1968).

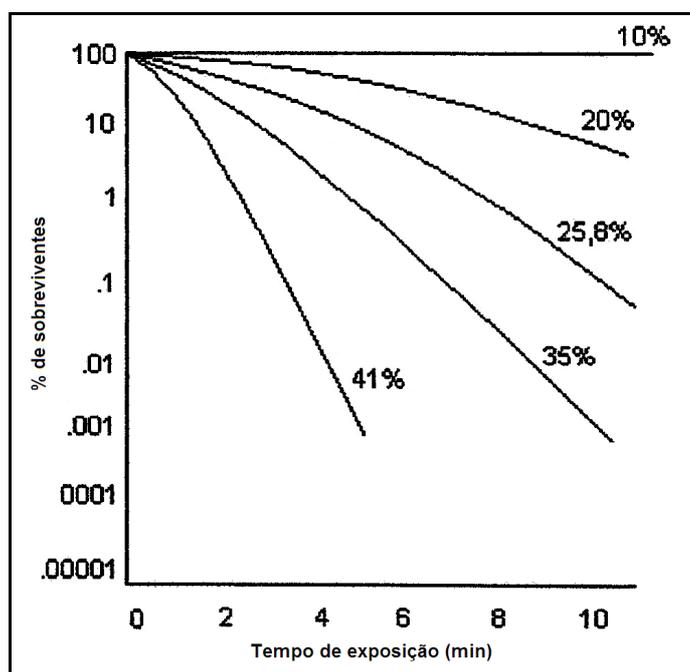


Figura 4 – Efeito da concentração de H₂O₂ sobre esporos de *B. subtilis* a 24°C. (Toledo et al., 1973).

Vários estudos realizados por outros pesquisadores determinaram diferentes temperaturas e concentrações de H₂O₂, como pode ser visualizado na Tabela 2, os diferentes valores D de alguns destes experimentos.

Tabela 2 – Valores D para diferentes concentrações e temperaturas do H₂O₂.

Organismo	Concentração (%)	T(°C)	D (min)	Referência
<i>B. subtilis</i> SA22	25,8	24	7,3	Toledo <i>et al.</i> , 1973
<i>B. stearothermophilus</i>	25,8	24	1,5	Toledo <i>et al.</i> , 1973
<i>B. subtilis</i> var. <i>globigi</i>	25,8	24	2	Toledo <i>et al.</i> , 1973
<i>B. subtilis</i> var. <i>globigi</i>	35	24	1,5	Toledo <i>et al.</i> , 1973
<i>B. subtilis</i> var. <i>globigi</i>	41	24	0,75	Toledo <i>et al.</i> , 1973
<i>B. subtilis</i> A	35	50	0,06	Wang e Toledo, 1986
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i>	35	50	0,07	Wang e Toledo, 1986
<i>B. subtilis</i> SA22	29,5	20	3,6	Leaper, 1984
<i>B. subtilis</i> SA22	29,5	45	0,35	Leaper, 1984

2.8.2. Ácido peracético

É um produto químico com os atributos do H₂O₂, como a efetiva capacidade germicida e esterilizante, sem produtos de decomposição e máxima solubilidade em água, mas com grande solubilidade lipídica e livre da desativação por catalase e peroxidase. É considerado como um esporicida, bactericida, virucida e fungicida em baixas concentrações (< 0,3%), também chamado de peróxido de ácido acético, ácido peroxiacético ou ácido peracético, possuindo uma efetiva ação biocida sem residual tóxico (Block, 1991).

É um agente antimicrobiano mais potente que o H₂O₂, tendo uma rápida ação em baixas concentrações, sobre uma grande gama de microrganismos. Também, é um eficiente esporicida em baixas temperaturas e tem contínua ação na presença de material

orgânico (Baldry, 1983). Em diversos produtos comercialmente disponíveis para esterilização e sanificação de equipamentos industriais, o ácido peracético integra como o princípio ativo destes. A solução é constituída por uma mistura estabilizada de ácido peracético, ácido acético e H_2O_2 , conforme a Figura 5.

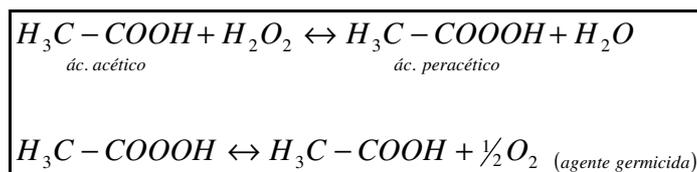


Figura 5 – Mistura estabilizada de ácido acético, ácido peracético e H_2O_2 .

O ácido peracético em meio ácido, tem se mostrado bastante efetivo. Usado em soluções aquosas, como vapor ou aerossol, destaca-se entre os demais agentes químicos para o processo de esterilização de materiais de embalagem, em função de sua rápida ação mesmo a baixas concentrações. Além disso, o ácido acético é o produto de sua decomposição, sendo considerado um agente atóxico (Alfa *et al.*, 1998; McDonnell e Russell, 1999).

Ainda são poucos os estudos sobre o mecanismo de ação biocida do ácido peracético, mas, assume-se que seja similar ao H_2O_2 , desnaturando as proteínas e enzimas e aumentando a permeabilidade da parede celular por destruir as ligações sulfidríla (-SH) e de enxofre (S-S) (Baldry e Fraser, 1998; Block, 1991).

Como ocorre com o H_2O_2 , o ácido peracético tem suas funções esporicida aumentadas com a elevação da temperatura e concentração (Block, 1991; Sagripanti e Bonifacino, 1996; Leaper, 1984). Experimentos realizados por Sagripanti e Bonifacino (1996), demonstraram o efeito da temperatura sobre os valores D em esporos de *B. subtilis* var. *globigii*, expostos ao ácido peracético 0,03%, conforme Figura 6.

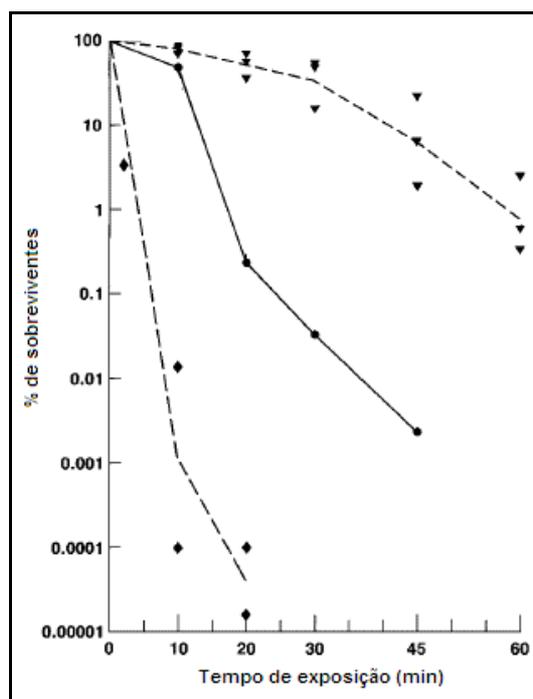


Figura 6 – Efeito da temperatura sobre esporos de *B. subtilis* var. *globigii* expostos a solução de ácido peracético 0,03%. 8°C (▼), 20°C (●) e 40°C (◆) (Swartling e Lindgren, 1968).

Na Tabela 3 são apresentados vários valores D, para testes com diferentes concentrações de ácido peracético em cepas de *Bacillus subtilis*.

Tabela 3 - Valores de D para diferentes concentrações e temperaturas de ácido peracético.

Organismo	Concentração (%)	T(°C)	D (min)	Referência
<i>B. subtilis</i> SA22	0,08	20	20	Leaper, 1984
<i>B. subtilis</i> SA22	0,10	20	4	Leaper, 1984
<i>B. subtilis</i> SA22	0,12	20	3	Leaper, 1984
<i>B. subtilis</i>	0,0168	20	24	Alasri, 1993
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC9372	0,30	25	0,28	Han <i>et al.</i> , 1980
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC9372	0,60	25	0,11	Han <i>et al.</i> , 1980
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC9372	1,00	25	0,042	Han <i>et al.</i> , 1980
<i>B. subtilis</i> sub. <i>niger</i> ATCC9372	0,03	20	10	Sagripanti e Bonifacino, 1996
<i>B. subtilis</i> sub. <i>niger</i> ATCC9372	0,03	40	2	Sagripanti e Bonifacino, 1996

Assim como o H₂O₂, o ácido peracético é comercializado tanto na forma de solução como na de vapor, em concentrações que vão de 0,1 a 1% (Block, 1991). Pode ser inativado simplesmente por diluição em uma base fraca, até pH 7,0, mas apresenta como desvantagem frente aos outros meios de esterilização, um odor residual bastante pronunciável (Alasri *et al.*, 1992; Sutton, 1996, Blakston *et al.*, 1999).

Abreu e Faria (2004) esterilizaram garrafas de PET obtendo de 4 a 7 reduções decimais na população de esporos de *B. subtilis* var. *globigii*, com soluções de ácido peracético em concentrações de 0,1 a 1,2%, sob aquecimento de 30 a 50°C.

2.8.3. Ácido peroctanóico

É um produto químico formado por uma mistura em equilíbrio de H₂O₂, ácido acético, e ácido octanóico. A maior eficácia do ácido peroctanóico em relação ao ácido peracético é atribuída a sua capacidade de alterar a membrana celular de células microbianas, que pode ser associado as suas características hidrofóbicas (Frank, 1999).

Todavia, por se tratar de um sanitizante relativamente novo, existem poucas pesquisas com o mesmo.

2.8.4. Toxicidade dos compostos peroxigenados

O H_2O_2 é um líquido límpido, incolor, com um odor suavemente ácido característico e com baixa toxicidade. Não é sistematicamente venenoso caso seja ingerido, pois é facilmente decomposto no intestino antes da absorção. Soluções concentradas são irritantes para a pele, mucosas e olhos. Os vapores podem causar inflamações no trato respiratório. Não é carcinogênico nem mutagênico. Roupas de proteção são suficientes para um seguro manuseio de soluções concentradas (até 35%), sendo facilmente removido com água, quando em contato com a pele (Bock, 1975).

O ácido peracético é um líquido límpido, incolor com um odor pungente, em solução contendo 40% ou menos de ácido peracético, sendo recomendado o uso de máscaras para o seu manuseio. A solução a 40% tem uma dose letal (LD_{50}) de 1540mg/kg para ratos (National Institute of Safety and Health, 1974 citado por Block, 1991). Mas uma solução a 35% de ácido peracético o vapor é lacrimojante e a inalação resulta em uma sensação anestésica das vias nasais. Também é um potente promovedor de tumores e um fraco agente carcinogênico (Block, 1991).

2.9. AGENTES FÍSICOS DE ESTERILIZAÇÃO

2.9.1. Radiação ultravioleta (UV)

A radiação UV tem sido empregada para redução da microbiota de superfícies de materiais utilizadas na embalagem de alimentos, seja em processos assépticos ou não (Yousef e Marth, 1988; Banwart, 1989; Huang e Toledo, 1982). A redução da microbiota de materiais para embalagem empregados em processo contínuo nas linhas de envase é

um fator importante para manutenção das características microbiológicas do produto, aumentando assim sua vida útil (Bachmann, 1975; Fluckiger, 1995; Yousef e Marth, 1988).

Estudos têm documentado a efetividade da radiação ultravioleta na destruição de microrganismos contaminantes de várias superfícies de materiais (Rowan et al., 1999; Sizer e Balasubramanian, 1999). Em testes efetuados com esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, observaram-se 3 a 4 reduções decimais, sendo o experimento conduzido nas seguintes condições: densidade do microrganismo de $1,4 \times 10^4$ UFC/cm², 10,5 cm de distância da fonte de radiação, dose de 30mWcm⁻² e tempo de irradiação de 1 segundo (Fluckiger, 1995).

A inativação dos microrganismos é expressa como um produto da intensidade (*I*) da energia germicida e do tempo (*t*) (Koninklijke, 2006):

$$K = I \times t$$

2.9.2. Mecanismo de ação da radiação ultravioleta

O espectro da radiação UV de grande interesse está compreendido entre 200 e 300nm, sendo esta região denominada abiótica. A atividade germicida é observada na faixa de 200 e 280nm, com pico em 254nm. No entanto, ocorre severo declínio na sua eficiência germicida entre 290 e 300nm, não apresentando ação acima de 300nm (Bachmann, 1975).

A ação da radiação ultravioleta sobre os microrganismos está relacionada com o comprimento de onda e a absorção deste pelos ácidos nucléicos ou de seus constituintes. Efeitos mutagênicos e retardo na divisão celular são causados por efeito da radiação UV nos ácidos nucléicos, sendo as bases pirimidínicas mais sensíveis à radiação UV que as bases púricas, considerando-se a transformação fotoquímica das bases pirimidínicas responsáveis pelos maiores efeitos mutagênicos e letais. A redução microbiana resultante

do uso de radiação UV é explicada por meio da formação de ligações entre pirimidinas sucessivas na fita de DNA, formando dímeros (Shechmeister, 1991 apud Silva, 2000).

2.10. EFEITO DO SINERGISMO DA RADIAÇÃO UV E DO H₂O₂

Catherine e Waites (1979) verificaram que a irradiação de esporos com lâmpada UVC ($\lambda=254\text{nm}$), na presença de H₂O₂ produziu uma rápida destruição de esporos, chegando a valores 2000 vezes maiores do que aqueles produzidos somente pela irradiação como única fonte de tratamento. A irradiação UV de esporos na presença de 2,5g/100mL de H₂O₂ produziu a morte de pelo menos 99,99% em 15 cepas de *Bacillus* e *Clostridium* examinadas. Na Tabela 4 e na Figura 7, pode-se observar esta interação entre o H₂O₂ e a radiação UV sobre os esporos estudados.

Tabela 4 – Interação esporocida da irradiação UV e do H₂O₂.

Organismo	Concentração (%)	T(°C)	Tempo (min)*	Referência
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i>	10,0	25	30	Wardle e Renninger (1975)
	1,0 + UV	20	0,5	Bayliss e Waites (1979)
<i>B. subtilis</i> 738	25,8	24	11	Toledo <i>et al.</i> , 1973
	1,0 + UV	20	0,5	Bayliss e Waites (1979)
<i>B. subtilis</i> 713	3,0	90	10	Toledo <i>et al.</i> , 1973
	2,5 + UV	20	0,5	Bayliss e Waites (1979)
<i>B. licheniformis</i> 109 2AO	15,0	80	2,1	Cerf e Metro (1977)
	2,5 + UV	20	0,5	Bayliss e Waites (1979)

*Tempo requerido para produzir a morte de 99,99% de uma suspensão $N^0=3 \times 10^7$ UFC/mL. Esporos irradiados por 30s a 5,5cm da lâmpada UVC.

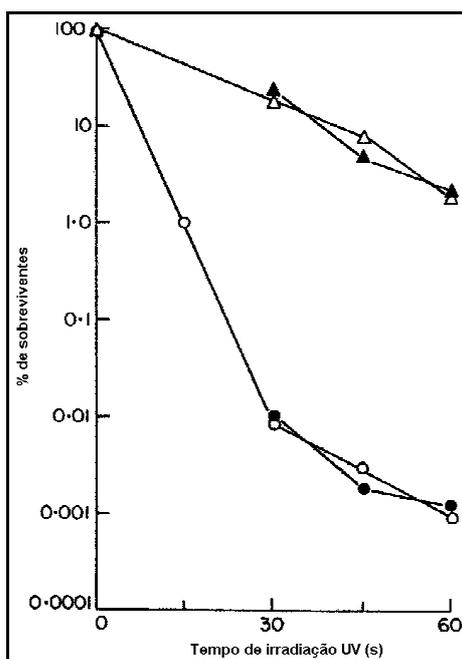


Figura 7 – Destruição de esporos de *B. subtilis* 706 por irradiação UV com H₂O₂. Irradiação por 60s com a lâmpada a 30cm acima da suspensão com (○,●) ou sem (Δ,▲) H₂O₂ (1%) (Catherine e Waites, 1979).

Estes dados demonstram a hipótese de que a utilização do H₂O₂ e lâmpadas UVC na esterilização de superfícies em diferentes temperaturas, obtêm-se uma efetividade do tratamento mais rapidamente. Confirmando-se assim o efeito sinérgico do H₂O₂ sobre a radiação UV e vice-versa.

2.11. *Bacillus subtilis*

É uma bactéria na forma de bastonete com flagelo, Gram positiva, podendo formar cadeias ou não. Seu endosporo pode ter de 0,8 a 1,65µm de tamanho e localiza-se na posição central. Em sua germinação, a bolsa de esporo quebra-se equatorialmente. Já suas colônias em agar são arredondadas ou irregulares, de superfície fina e opaca e de cor creme a marrom.

É um microrganismo móvel, catalase positiva, que produz ácidos a partir de arabinose, xilose e manitol; cresce em meios com 7% de NaCl, é alcalino em agar de sais de citrato e reduz o nitrato a nitrito. Em condições anaeróbias, encontra dificuldades de crescimento e tem como temperatura máxima de desenvolvimento, valores entre 45 a 55°C, e valores mínimos de 5 a 20°C (Bergey's, 1975).

É indicado como microrganismo-teste, na sua forma esporulada, para avaliação da eficiência de sanitizantes. Por sua resistência ser considerada 2,5 vezes maior que a dos esporos de *C. butulinum* na ação do H₂O₂, ele é bastante utilizado para testes com sistemas assépticos, bem como esporos de *Clostridium* não patogênicos. Pelo fato do ácido peracético ser também um agente peroxigenado, os esporos de *B. subtilis* são também utilizados para avaliar a eficiência deste sanificante (Toledo, 1975; Bernard *et al.*, 1990; Cremiux e Fleurette, 1991).

Para alimentos que possuem baixa acidez (pH ≥ 4,5) onde todo tipo de microrganismo pode-se desenvolver, a situação é mais crítica, pois é permitida a presença de 1 microrganismo vivo em um total de 10.000 embalagens (Buchner, 1993).

Dentre as linhagens de *B. subtilis* mais utilizadas, destaca-se o *B. subtilis* var. *globigii* (ou *niger*) ATCC9372 (NCIB 8058; NRS 1221A [CIP77.18]; DMS 675; IFO 13721; IFO 16183), sendo considerada a segunda mais resistente ao peróxido, portanto a mais utilizada (Toledo *et al.*, 1973; Han *et al.*, 1980; Smith e Brown, 1980; Sagripanti e Bonifacino, 1996).

Como a linhagem mais resistente a ação dos peroxigenados, tem-se o *B. subtilis* SA22 (Toledo *et al.*, 1973; Leaper, 1984).

O *Bacillus subtilis* var. *globigii* ATCC9372 é o mais recomendado para a realização dos ensaios, por sua disponibilidade nos bancos de cultura e também pela disponibilidade na literatura para estudos comparativos de desempenho (Abreu, 2001).

2.12. VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DE ESTERILIZANTES

Existe um grande número de metodologias para a avaliação da eficácia de sanitizantes ou de antimicrobianos em geral, sendo que sua escolha baseia-se nos seguintes fatores: grau de severidade requerida; material a ser analisado; tipo de microrganismo e tempo disponível (Berube e Oxborrow, 1991; Egush e Massaguer, 1995).

Dentre as metodologias, no teste de contato e enumeração, células ou esporos são tratados com diferentes concentrações do antimicrobiano, seguido de plaqueamento. As condições de contato, entre o antimicrobiano e o microrganismo-teste, podem ocorrer de duas maneiras: por suspensão, onde o inóculo é dissolvido em um grande volume de antimicrobiano; ou por meio de inoculação em superfície, onde o antimicrobiano é aplicado a esta superfície por *spray*, imersão ou abrasão. Este teste é perfeitamente adaptável para alcançar os objetivos de experimentos específicos (Cremiux e Fleurette, 1991; Eguxh e Massaguer, 1995; Sutton, 1996).

Nos testes onde se faz a enumeração de microrganismos sobreviventes, é importante a eliminação do residual antimicrobiano, para evitar interpretações equivocadas, pois baixos teores deste podem induzir modificações fisiológicas irreversíveis sobre os microrganismos injuriados sub-letalmente, impedindo o seu crescimento, dando falsos negativos. A eliminação dos resíduos pode ser feita por neutralização química, diluição em níveis sub-inibitórias ou por filtração em membrana. O neutralizante a ser utilizado depende do tipo de antimicrobiano que se está utilizando (Cremiux e Fleurette, 1991; Egush e Massaguer, 1995; Sutton, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados nos Laboratórios de Embalagem, de Microbiologia e Instrumentação e na Planta Piloto do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material de embalagem

Os experimentos foram conduzidos com filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) pigmentados com dióxido de titânio (TiO₂), adquiridos da Plastunion Indústria de Plásticos Ltda, Caieiras – SP, na forma de bobina. A impressão foi elaborada com 1 padrão de cor azul de 200x150mm sobre a bobina. Tal bobina foi especificada com largura de 300mm, espessura de 60µm, gramatura de 61g/m² e passo-da-fotocélula de 240mm.

3.1.2. Solução de esterilização

A solução estoque de peróxido de hidrogênio – Asepticper® (H₂O₂), com 35% de concentração, foi fornecida pela Peróxidos do Brasil Ltda, São Paulo-SP.

3.1.3. Sistema de esterilização e envasadora

O sistema de esterilização, ilustrado pelas figuras 8, 9 e 10, foi construído em aço inoxidável AISI 304, sendo composto por um suporte para bobina de PEBD acoplado a um tanque para o tratamento químico do filme. As dimensões do tanque foram de 670 x 340 x 300mm, apresentando um rolete para posicionamento do filme com 30mm de

diâmetro e fixado entre as suas paredes laterais e a 50mm do seu fundo. O ajuste da temperatura para o aquecimento da solução de H_2O_2 foi realizado por meio de uma resistência elétrica, controlada analogicamente com reostato e mensurada por meio de um termômetro digital Delta OHM modelo HD9215.

O filme de PEBD foi movimentado por uma envasadora automática com capacidade nominal de 300L/h. Tal envasadora consiste em uma máquina automática do tipo forma, fecha e enche, fabricada pela Sumá Industria e Comércio Ltda, Campinas – SP, possuindo em seu interior uma lâmpada UV, descrita no item 3.1.5. Este tipo de lâmpada UV é tipicamente empregado em equipamentos de embalagem para envase de leite pasteurizado em sacos de PEBD.

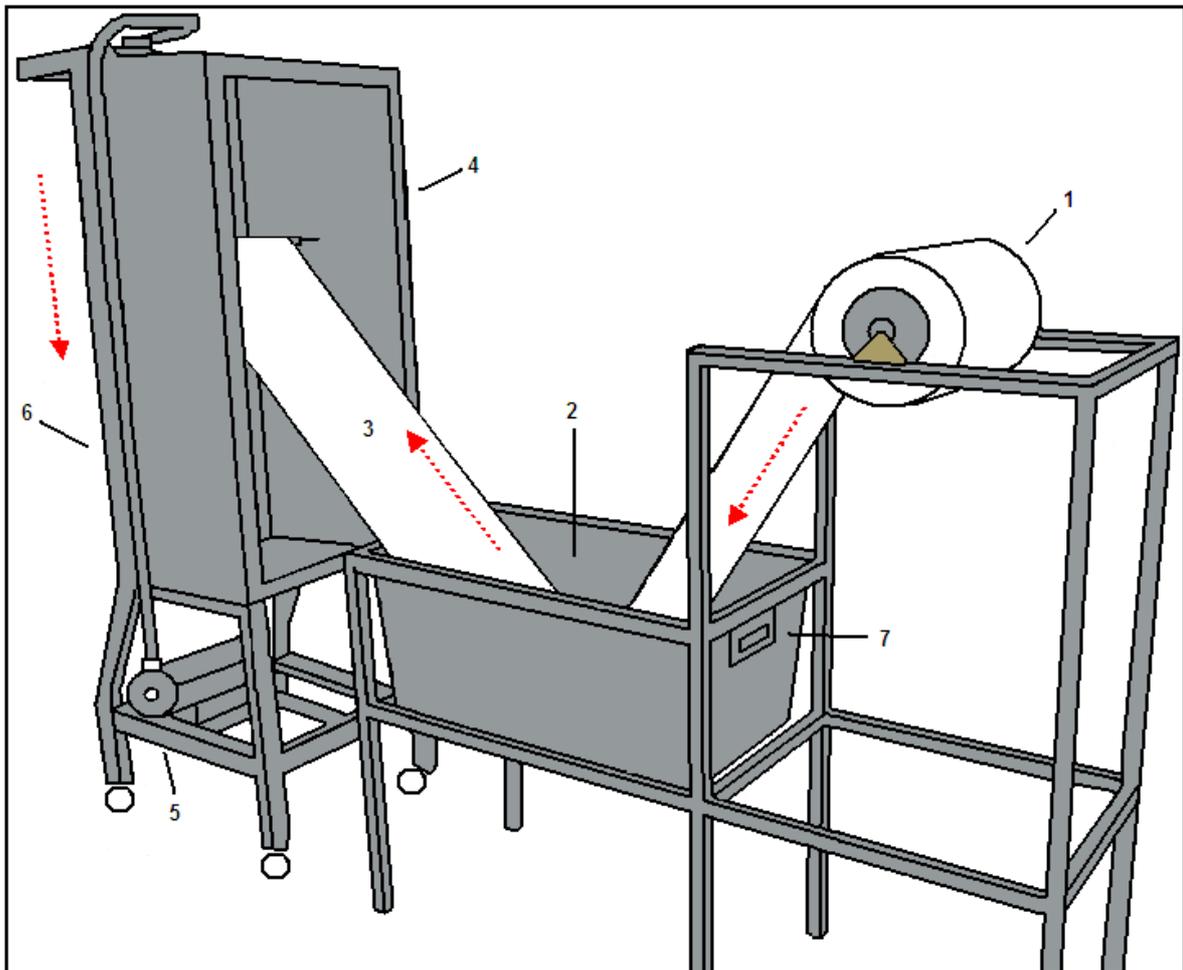


Figura 8 – Design do sistema de esterilização.

1. Bobina de polietileno de baixa densidade;
2. Reservatório de peróxido de hidrogênio;
3. Filme de PEBD esterilizado;
4. Envasadora automática com sistema de radiação UV;
5. Bomba centrífuga;
6. Envase do produto;
7. Controle de temperatura do banho de peróxido de hidrogênio.



Figura 9 – Sistema de esterilização de filme de PEBD, com H₂O₂ e radiação UV.

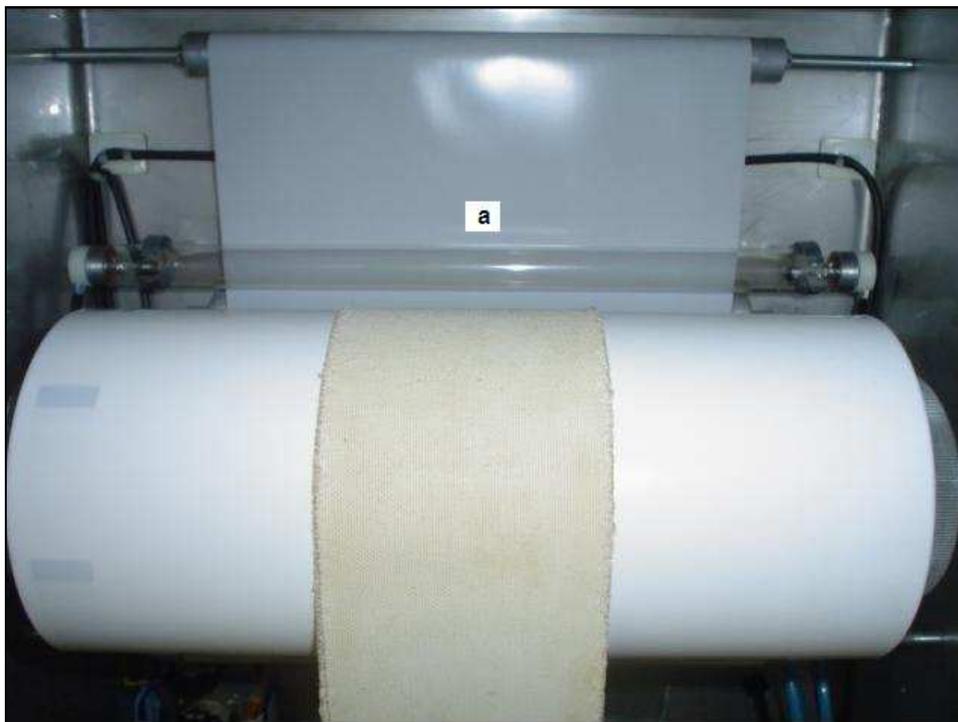


Figura 10 – Interior da envasadora automática: a) lâmpada de radiação UV, a 2,5cm da superfície-teste de PEBD.

3.1.4. Microrganismo de inoculação

Foi utilizada uma cultura de esporos de *Bacillus subtilis* var. *globigii* ATCC9372 do Banco de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. Esta cultura é mantida estocada no Laboratório de Microbiologia e Instrumentação em frascos de vidro com água estéril, a temperatura de 10°C.

3.1.5. Lâmpada Ultravioleta

Foi utilizada lâmpada TUV 15W T5 fornecida pela Philips do Brasil Ltda, São Paulo – SP, com especificação: vida útil de 8000h; depreciação de 15% na intensidade após 8000h; intensidade de 48 μ W/cm² a 1m de distância da fonte e pico de comprimento de onda em 253,7nm.

3.1.6. Enzima catalase para neutralização

Enzima com atividade de 9x10⁵U/mL, fornecidas pela Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo-SP, para neutralização do H₂O₂ residual do filme de PEBD.

3.1.7. Água mineral

Foi utilizada para ser envasada em embalagens de PEBD de 1000mL esterilizadas, destinadas à análise sensorial. Água mineral natural de garrafões de 20L da marca “Serra Negra”, fonte Santa Maria I, Serra Negra – SP, lote do dia 10 de novembro de 2006.

3.2. MÉTODOS

O estudo foi dividido em três experimentos. O experimento 1 consistiu na avaliação da influência de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem, bem como a determinação do residual de H₂O₂ no produto

envasado. No experimento 2, fez-se a avaliação da eficácia do agente físico e químico na esterilização de filme de PEBD inoculado com *Bacillus subtilis*. No experimento 3, avaliaram-se sensorialmente amostras de água mineral envasadas no filme de PEBD esterilizado, com a finalidade de verificar se os provadores seriam capazes de detectar sabor ácido, proveniente do residual de H₂O₂.

3.2.1. Experimento 1 – Avaliação da influencia de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem

Avaliação da influência de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem, bem como a determinação do residual de H₂O₂ no produto envasado.

A Figura 11 apresenta o diagrama de tratamento do filme de PEBD com H₂O₂, diferenciando-se quanto a concentração da solução e temperatura do banho de imersão e exposição ou não à radiação UV.

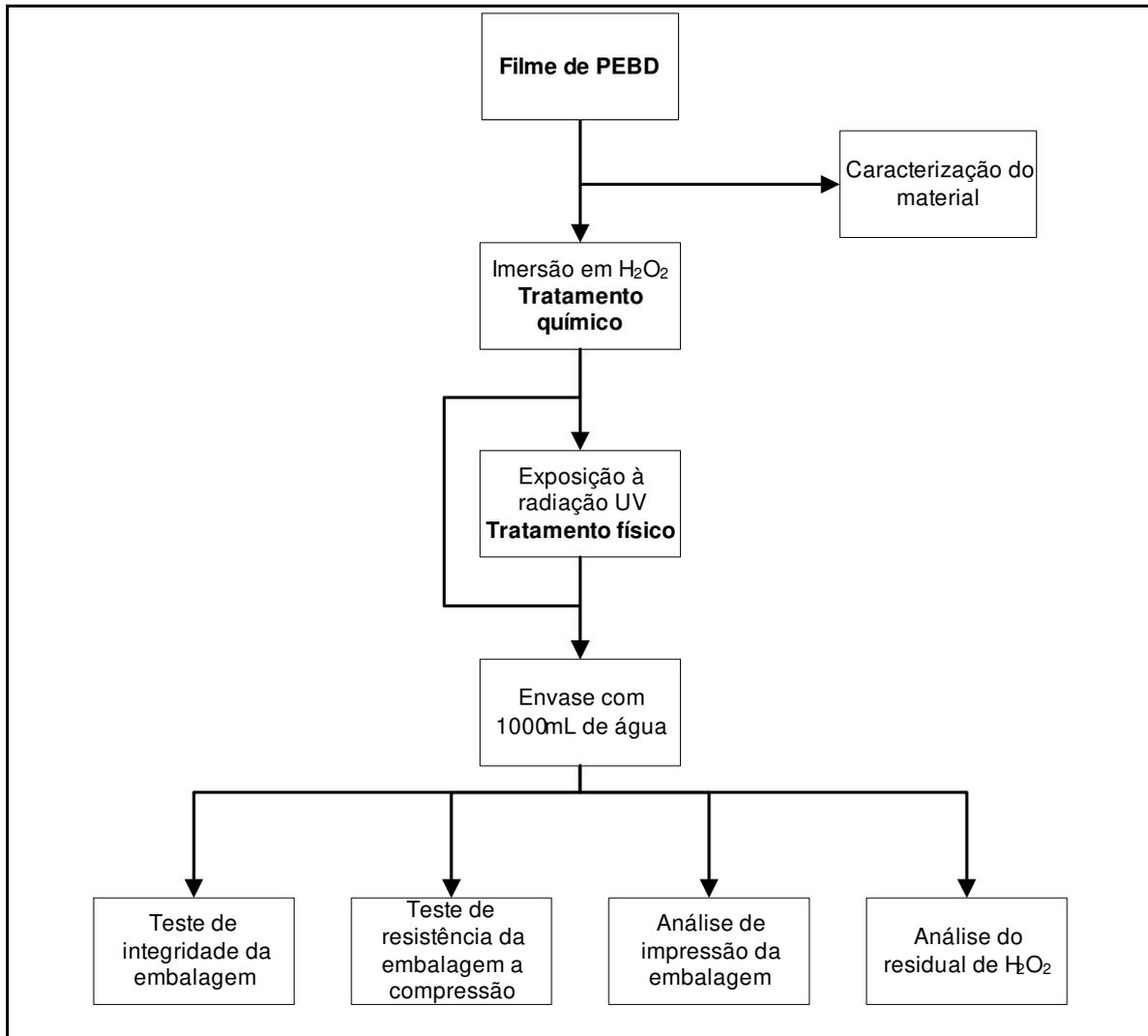


Figura 11 – Diagrama do Experimento 1 – Avaliação da influência de tratamentos de descontaminação do filme de PEBD em propriedades físicas da embalagem.

3.2.1.1. Caracterização do material

O filme de PEBD foi caracterizado pela análise de espessura (ASTM D 374-99, 1999) e gramatura (ASTM D646-96, 2001).

3.2.1.2. Preparo e análise das soluções de H₂O₂

As soluções de H₂O₂ foram preparadas de acordo com as instruções recomendadas pelo fornecedor (Peróxidos do Brasil Ltda), nas concentrações de 5, 15, 25 e 35%. A metodologia analítica para dosagem de H₂O₂ baseia-se em análises de permanganometria (Solvay, 2005).

Os cálculos para preparação das soluções foram realizados a partir da equação:

$$C_f \times V_f = C_i \times V_i$$

onde:

C_i e C_f = concentração inicial e final;

V_i e V_f = volume inicial e final.

A determinação da concentração foi realizada, em triplicata, antes, durante e após cada ensaio experimental, sendo preparados 35L de solução por experimento.

3.2.2. Tratamentos

Os tratamentos foram conduzidos em um sistema descrito no item 3.1.3. Os filmes de PEBD foram imersos em banhos de H₂O₂ com diferentes concentrações e temperaturas, sendo expostos ou não à radiação UV.

A concentração inicialmente testada de H₂O₂ foi de 35%, passando por 25 e 15%, até chegar à concentração final de 5%, sendo o tempo de imersão dos filmes de PEBD fixado em 16s. Estas concentrações foram estabelecidas visando uma varredura pelas

concentrações de H₂O₂ comumente empregadas em sistemas assépticos, além de facilitar a realização de estudos comparativos disponíveis na literatura. Cada tratamento foi realizado nas temperaturas de 23, 35, 47, 58 e 70°C, as quais foram definidas na faixa compreendida entre a do ambiente e a de operação segura com o H₂O₂, com intervalos de 12°C entre elas para uma maior coleta de dados experimentais.

A lâmpada UV descrita no item 3.1.5 foi ligada 20min antes do início dos ensaios experimentais e os filmes foram expostos a uma radiação média de 261μWcm⁻² por 8s. Os cálculos de intensidade de radiação estão descritos no item 3.2.6.

Após o tratamento do filme de PEBD, ocorreu o acondicionamento de 1.000mL de água potável, através da máquina envasadora. Para cada ensaio foram produzidas 41 embalagens, sendo descartadas as 20 primeiras e selecionadas as 21 amostras restantes para as análises.

Para os tratamentos químicos foram estudados o binômio concentração e temperatura da solução de H₂O₂ e para os tratamentos combinados o trinômio concentração, temperatura da solução de H₂O₂ e exposição à radiação UV.

3.2.3. Determinações experimentais

3.2.3.1. Teste de integridade da embalagem

A avaliação da integridade da embalagem foi realizada através do exame visual das soldas transversais e longitudinal, bem como pelo ensaio de emissão de bolhas, segundo ASTM E 515-95 (1995), utilizando-se um kit de vácuo/pressão (Faria, 2004).

3.2.3.2. Teste de resistência da embalagem à compressão

A resistência da embalagem à compressão até ocorrência de falha (estouro) foi realizada de acordo com a metodologia ASTM D642 (2000) em uma Máquina Universal

de Ensaio CML, modelo D.1804-C, com célula de carga modelo Z250 e probe construído em madeira com dimensões de 290 x 110 x 60mm.

Três amostras dos tratamentos químicos e combinados foram testadas.

O perfil de resistência das embalagens incluindo a força de ruptura (kgf) e o tempo (s), foram registrados em um microcomputador.

3.2.3.3. Análise da impressão da embalagem

A análise da impressão das embalagens foi realizada pelo exame visual e posterior avaliação da cor, utilizando-se um colorímetro Hunterlab (*Colorquest II*). Foi feita uma comparação entre a porcentagem de opacidade de três amostras padrão (sem tratamento) com três amostras tratadas. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

3.2.3.4. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio

A determinação do residual de H_2O_2 produto envasado (água potável) foi realizada por colorimetria em fita indicadora da concentração de H_2O_2 (*Merckoquant*, Merck). Esta fita possui uma escala de concentração que varia de 0 a 25mg/L, com intervalos de 0,5mg/L. Com uma escala padrão de cores variando do branco (0mg/L) ao verde escuro (25mg/L). Elas foram mais indicadas para o uso durante o processamento, devido a rapidez da resposta, facilidade no manuseio e confiança nos resultados.

Doze embalagens de 1000mL de água, imediatamente após o tratamento, foram avaliadas. Uma fita indicadora de H_2O_2 foi introduzida na embalagem aberta, e após 15 segundos foi comparada com a escala padrão de cores, que quanto mais tendesse para a cor branca indicaria um menor residual de peróxido.

3.2.4. Planejamento e análise estatística

Foram realizados 4 ensaios, com 4 diferentes concentrações de H₂O₂ (5, 15, 25 e 35%). Para cada tratamento foram aplicadas 5 diferentes temperaturas (23, 35, 47, 58 e 70°C), com ou sem exposição à radiação UV.

Foram produzidas 41 embalagens para cada temperatura sendo as primeiras 20 descartadas e o restante submetido às avaliações em triplicata. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para verificar se os tratamentos foram estatisticamente diferentes. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, sendo a diferença mínima estabelecida no nível de 5% de significância. Os cálculos foram realizados através do programa STATISTICA, versão 6.0.

3.2.5. Experimento 2 – Avaliação da eficácia do H₂O₂ e da radiação UV na esterilização de filme de PEBD inoculado com *Bacillus subtilis*

Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos na esterilização de filme de PEBD inoculado com *Bacillus subtilis*. Os dados foram utilizados para a geração de um modelo matemático para o cálculo das condições operacionais para esterilização de filme de PEBD.

3.2.5.1. Planejamento experimental

Com o objetivo de avaliar a eficiência do sistema de esterilização, utilizou-se uma seqüência de experimentos, determinada segundo a metodologia de planejamento experimental fatorial (Rodrigues e Lemma, 2005). Foram consideradas três variáveis independentes: tempo de contato com a solução de H₂O₂ (s), temperatura do banho de H₂O₂ (°C) e concentração da solução de H₂O₂ (%). Cada ensaio do planejamento foi realizado de duas formas, com e sem exposição à radiação UV. A resposta mensurável

(variável dependente), foi em função do número de reduções decimais de esporos (γ), conforme abaixo:

$$\gamma = -\log \frac{N}{N_0}$$

onde:

γ = número de reduções decimais;

N_0 = número de UFC/superfície-teste inicial;

N = número de UFC/superfície-teste final.

3.2.5.2. Planejamento fatorial completo

Executou-se um planejamento fatorial completo 2^3 , com 2 níveis (-1; +1), 4 pontos centrais (0) e 6 pontos axiais (- α ; + α), totalizando 18 ensaios. Esta etapa teve como objetivo determinar os efeitos das variáveis, fornecendo também indicações sobre a eficiência dos valores escolhidos para cada uma, bem como as condições de esterilização mais adequada para o sistema.

O delineamento e a matriz do planejamento fatorial completo, estão demonstrados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Delineamento das variáveis do planejamento fatorial completo 2^3 .

Níveis	- 1,68 (- α)	-1	0	1	1,68 (+ α)
Tempo (s)	5	8	12	16	19
Temperatura (°C)	23	32	46	60	70
H ₂ O ₂ (%)	0	7	18	28	35

Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial completo 2³.

Ensaio	t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)
1	8 (-1)	32 (-1)	7 (-1)
2	16 (+1)	32 (-1)	7 (-1)
3	8 (-1)	60 (+1)	7 (-1)
4	16 (+1)	60 (+1)	7 (-1)
5	8 (-1)	32 (-1)	28 (+1)
6	16 (+1)	32 (-1)	28 (+1)
7	8 (-1)	60 (+1)	28 (+1)
8	16 (+1)	60 (+1)	28 (+1)
9	5 (- α)	46 (0)	18 (0)
10	19 (+ α)	46 (0)	18 (0)
11	12 (0)	23 (- α)	18 (0)
12	12 (0)	70 (+ α)	18 (0)
13	12 (0)	46 (0)	0 (- α)
14	12 (0)	46 (0)	35 (+ α)
15	12 (0)	46 (0)	18 (0)
16	12 (0)	46 (0)	18 (0)
17	12 (0)	46 (0)	18 (0)
18	12 (0)	46 (0)	18 (0)

3.2.5.3. Preparo da suspensão de esporos

Foi utilizada uma cultura de esporos de *Bacillus subtilis* var. *globigii* ATCC9372, provenientes de estudos realizados por Abreu (2001), obtida do Banco de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP, em ampola de vidro de 5g.

A suspensão foi armazenada a 4°C e para sua utilização, foram feitas a identificação, caracterização e quantificação da carga de esporos (Abreu, 2001).

3.2.5.4. Esterilização das superfícies-teste de PEBD

A metodologia utilizada foi adaptada de Abreu (2001) e Walter (2005). Os esquemas a seguir, dividido em fases 1 e 2, complementa e auxilia a compreensão do teste empregado na avaliação da superfície-teste tratada assepticamente, de acordo com as Figuras 12 e 13.

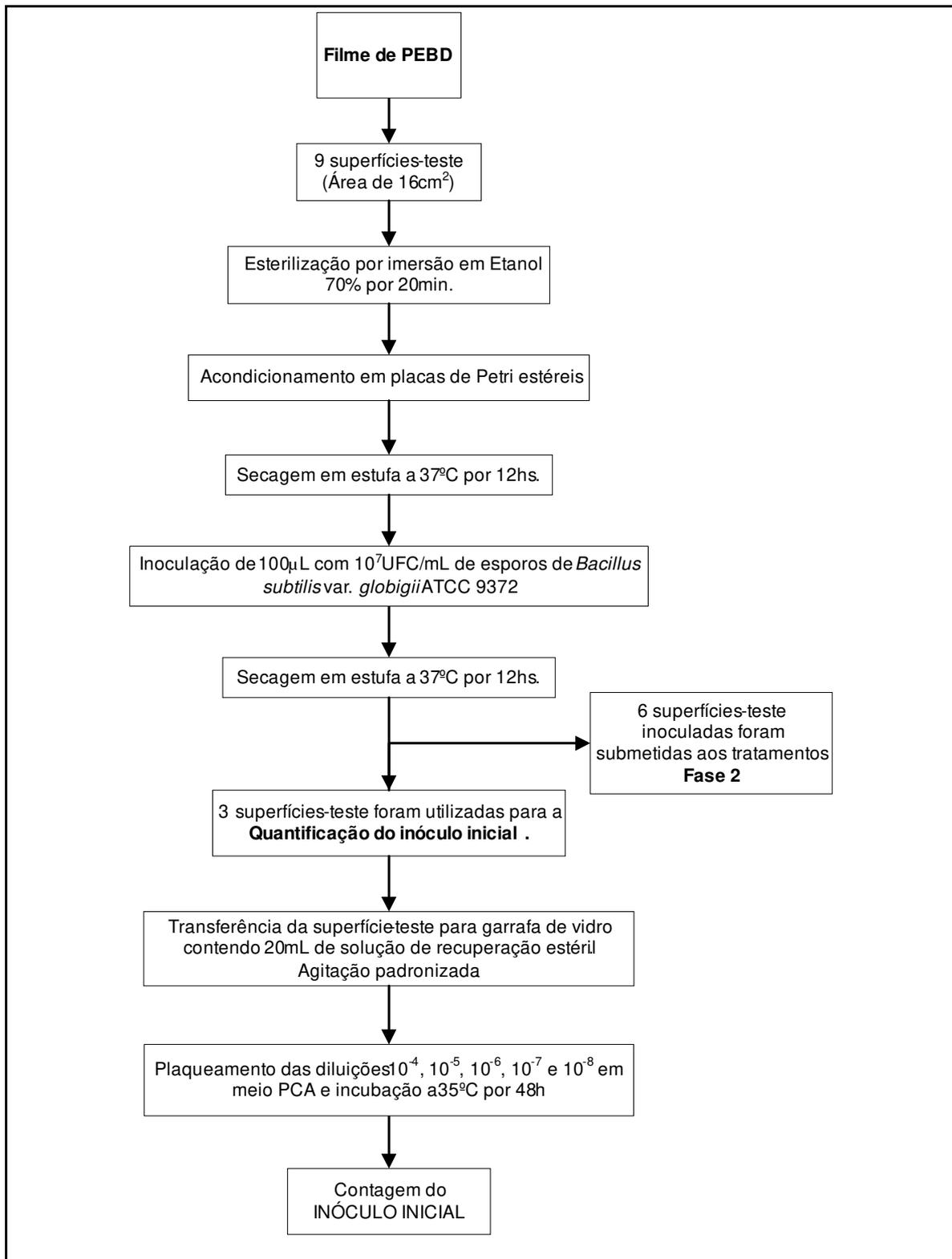


Figura 12 – Fluxograma da Fase 1 do procedimento para preparo, inoculação e quantificação de esporos de *Bacillus subtilis* inoculados nas superfícies-teste de PEBD.

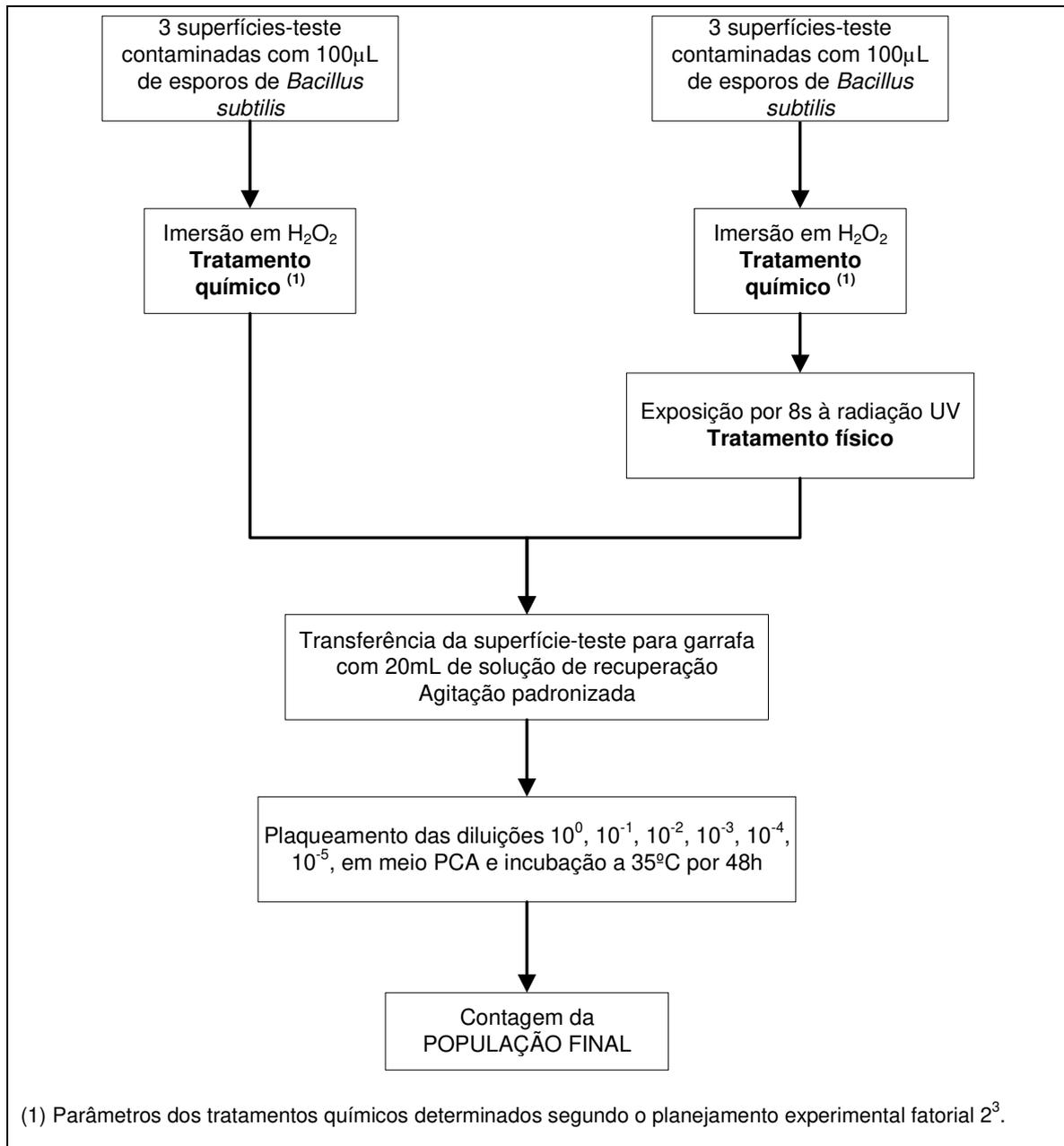


Figura 13 – Fluxograma da Fase 2 da avaliação da eficiência dos tratamentos químicos com H₂O₂ e combinados com H₂O₂ e exposição à radiação UV sobre superfícies-teste inoculadas com esporos de *Bacillus subtilis*.

A superfície-teste de PEBD consistiu num corpo de prova com dimensão de 40 x 40mm, amostrada aleatoriamente da bobina de PEBD, que serviu para inoculação do microrganismo-teste e avaliação dos tratamentos de esterilização. As superfícies-teste foram previamente sanificadas com etanol 70% por 20min. Em seguida as superfícies-teste foram colocadas em placa de Petri estéreis montadas com papel filtro estéril em seu interior, e transferidas para uma estufa a 37°C, sendo mantida nesta condição por 12h para evaporação do etanol. Este procedimento foi realizado assepticamente em câmara biossegura do tipo fluxo laminar.

Para a exposição das superfícies-teste no Experimento 2, foi utilizado um modelo (Figura 14) que reproduziu as características e condições do sistema de irradiação com radiação UV da máquina de envase de líquidos, descrita no item 3.1.3.

Juntamente a este teste, foi realizada uma contagem total, da contaminação inicial de 10 superfícies-teste, por imersão em 20mL de água estéril, e posterior plaqueamento de 1mL de diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em meio de contagem padrão PCA (*Plate Count Agar*), a 35°C por 48h.

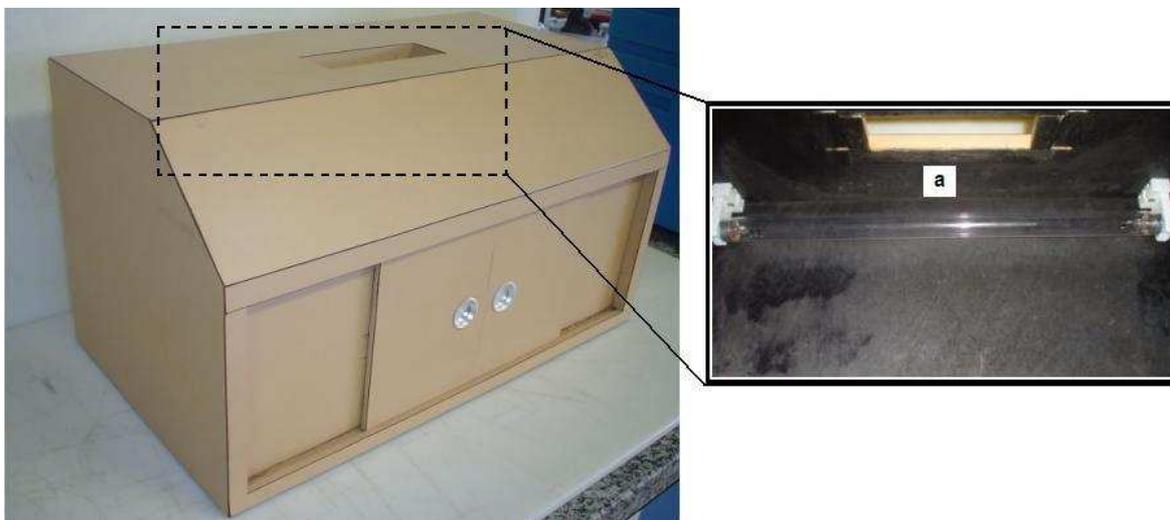


Figura 14– Módulo para exposição das superfícies-teste à radiação UV: a) disposição da lâmpada de radiação UV no interior do modelo, a 2,5cm da superfície-teste de PEBD.

3.2.5.5. Inoculação das superfícies-teste de PEBD

Conforme os fluxogramas das Figuras 12 e 13, em fluxo laminar, a suspensão de esporos foi inoculada com uma população inicial em níveis de 10^7 UFC na superfície-teste. A inoculação foi realizada com o auxílio de uma micropipeta, pela aplicação de um volume de $100\mu\text{L}$ da suspensão de esporos, correspondendo a um número de 20 gotículas, sobre a área central de dimensão $20 \times 20\text{mm}$ da superfície-teste. Esta superfície-teste, contida em placa de Petri preparada com papel filtro estéril, foi levada para uma estufa para secagem a 37°C por 12h.

Quantificação do inóculo inicial – três superfícies-teste foram separadas para quantificação do inóculo inicial. Conforme a metodologia ABNT (NBR 14637, 2001), inicialmente, cada superfície-teste foi submetida a um procedimento de recuperação dos esporos. Esta operação foi realizada pela transferência da superfície-teste, com o auxílio de uma pinça estéril, para uma garrafa de vidro estéril contendo 20mL de solução de recuperação conforme item 3.2.5.9, seguida pela agitação vigorosa da garrafa, por um período de 1min em sentido horário, 1min em sentido anti-horário e 1min em um agitador mecânico do tipo *vortex* para remoção dos esporos.

De cada uma das 3 garrafas, foi retirado uma alíquota de 1mL e preparada as diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , sendo estas posteriormente plaqueadas em superfície, em duplicata, em meio padrão PCA e incubadas a 35°C por 48 horas (NBR 14637, 2001). Em seguida, os esporos foram contados e calculou-se o log de UFC/superfície-teste inicial (N_0) de cada superfície-teste.

3.2.5.6. Tratamento das superfícies-teste de PEBD

Conforme fluxogramas das Figuras 12 e 13, cada superfície-teste foi transferida com auxílio de pinças estéreis para dentro do recipiente contendo a solução de H_2O_2 ,

seguindo os parâmetros de tempo, temperatura e concentração determinados pelo planejamento experimental. No tratamento combinado de H₂O₂ com radiação UV, após o tratamento químico as superfícies-teste foram retiradas da solução de H₂O₂ e expostas imediatamente à radiação UV. Em seguida, as superfícies-teste passaram pela etapa de quantificação de esporos sobreviventes.

3.2.5.7. Preparo da solução de recuperação

Formulou-se uma solução de recuperação com aproximadamente 0,8mg/mL de catalase (Abreu, 2001).

Cada 20mL de solução de recuperação, foi preparada a partir de 18mL de solução de tiosulfato de sódio 0,5% estéril (Alasri *et al.*, 1992) e 2 mL de solução de catalase, preparada a partir de 100µL de enzima catalase Sigma-Aldrich, e 11,9mL de fosfato de potássio 0,05M a pH 7,2, esterilizada com filtro Millipore Millex GV, de 0,22µm e 25mm de diâmetro.

Tais alíquotas de solução de recuperação foram preparadas no dia dos processamentos, anterior a realização destes, sendo mantidas em geladeira. Desta forma, cada alíquota de 20mL continha o equivalente a 15.000 unidades de catalase (Luck, 1971).

3.2.5.8. Quantificação de esporos sobreviventes

A quantificação dos esporos sobreviventes foi realizada conforme a norma ABNT NBR 14637 (2001).

A recuperação dos esporos foi realizada conforme procedimento descrito no item 3.2.5.5 (*Quantificação do inóculo inicial*).

De cada uma das 6 garrafas (3 H₂O₂ e 3 H₂O₂ + UV), foi retirado uma alíquota de 1mL e preparada as diluições 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵, sendo estas posteriormente

plaqueadas em superfície, em duplicata, em meio padrão PCA e incubadas a 35°C por 48 horas (NBR 14637, 2001). Em seguida, os esporos foram contados e calculou-se o log de UFC/superfície-teste final (N) de cada superfície-teste.

3.2.5.9. Preparo e análise das soluções de peróxido de hidrogênio

As soluções foram preparadas e analisadas conforme o item 3.2.1.2.

Para realização dos tratamentos, foram utilizados recipientes estéreis contendo 300mL de solução de H₂O₂ na concentração desejada preparadas com água filtrada e esterilizada. A solução de H₂O₂ foi diluída às respectivas concentrações indicadas no planejamento experimental.

As soluções foram analisadas antes do processamento, quanto a sua concentração de H₂O₂ segundo métodos de permanganometria (Solvay, 2005).

3.2.5.10. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio

As seis garrafas, dos ensaios com e sem radiação UV, contendo as superfícies-teste e a solução de recuperação foram avaliadas conforme o item 3.2.3.4.

3.2.5.11. Verificação da atividade da solução de recuperação

Foi realizado o “*Teste em Branco*” descrito por Sutton (1996). Inoculou-se 1mL de uma suspensão de esporos com carga de 2x10²UFC/mL, juntamente com 18,8mL da solução de recuperação e 0,2mL de água estéril. Este teste objetivou a avaliação individual da capacidade de inibição do crescimento microbiano pela solução neutralizante. Uma contagem de 2x10²UFC ao final do teste indica a inocuidade do neutralizante.

3.2.5.12. Testes de identificação do *Bacillus subtilis*

Foram realizados os seguintes testes para a confirmação da cepa de *B. subtilis*: coloração de Gram; coloração de esporos; catalase, motilidade, arabinose, citrato; crescimento a 40°C; crescimento em 7% de NaCl; redução de nitrato; crescimento anaeróbico (Gallo, 1990; Gerhardt *et al.*, 1981; Abreu, 2001).

3.2.5.13. Teste da evaporação do etanol

Três superfícies-teste foram esterilizadas com etanol segundo item 3.2.5.4 e inoculadas com 100µL de uma suspensão de 2×10^2 UFC/mL. Posteriormente foram secas conforme metodologia descrita no item 3.2.2.4, fazendo posterior contagem de esporos em meio PCA. Este teste objetivou a avaliação se um possível residual de etanol proveniente da esterilização, presente devido a sua parcial evaporação, poderia ter efeito inibitório sobre os esporos na superfície-teste.

3.2.6. Intensidade da radiação ultravioleta

A intensidade da radiação ultravioleta emitida pela lâmpada foi determinada após cada ensaio determinado no planejamento fatorial completo. Empregou-se para essas medidas um medidor de exposição Optical Associates Inc (OAI), modelo 1830-C, apresentando medida de tempo igual a 1/300s, potência de $180.000 \mu\text{Wcm}^{-2}$, acoplado a um espectrômetro Ocean Optic com resposta espectral de pico em comprimento de onda de 360nm. Os resultados das leituras do medidor foram recalculados para faixa de comprimento de onda de 240 a 260nm, empregando-se a seguinte fórmula (Koninklijke, 2006):

$$L_{240 \text{ a } 260} = L_{360} \times 0,6$$

onde:

$L_{240 \text{ a } 260}$ = leitura na faixa de 240 a 260nm;

L_{360} = leitura feita pelo medidor a 360nm;

0,6 = fator de transformação da leitura a 360nm para a faixa de 240 a 260nm, determinado pela curva de calibração do sensor.

Os resultados foram expressos em μWcm^{-2} .

Tal avaliação foi realizada como controle da emissão de radiação das lâmpadas UV, antes, durante e após a realização dos experimentos, conforme recomendação do fabricante.

3.2.7. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa *Statistic*, versão 6.0, possibilitando a obtenção de superfícies de resposta e curvas de nível ajustadas por regressão.

3.2.3. Experimento 3 – Avaliação sensorial

Para a avaliação sensorial, foram tomadas, como ponto de partida, amostras equivalentes ao ensaio onde se obteve mais do que 5 reduções decimais nos testes de esterilização, especificado no planejamento fatorial completo 2^3 . Foram produzidas 12 embalagens em tais condições, utilizando água mineral como produto de envase.

A partir de um número inicial de 23 provadores, selecionaram-se 13 que apresentaram maior habilidade em avaliar a intensidade de gosto ácido, em soluções aquosas de ácido cítrico (0,02 e 0,04%), através do teste “Diferença do controle”. Foi

solicitado aos provadores que comparassem três amostras com um padrão de água mineral, em copos descartáveis codificados com três dígitos, contendo 15mL de amostra a 22°C. Os provadores foram escolhidos pelo seu poder discriminativo ($p < 0,05$) e por sua concordância com a equipe (Bellarde *et al.*, 1995; Silva e Damásio, 2000).

Após a seleção dos provadores, aplicou-se novamente o teste de “Diferença do controle” utilizando-se as amostras de água mineral, divididas em duas seções (1ª e 2ª), com 3 amostras cada. As fichas de análise utilizadas estão apresentadas nos Anexos 1 e 2.

Análise estatística dos dados – os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa *Microsoft® Excel 2000*, versão 9.0.3821 SR-1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE TRATAMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO DO FILME DE PEBD EM PROPRIEDADES FÍSICAS DA EMBALAGEM

4.1.2. Caracterização do material de embalagem

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos de espessura e gramatura do filme de PEBD utilizado neste estudo. A espessura e a gramatura influenciam as propriedades mecânicas e de barreira do filme de PEBD, bem como no seu ajuste ao equipamento e na termosoldagem da embalagem. No acondicionamento de leite pasteurizado são usados filmes com espessura nominal na faixa de 60 a 80 μ m.

O filme de PEBD apresentou furos visíveis em algumas seções da bobina, ao longo das suas bordas. Tais furos podem ter sido provocados devido a falhas no processo de sopro, durante o processo de fabricação (Faria, 2006).

Tabela 7 – Espessura e gramatura do filme de PEBD.

Parâmetro	Valor médio*	Desvio padrão
Espessura (μ m)	60,88	1,79
Gramatura (g/m^2)	61,94	0,61

*média de 25 determinações.

4.1.3. Preparo e análise das soluções esterilizantes

Avaliando-se as soluções antes, durante e após os ensaios, observa-se os resultados segundo as Tabelas 8, 9, 10 e 11.

Tabela 8 – Concentração de H_2O_2 no banho de imersão durante o tratamento químico com 5% de H_2O_2 .

Período	Valores da concentração do H_2O_2 (g/100mL)					Média
	23°C	35°C	47°C	58°C	70°C	
Início (0min)	5,12	5,10	4,94	5,03	5,09	5,06
Meio (30min)	5,07	5,09	5,03	5,00	5,66	5,17
Fim (60min)	5,13	5,12	4,97	5,02	4,45	4,94
Média	5,11	5,10	4,98	5,02	5,07	5,05
Desvio Padrão	0,02	0,01	0,04	0,01	0,49	

Tabela 9 – Concentração de H_2O_2 no banho de imersão durante o tratamento químico com 15% de H_2O_2 .

Período	Valores da concentração do H_2O_2 (g/100mL)					Média
	23°C	35°C	47°C	58°C	70°C	
Início (0min)	15,24	15,18	15,13	14,32	15,24	15,02
Meio (30min)	15,52	15,18	15,08	15,43	15,18	15,28
Fim (60min)	15,40	15,17	15,00	14,95	15,01	15,11
Média	15,39	15,18	15,07	14,90	15,14	15,14
Desvio Padrão	0,10	0,00	0,05	0,46	0,10	

Tabela 10 – Concentração de H_2O_2 no banho de imersão durante o tratamento químico com 25% de H_2O_2 .

Período	Valores da concentração do H_2O_2 (g/100mL)					Média
	23°C	35°C	47°C	58°C	70°C	
Início (0min)	25,87	25,32	25,81	25,16	24,87	25,41
Meio (30min)	25,56	25,43	25,67	24,89	24,91	25,29
Fim (60min)	25,56	25,35	25,63	25,10	24,88	25,30
Média	25,66	25,37	25,70	25,05	24,89	25,33
Desvio Padrão	0,13	0,05	0,08	0,12	0,02	

Tabela 11 – Concentração de H_2O_2 no banho de imersão durante o tratamento químico com 35% de H_2O_2 .

Período	Valores da concentração do H_2O_2 (g/100mL)					Média
	23°C	35°C	47°C	58°C	70°C	
Início (0min)	35,90	35,35	35,23	35,35	35,00	35,37
Meio (30min)	35,63	35,20	34,94	34,43	35,02	35,04
Fim (60min)	35,50	35,21	34,96	34,82	34,76	35,05
Média	35,68	35,25	35,04	34,87	34,93	35,15
Desvio Padrão	0,14	0,07	0,13	0,38	0,12	

A concentração da solução de H_2O_2 sofreu uma pequena variação ao longo dos ensaios. Como todos os ensaios experimentais iniciaram à temperatura ambiente (23°C) e foram finalizados à temperatura de 70°C, esperava-se uma diluição da solução, uma vez que o aquecimento acelera a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio (Block, 1986). No entanto, durante o aquecimento observou-se um acentuado borbulhamento na solução de H_2O_2 , indicativo de liberação excessiva de oxigênio e considerável decomposição do H_2O_2 .

Este procedimento pode acarretar em perda da eficiência esporicida do H_2O_2 , visto que o oxigênio ativo é um dos responsáveis pelo ataque aos microrganismos (Block, 1991; Cerny, 1985; Toledo, 1975).

Isso pode ser atribuído a redução da tensão superficial da solução de H_2O_2 com a elevação da temperatura. O H_2O_2 pode reagir com o polímero e causar modificações nas propriedades de sua superfície como a polaridade e a tensão superficial, bem como a formação de oxigênio contendo grupos funcionais e a degradação de cadeias poliméricas. Além disso, filmes plásticos com baixa tensão superficial têm propriedades de adesão pobres. Entretanto, tratamentos associados de H_2O_2 e radiação UV podem aumentar significativamente a tensão superficial e algumas características hidrofílicas, além de melhorar suas propriedades de adesão (Ozen e Floros, 2001).

Apesar de não ter ocorrido uma redução considerável da concentração de H_2O_2 o sistema pode ser aperfeiçoado. Uma possível solução para esta deficiência seria o desenvolvimento de um dispositivo de aquecimento mais acelerado, similar aos utilizados comercialmente.

4.1.4. Efeito dos tratamentos

Durante os tratamentos ocorreram falhas na termosoldagem do filme. Notou-se que o mordente longitudinal não fornecia calor suficiente para que ocorresse a fusão do material plástico, provocando assim o vazamento da água de envase. O mau funcionamento do equipamento ocorreu devido ao excesso de umidade nos componentes eletrônicos. Para solução do problema, partes destes componentes foram desmontadas e submetidas à secagem em temperatura e umidade controladas (35°C, 20% UR) por 3h, conforme sugestão do fabricante (Suma Industria e Comércio Ltda, Campinas – SP).

4.1.5. Teste de integridade das embalagens

No exame visual do fechamento das embalagens, a solda apresentou-se lisa e uniforme.

Nenhuma das amostras apresentaram formação de bolhas, indicativo de falhas na termosoldagem, no teste de vácuo. Conseqüentemente, os tratamentos estudados não comprometeram a termosoldagem e a integridade das embalagens.

4.1.6. Teste de resistência da embalagem a compressão

No tratamento a 5% de H_2O_2 , pode ser observado que a 35°C, tanto para as amostras que foram submetidas à radiação UV quanto aquelas que não foram, obteve-se o mesmo valor de força de ruptura (122kgf), conforme Figuras 15 e 16.

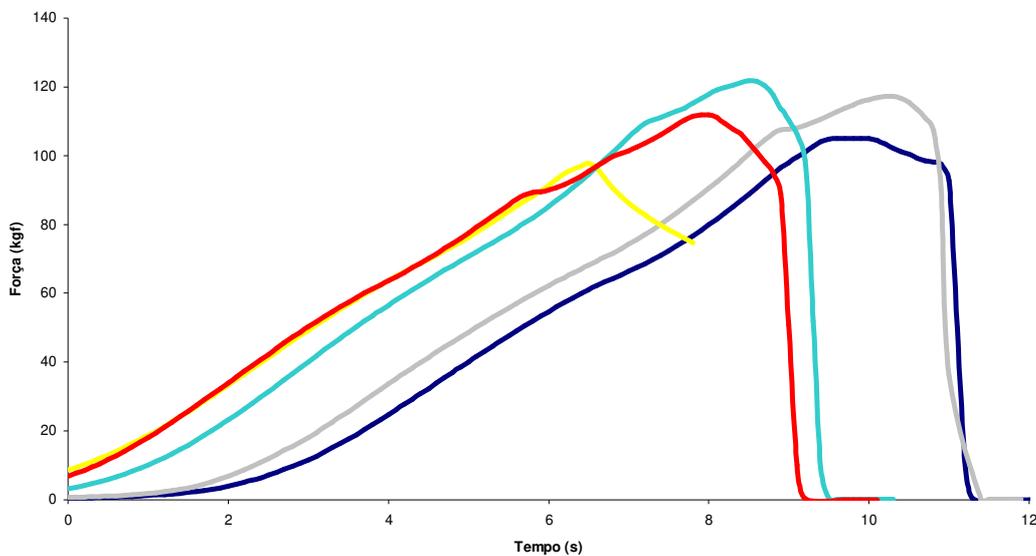


Figura 15. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 5% de H_2O_2 e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

Para a temperatura de 47°C com exposição à radiação UV, obteve-se um valor reduzido da força de ruptura (91kgf), quando comparado às amostras que não foram expostas a esta radiação (121kgf). Porém, não se pode dizer neste caso que a radiação UV influencia diretamente na resistência à termosoldagem, visto que comparado às demais temperaturas, houve pequena variação.

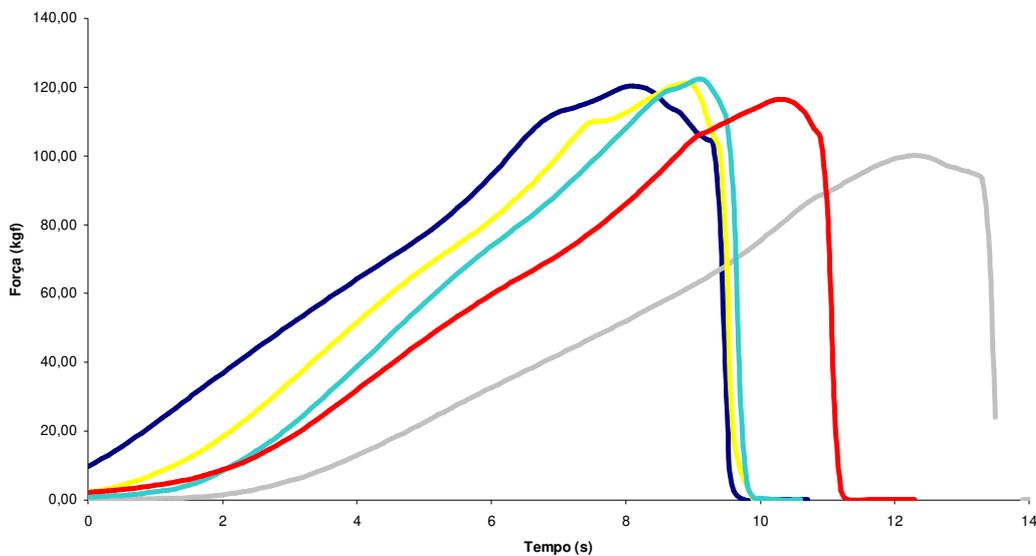


Figura 16. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 5% de H_2O_2 a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

No tratamento a 15% de H_2O_2 , houve colapso da embalagem em menor tempo para a temperatura de 35°C com exposição à radiação UV (Figura 17), o que não ocorreu para a mesma temperatura sem esta exposição (Figuras 18).

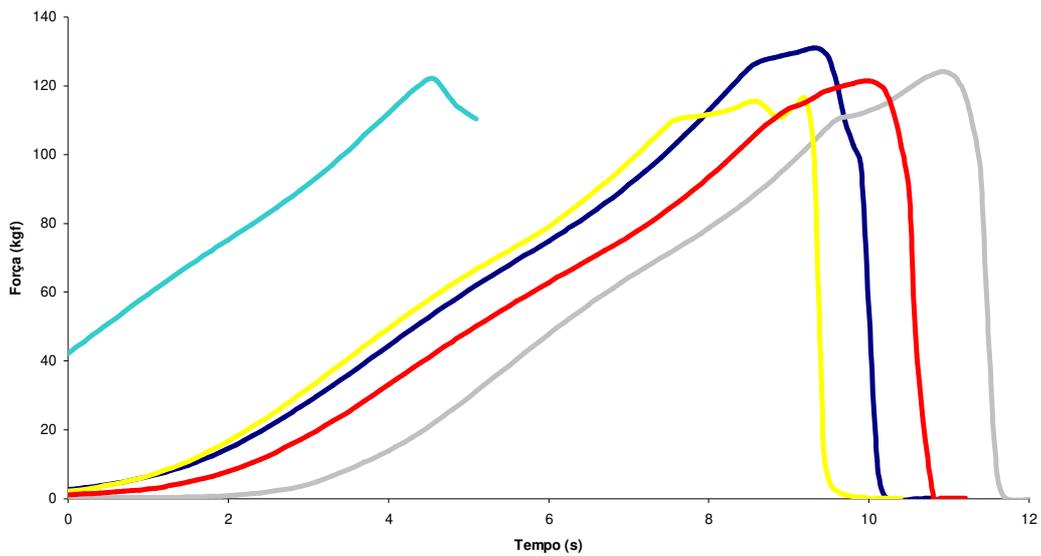


Figura 17. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 15% de H₂O₂ e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

Entretanto, os valores de força de ruptura (122 e 124kgf) para esta temperatura não se diferiram significativamente, o que indica que a embalagem se mostrou resistente independente da exposição à radiação.

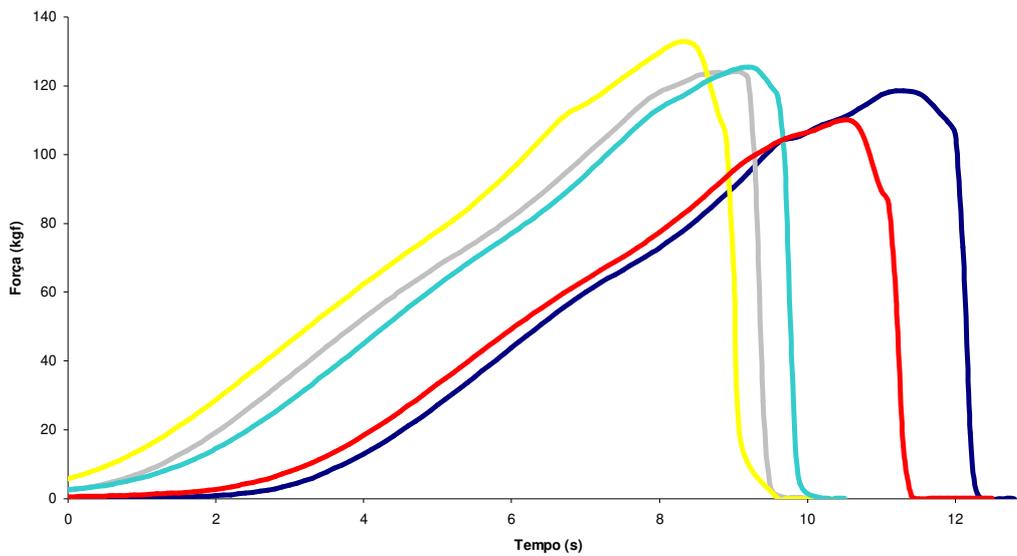


Figura 18. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 15% de H₂O₂ a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

À temperatura de 70°C, estabelecida como a temperatura máxima e segura para a operação do sistema com o H₂O₂, observou-se que no tratamento com 25% de H₂O₂, tanto para os tratamentos com (Figura 19) e sem (Figura 20) exposição à radiação UV, não houve diferença significativa entre as resistências ao estouro, 127 e 126kgf, respectivamente.

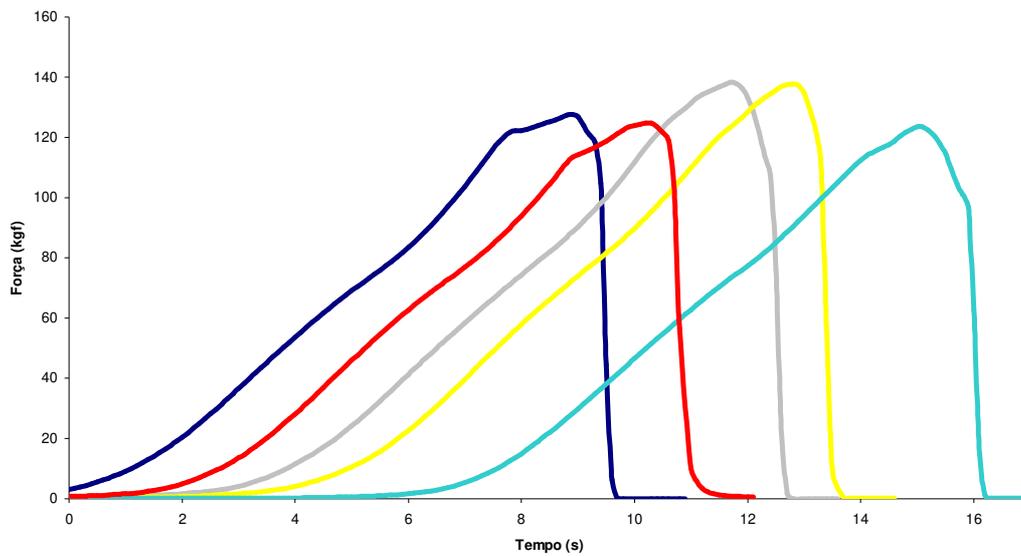


Figura 19. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 25% de H₂O₂ e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

Apesar dos filmes de PEBD amolecerem consideravelmente a altas temperaturas, a 70°C o material não apresentou problemas de tracionamento, encolhimento e deformação permanentes (Sarantopoulos *et al.*, 2002; Faria, 1998).

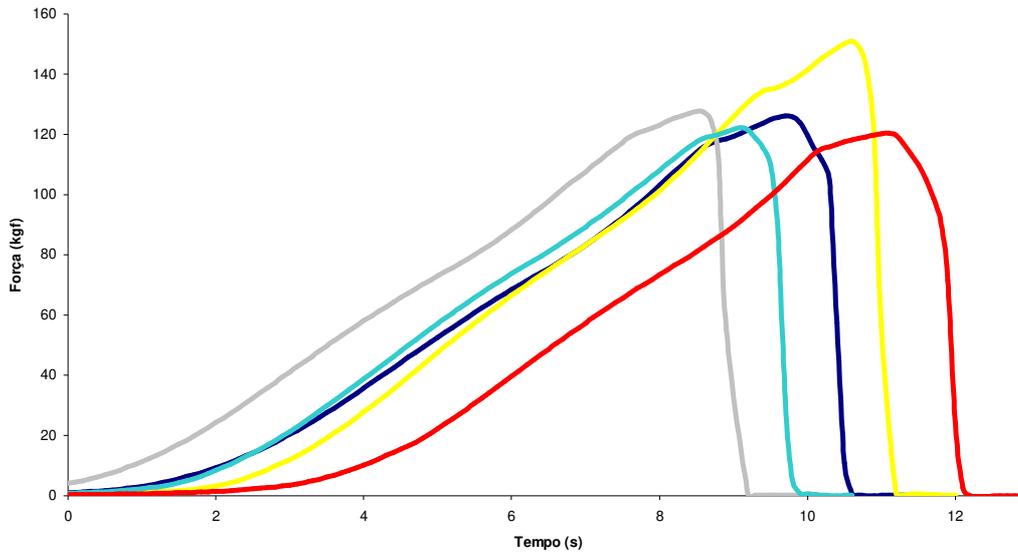


Figura 20. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 25% de H_2O_2 a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

No tratamento a 35% de H_2O_2 , sem exposição à radiação UV, o valor para a temperatura de 70°C foi de 137kgf, o que reforça a tese da possibilidade de se processar o filme de PEBD a esta temperatura, sendo que este não será prejudicado quanto à resistência das termossoldagens transversais e longitudinal, conforme a Figura 21. Em temperatura ambiente (23°C) uma boa resistência também foi observada para o mesmo tratamento (121kgf) o que indica que se for verificada uma boa eficiência esporádica do H_2O_2 a esta temperatura, será possível a sua aplicação tornando assim o sistema mais prático e seguro.

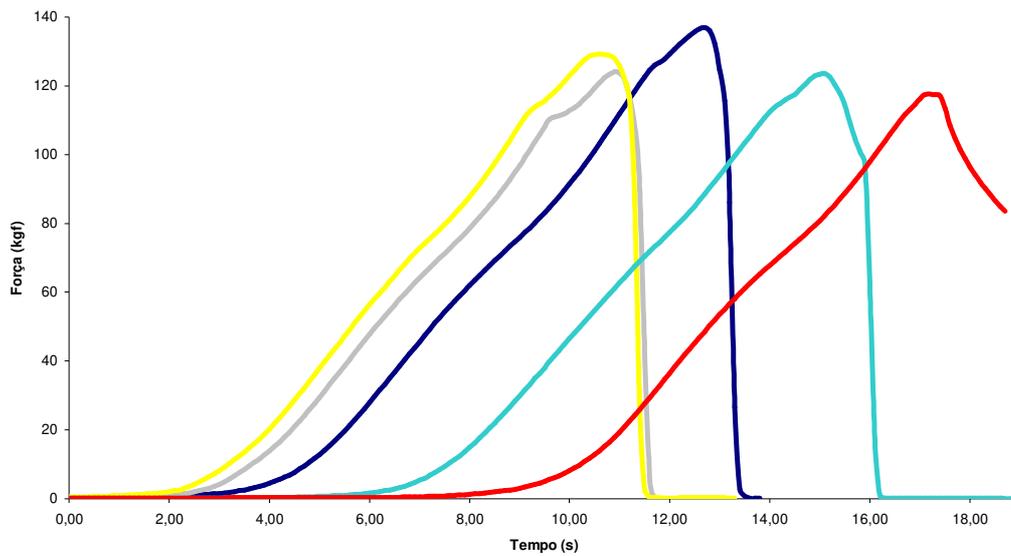


Figura 21. Resistência à compressão das embalagens tratadas quimicamente com 35% de H_2O_2 a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

O mesmo comportamento da resistência das embalagens à temperatura ambiente também foi verificado para o processamento com exposição à radiação UV (Figura 22), indicando novamente a possibilidade de uso desta temperatura no processo de esterilização do filme. Na temperatura intermediária (47°C), da mesma forma que para as demais temperaturas, a resistência a compressão foi satisfatória (129kgf) para os ensaios realizados com radiação UV.

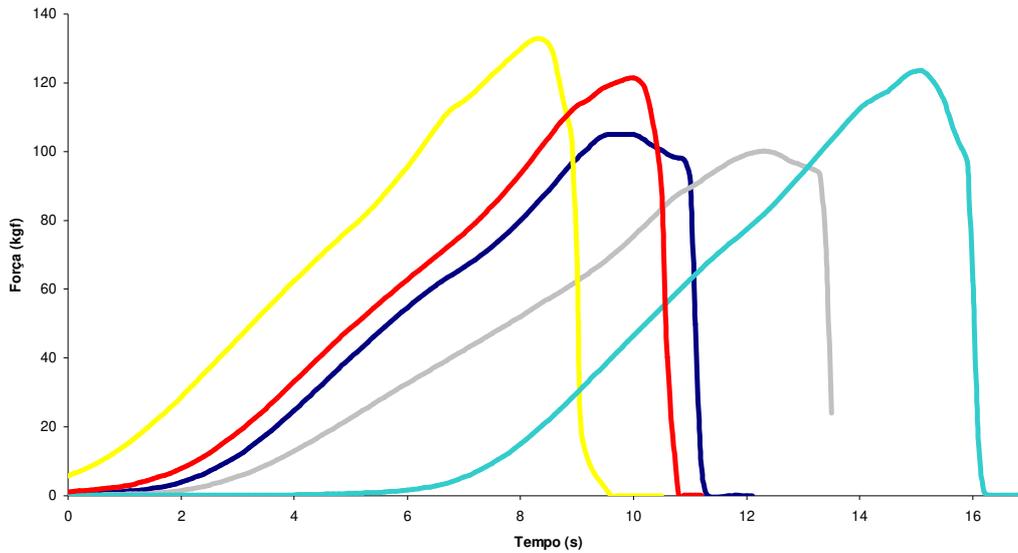


Figura 22. Resistência à compressão das embalagens tratadas pela combinação de 35% de H_2O_2 e radiação UV a 23°C (—), 35°C (—), 47°C (—), 58°C (—) e 70°C(—).

A partir de todos os resultados, verificou-se um desempenho satisfatório da embalagem para todos os processamentos, tanto com e sem exposição à radiação UV. Dessa forma, uma boa resistência e homogeneidade da termossoldagem foram obtidas, sendo que a dimensão, formato, material e condições de fabricação foram também satisfatórias.

Segundo Briston (1983), a resistência mecânica da termossoldagem é tradicionalmente avaliada medindo-se a força necessária para separar duas superfícies seladas. Neste estudo, de acordo com as avaliações visuais das embalagens após os testes de compressão, foi observado que em nenhuma das amostras houve ruptura na região da termossoldagem, indicando assim, a boa eficiência do sistema de fechamento das embalagens.

4.1.7. Análise da impressão da embalagem

Avaliou-se a resistência da impressão da embalagem após a sua imersão em banho de solução H_2O_2 .

A opacidade de todas as amostras não apresentou diferença quando comparadas com a superfície padrão (77,61% de opacidade), não submetida ao tratamento químico e físico (Tabela 12 e 13).

Tal observação foi satisfatória, pois não foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras testadas. Desta forma, há a possibilidade de se trabalhar com quaisquer concentrações de H_2O_2 e temperatura, dentro da faixa estudada, sem alteração na qualidade de impressão da embalagem; ou seja, os tratamentos não provocaram danos à integridade da impressão na superfície do filme de PEBD, nas condições em que o estudo foi realizado.

Tabela 12 – Opacidade (%) de embalagens tratadas quimicamente com H_2O_2 .

Temperatura (°C)	Concentração do H_2O_2 (g/100mL)			
	5	15	25	35
23	77,05	77,31	77,00	77,23
35	77,45	77,29	77,67	76,46
47	77,36	78,01	76,00	78,14
58	77,13	77,34	77,54	76,97
70	77,21	76,32	76,70	77,24
Média	77,24	77,25	76,98	77,21
Desvio Padrão	0,13	0,49	0,55	0,50

Tabela 13 – Opacidade de embalagens para os tratamentos combinados de H₂O₂ com radiação UV.

Temperatura (°C)	Concentração do H ₂ O ₂ (g/100mL)			
	5	15	25	35
23	77,13	77,60	76,04	77,21
35	77,39	77,56	77,17	77,46
47	77,14	77,54	76,85	77,34
58	77,27	77,35	76,59	77,19
70	77,70	77,43	77,32	77,01
Média	77,33	77,50	76,79	77,24
Desvio Padrão	0,19	0,08	0,41	0,14

4.1.8. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio no produto

Os valores obtidos de residual de H₂O₂ para as amostras dos tratamentos com e sem exposição à radiação UV são mostrados nas Tabelas 14 e 15.

As amostras obtidas no processamento com 35% de H₂O₂ indicaram um valor de residual médio maior do que 25mg/L para as temperaturas de 35, 47, 58 e 70°C, com e sem exposição à radiação UV. Entretanto, para a temperatura de 23°C, com e sem exposição à radiação UV, foram encontrados valores entre 0,0 e 0,5mg/L. Notou-se uma relação diretamente proporcional entre a temperatura e o nível residual de H₂O₂ no interior das embalagens.

Tabela 14 – Residual de H₂O₂ (mg/L) em embalagens tratadas quimicamente com H₂O₂.

Temperatura (°C)	Concentração do H ₂ O ₂			
	5	15	25	35
23	0,0	0,0	0,0	0,0 - 0,5
35	0,0	5,0	5,0	10,0
47	0,0	10,0	0,0 - 0,5	10,0
58	0,0	10,0	10,0	> 25,0
70	0,0	25,0	> 25,0	> 25,0

As amostras que apresentaram maiores residuais de H₂O₂ foram aquelas relativas aos tratamentos com soluções de 25 e 35% de H₂O₂. Observa-se nos resultados que para todas as temperaturas não detectou-se residual para a solução de peróxido em concentração de 5%, e para concentração de 15% o residual foi baixo para as temperaturas mais baixas.

Tabela 15 – Residual de H₂O₂ (mg/L) em embalagens tratadas pela combinação de H₂O₂ e radiação UV.

Temperatura (°C)	Concentração do H ₂ O ₂			
	5	15	25	35
23	0,0	0,0	0,0	0,0 - 0,5
35	0,0	5,0	5,0	> 25,0
47	0,0	10,0	2,0 - 5,0	1,0 - 2,0
58	0,0	10,0	10,0	> 25,0
70	0,0	25,0	> 25,0	> 25,0

Stannard e Wood (1983) sanificando a superfície de cartonados com *spray* de 0,1 e 0,2mL de H₂O₂ a 1% sem enxágüe, encontraram um residual de 1,2 e 2,2mg/L, respectivamente.

Os tratamentos com radiação UV não alteraram consideravelmente o residual de H₂O₂ de forma geral.

Os valores de residual obtidos para os tratamentos com 15, 25 e 35% encontram-se fora dos limites recomendados pelo FDA (máximo de 0,5mg/L). Entretanto, a utilização de um dispositivo após o banho de imersão, como lâminas de ar quente, ou a utilização de pressão sobre o filme, como rolos espremedores, poderão diminuir o residual de H₂O₂ no interior das embalagens, chegando ao nível recomendando pelo FDA (Faria, 2006).

Outro artifício tecnológico que poderia ser utilizado para a redução do residual de H₂O₂ na embalagem seria o tracionamento do filme de PEBD, após o tratamento químico, em um ângulo mais inclinado em relação ao banho de imersão, fazendo com que o resíduo deste agente escoe pelo filme e auxilia assim no seu decréscimo.

4.2. EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO H₂O₂ E DA RADIAÇÃO UV NA ESTERILIZAÇÃO DE FILME DE PEBD INOCULADO COM *Bacillus subtilis*

Os resultados obtidos para o número de reduções decimais da população de esporos de *B. subtilis* nas superfícies-teste de PEBD depois dos tratamentos, seguindo o planejamento fatorial completo, estão listados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Influência dos tratamentos químicos com H₂O₂ sobre a descontaminação das superfícies-teste, contaminadas com 100µL de *Bacillus subtilis*, em função do número de reduções decimais, segundo planejamento fatorial completo 2³.

Ensaio	t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	N ₀ (10 ⁷ UFC/cm ²)	N (UFC/cm ²)	Reduções decimais
1	8 (-1)	32 (-1)	7 (-1)	1,7	7,0x10 ⁵	1,39
2	16 (+1)	32 (-1)	7 (-1)	1,6	3,2x10 ⁶	0,70
3	8 (-1)	60 (+1)	7 (-1)	1,4	4,2x10 ⁵	1,52
4	16 (+1)	60 (+1)	7 (-1)	1,1	1,1x10 ⁵	2,01
5	8 (-1)	32 (-1)	28 (+1)	1,5	3,0x10 ⁶	0,70
6	16 (+1)	32 (-1)	28 (+1)	1,3	3,0x10 ⁶	0,62
7	8 (-1)	60 (+1)	28 (+1)	1,5	1,1x10 ³	4,13
8	16 (+1)	60 (+1)	28 (+1)	1,0	n.d.	7,01
9	5 (-α)	46 (0)	18 (0)	1,3	3,0x10 ⁶	0,64
10	19 (+α)	46 (0)	18 (0)	1,3	3,0x10 ⁶	0,64
11	12 (0)	23 (-α)	18 (0)	1,2	1,1x10 ⁶	1,04
12	12 (0)	70 (+α)	18 (0)	1,1	4,0x10 ²	4,44
13	12 (0)	46 (0)	0 (-α)	1,6	1,4x10 ⁷	0,06
14	12 (0)	46 (0)	35 (+α)	1,7	3,0x10 ²	4,76
15	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,1	7,2x10 ⁶	0,17
16	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,2	4,8x10 ⁶	0,38
17	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,3	1,6x10 ⁶	0,92
18	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,0	3,8x10 ⁶	0,42

n.d. não foi detectado crescimento.

(-1) nível inferior

(+1) nível superior

(-α) ponto axial inferior

(+α) ponto axial superior

α = 1,68

N₀ = população inicial de esporos de *B. subtilis*.

N = população final de esporos de *B. subtilis*.

Tabela 17 – Influência dos tratamentos combinados de H₂O₂ com radiação UV sobre a descontaminação das superfícies-teste, contaminadas com 100µL de *Bacillus subtilis*, em função do número de reduções decimais, segundo planejamento fatorial completo 2³.

Ensaio	t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	N ₀ (10 ⁷ UFC/cm ² .)	N (UFC/cm ²)	Reduções decimais
1	8 (-1)	32 (-1)	7 (-1)	1,7	2,2x10 ⁵	1,89
2	16 (+1)	32 (-1)	7 (-1)	1,6	2,8x10 ⁵	1,76
3	8 (-1)	60 (+1)	7 (-1)	1,4	3,0x10 ⁵	1,67
4	16 (+1)	60 (+1)	7 (-1)	1,1	6,4x10 ⁴	2,25
5	8 (-1)	32 (-1)	28 (+1)	1,5	1,4x10 ⁶	1,04
6	16 (+1)	32 (-1)	28 (+1)	1,3	1,1x10 ⁶	1,10
7	8 (-1)	60 (+1)	28 (+1)	1,5	n.d.	7,18
8	16 (+1)	60 (+1)	28 (+1)	1,0	n.d.	7,01
9	5 (-α)	46 (0)	18 (0)	1,3	4,8x10 ⁵	1,43
10	19 (+α)	46 (0)	18 (0)	1,3	3,6x10 ⁶	0,56
11	12 (0)	23 (-α)	18 (0)	1,2	3,2x10 ⁶	0,59
12	12 (0)	70 (+α)	18 (0)	1,1	n.d.	7,04
13	12 (0)	46 (0)	0 (-α)	1,6	1,8x10 ⁶	0,97
14	12 (0)	46 (0)	35 (+α)	1,7	3,2x10 ³	3,74
15	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,1	1,4x10 ⁶	0,89
16	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,2	1,4x10 ⁶	0,91
17	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,3	5,0x10 ⁶	0,41
18	12 (0)	46 (0)	18 (0)	1,0	6,4x10 ⁵	1,19

n.d. não foi detectado crescimento.

(-1) nível inferior

(+1) nível superior

(-α) ponto axial inferior

(+α) ponto axial superior

α = 1,68

N₀ = população inicial de esporos de *B. subtilis*.

N = população final de esporos de *B. subtilis*.

O grau de esterilização de embalagens depende da quantidade inicial de microrganismo e da área da embalagem. A *US – Food Drug Administration* (FDA), recomenda um total de 5 reduções decimais em embalagens de 1-10dm². para o *Clostridium botulinum* são requeridas 10 reduções decimais no material de embalagem, segundo este mesmo órgão. Contudo, este microrganismo é 2,5 vezes menos resistente ao H₂O₂ que o *B. subtilis* var. *globigii*, que é considerado o mais resistente a este agente químico (Buchner, 1993).

Pode-se observar na Tabela 16, que mais de 4 reduções decimais foram atingidas a partir de 18% de H₂O₂ aquecido a 70°C. Já na tabela 17, para as mesmas condições de processamento, obteve-se mais de 6 reduções decimais, confirmando, para este caso, o resultado de estudos comparativos citados neste trabalho (Buchner, 1993; Toletto *et al.*, 1973).

Para ambos os tratamentos, com e sem radiação UV, percebe-se que as altas concentrações de H₂O₂ não permitem observar claramente a ação do tempo e da temperatura, visto que rapidamente é atingido o número máximo de reduções decimais, da ordem 7 reduções decimais. A determinação experimental do aumento do número de reduções com o aumento da concentração não foi possível devido a limitação da população de esporos inoculados na superfície-teste (10⁷).

Analisando os dados estatisticamente ($p < 0,05$), foram obtidos os valores estimados dos efeitos de cada variável do processo, e os coeficientes do modelo de regressão, que estão expressos nas Tabelas 18 e 19.

O coeficiente de determinação (R^2) para o tratamento químico com H₂O₂ foi de 0,9513, para o modelo completo e 0,9349, para o modelo ajustado, ou seja, depois de eliminadas as variáveis não significativas.

Tabela 18 – Coeficientes de regressão do modelo do planejamento 2^3 para os tratamentos químicos com H_2O_2 .

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	Coeficientes de regressão	p	Coef. Regr. Ajustado
Média		3,9142	18,9454	0,0013	17,0829
Tempo (s)	(L)	0,3529	-0,6912	0,0680	-0,5360
	(Q)	0,2092	0,0065	0,5488	0,0065
Temperatura ($^{\circ}C$)	(L)	2,3968*	-0,5431	0,0007	-0,5431
	(Q)	1,6802*	0,0043	0,0016	0,0043
H_2O_2 %	(L)	2,1607*	-0,5737	0,0009	-0,4685
	(Q)	1,5546*	0,0071	0,0027	0,0071
Interação t e T		1,0350*	0,0092	0,0498	0,0092
Interação t e H_2O_2		0,7359	0,0088	0,1392	n.d.
Interação T e H_2O_2		2,0751*	0,0071	0,0017	0,0071

(L) linear e (Q) quadrático; *significativo a $p \leq 0,05$.

n.d. não determinado pelo programa.

Com os coeficientes de regressão do modelo ajustados apresentados na Tabela 18, para os tratamentos químicos com H_2O_2 , escreveu-se a equação que fornece uma estimativa da resposta correspondente ao número de reduções decimais, a saber:

$$\gamma = 17,0829 - 0,5360 \times t + 0,0065 \times t^2 - 0,5431 \times T + 0,0043 \times T^2 - 0,4685 \times C + 0,0071 \times C^2 + 0,0092 \times t \times T + 0,0071 \times T \times C$$

onde:

 γ = número de reduções decimais; t = tempo (s); T = temperatura ($^{\circ}C$);

C = concentração de H₂O₂ (%).

No tratamento combinado de H₂O₂ com radiação UV, o coeficiente de determinação (R²) para o modelo completo foi de 0,9771, e para o modelo ajustado de 0,9763.

Tabela 19 – Coeficientes de regressão do modelo do planejamento 2³ para os tratamentos combinados de H₂O₂ com radiação UV.

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	Coeficientes de regressão	p	Coef. Regr. Ajustado
Média		3,1609	18,0233	0,0005	17,8162
Tempo (s)	(L)	-0,1643	-0,2628	0,3499	-0,2456
	(Q)	0,2995	0,0094	0,2994	0,0094
Temperatura (°C)	(L)	3,2655*	-0,6137	0,0001	-0,6008
	(Q)	2,3077*	0,0059	0,0000	0,0059
H ₂ O ₂ %	(L)	1,9656*	-0,5636	0,0003	-0,5853
	(Q)	1,3653*	0,0062	0,0016	0,0062
Interação t e T		0,1200	0,0011	0,7488	n.d.
Interação t e H ₂ O ₂		-0,1519	-0,0018	0,6858	n.d.
Interação T e H ₂ O ₂		2,9538*	0,0100	0,0000	0,0100

(L) linear e (Q) quadrático; *significativo a p ≤ 0,05.

n.d. não determinado pelo programa.

Com os coeficientes de regressão do modelo ajustados apresentados na Tabela 19, para os tratamentos com radiação UV, escreveu-se a equação que fornece uma estimativa da resposta correspondente ao número de reduções decimais, a saber:

$$\gamma = 17,8162 - 0,2456 \times t + 0,0094 \times t^2 - 0,6008 \times T + 0,0059 \times T^2 - 0,5853 \times C + 0,0062 \times C^2 + 0,0100 \times T \times C$$

onde:

γ = número de reduções decimais;

t = tempo (s);

T = temperatura (°C);

C = concentração de H₂O₂ (%).

As equações obtidas destes dois modelos podem atender às necessidades de uma linha de esterilização de embalagens, que opere em condições de estudo similares, ou seja, onde se faça a imersão de um filme de PEBD em solução à base de H₂O₂. Poderá ser obtido através do modelo com exposição à radiação UV, por exemplo, a temperatura (T) necessária para se obter 4 reduções decimais ($\gamma = 4$) na população de esporos de *B. subtilis*, quando for utilizada uma solução com 20% H₂O₂ ($C = 20$), por 16s ($t = 16$). Substituindo-se estes valores na equação do modelo, encontra-se a temperatura da solução de H₂O₂ de aproximadamente 44°C para a esterilização do filme de PEBD.

Neste estudo, a variável tempo não apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), conforme as Tabelas 16 e 17, nos ensaios 3, 4, 9 e 10. O aumento do tempo não resultou em uma elevação nas reduções decimais para os tratamentos com e sem exposição à radiação UV (Tabelas 18 e 19). No entanto, para o tratamento químico com H₂O₂ (Tabela 16), nos ensaios 7 e 8, o aumento do tempo de 8s para 16s, estando as outras variáveis

constantes, resultou em um aumento das reduções decimais de 4 para 7. Conseqüentemente, a variável tempo foi considerada no modelo ajustado.

Segundo a literatura, o aumento do tempo de contato aumenta o número de reduções decimais em estudos de inativação de esporos (Toledo *et al.*, 1973; Leaper, 1984; Sagripant e Bonifacino, 1996).

Respeitando-se o limite de concentração máxima do H₂O₂ (35%), estes modelos podem ser utilizados para predizer condições de trabalho em termos de tempo, temperatura e concentração de H₂O₂, com e sem exposição à radiação UV. As observações das superfícies de respostas e das curvas de contorno, também auxiliam na predição dos valores de tempo, temperatura e concentração, de forma mais simplificada do que a equação. As superfícies de resposta e as curvas de níveis que representam as equações dos modelos, para os ensaios com e sem exposição à radiação UV estão ilustrados nas Figuras 23 e 24.

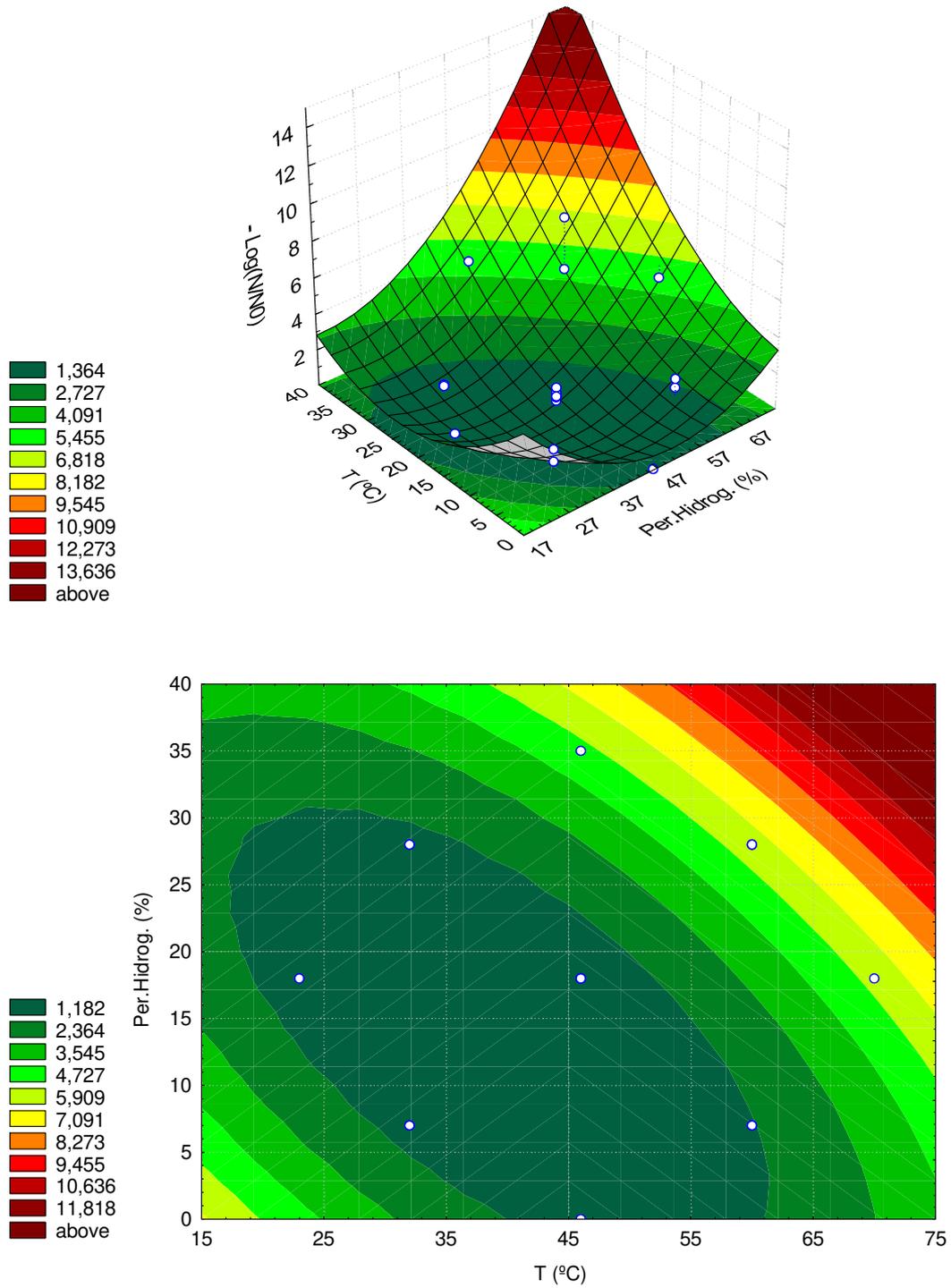


Figura 23 – Superfície de resposta e curvas de nível do modelo ajustado, para os tratamentos sem radiação UV, no tempo de 12 segundos (ponto central).

Como foi comentado anteriormente, observa-se nas Figuras 23 e 24 que o ponto ótimo, em termos de números de reduções decimais, é alcançado em valores de concentração de H₂O₂ de 35%, aproximadamente, em um intervalo de temperatura de 46 a 70°C. Em concentrações e temperaturas mais drásticas, a superfície chega ao seu pico máximo no que se refere aos valores de reduções decimais, pois quanto maior a temperatura da solução de H₂O₂, maior é seu efeito esporicida (Toleto *et al.*, 1973; Fluckiger, 1995; von Bockelmann e von Bockelmann, 1986; Block, 2001; McDonnell e Russell, 1999). No entanto, o tratamento nessas condições pode ocasionar alterações indesejáveis nas propriedades do filme, bem como, resultar em um residual de H₂O₂ de difícil remoção.

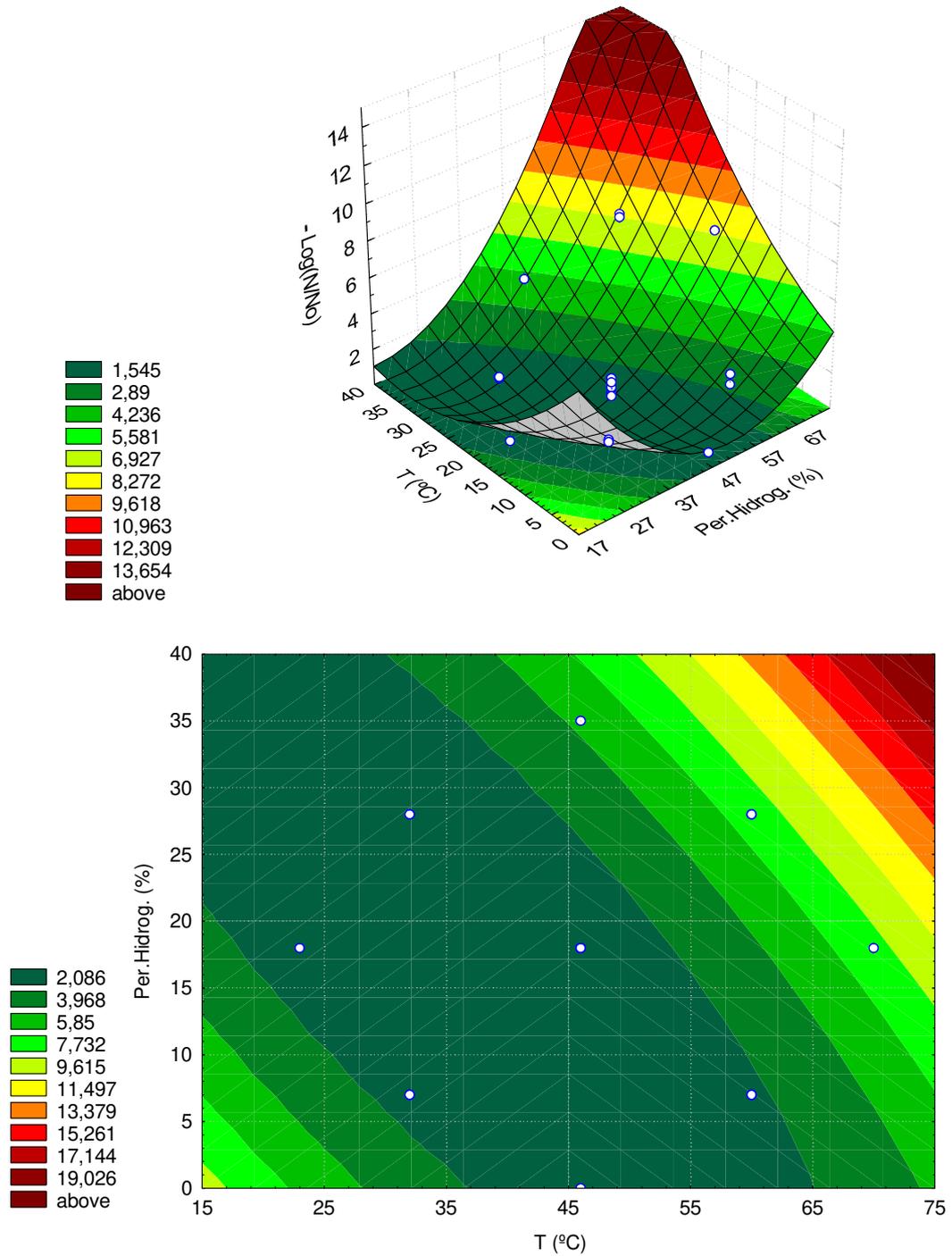


Figura 24 – Superfície de resposta e curvas de nível do modelo ajustado, para os tratamentos com radiação UV, no tempo de 12 segundos (ponto central).

Como este estudo é direcionado para esterilização de filme plástico de PEBD, ao qual possui baixa contaminação inicial, e onde se procura utilizar baixas concentrações de agentes químicos (deslizantes e pigmentos), considera-se que os resultados obtidos nas concentrações utilizadas são satisfatórios. Entretanto, existe a necessidade de se estabelecer limites para a aplicação do modelo, até um máximo de 35% de H₂O₂, respeitando-se as condições aqui utilizadas de tempo e temperatura.

Houve uma grande dificuldade e limitações em se comparar os dados obtidos neste estudo com os disponíveis na literatura, pois poucos autores realizaram o experimento em superfície com inóculo seco e por períodos curtos de tempo, sendo a maioria em condições úmidas.

Toledo *et al.* (1973) e Smith e Brown (1980), utilizando H₂O₂ como sanificante em seus estudos, observaram que os esporos secos (em superfície) de *B. subtilis* SA22 e *B. subtilis* var. *globigii* ATCC9372, foram menos resistentes que os seus respectivos esporos úmidos (em suspensão). Comparando-se a resistência das duas formas de esporos, secos e úmidos, pôde-se constatar que os esporos úmidos são em média duas vezes mais resistentes que os secos.

O tipo de superfície onde está aplicado o inóculo é um outro parâmetro que pode provocar variações de resultados. Os esporos podem aderir mais ou menos em determinadas superfícies, por interações de natureza hidrofílica ou hidrofóbica, podendo ser removidas com maior ou menor facilidade (Ronner *et al.*, 1990; Gangi *et al.*, 1997). Ronner *et al.* (1990) determinaram que os esporos de *B. subtilis* ATCC6633 são mais hidrofílicos do que hidrofóbicos e que esporos de *B. cereus* são bastante hidrofóbicos. Estes mesmos autores também constataram que os esporos têm maior poder de aderência do que as células vegetativas de *Bacillus*, em ambas as superfícies. Sabe-se,

entretanto, que os materiais plásticos são tipicamente superfícies hidrofóbicas (Reuter, 1980).

Os estudos com H₂O₂ disponíveis na literatura variam bastante entre si, pois cada pesquisador adota condições diferentes de trabalho, além das anteriormente citadas. A maioria trabalha com faixas de tempo da ordem de minutos (5 – 300min) e concentrações muito baixas, na faixa de 1%, já que estes experimentos são voltados para sanitização de superfícies e equipamentos industriais. A utilização de diferentes cepas de microrganismos e até de diferentes linhagens do *B. subtilis* também dificulta as comparações.

O melhor estudo encontrado na literatura para comparação com este experimento, foi o realizado por Han *et al.* (1980), que tratou superfícies de alumínio; inoculadas com a mesma linhagem de esporos de *B. subtilis* var. *globigii* ATCC9372; com soluções de H₂O₂ de 0,6% a 30% de concentração e em intervalos variando de 0 a 80. Apesar das diferenças experimentais, pôde ser feita uma comparação, substituindo-se os valores do estudo de Han *et al.* (1980), na equação de regressão encontrada para o modelo quadrático desse estudo. A principal consideração a ser feita, é relativa à diferença das forças de interação entre o material das superfícies utilizadas e os esporos. Os resultados desta comparação, com e sem exposição à radiação UV estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Comparação do estudo de Han *et al.* (1980), com o modelo quadrático desenvolvido neste experimento.

Valores dos parâmetros de Han <i>et al.</i> (1980)				Valores dos parâmetros do modelo				
t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	γ	t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	γ	
							Sem UV	Com UV
12	46	30	2,9	12	46	35	4,8	4,0
8	60	28	4,8	8	60	28	4,1	7,1
12	70	18	5,1	12	70	18	4,4	7,0

γ = número de reduções decimais.

Considerando-se as diferenças das condições de trabalho dos dois experimentos, pode-se dizer que os resultados obtidos pelo modelo estão coerentes com os de Han *et al.* (1981).

Através da Tabela 21, observam-se algumas comparações dos resultados obtidos pelos modelos atuais, com e sem exposição à radiação UV, com outros da literatura, realizados em condições úmidas pelo método de suspensão, ambos com esporos de *B. subtilis*.

Tabela 21 – Comparação dos resultados obtidos por estudos realizados por via úmida (suspensão) com os obtidos pelos modelos quadráticos desta pesquisa.

Valores dos parâmetros da literatura				Valores dos parâmetros dos modelos				
t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	γ	t (s)	T (°C)	H ₂ O ₂ (%)	γ	
							Sem UV	Com UV
Swartling e Lindgren ¹ (1996)								
1640	25	10	4	12	46	35	4,8	4,0
128	50	15	4	16	60	28	7,0	7,0
26	70	20	4	12	70	18	4,4	7,0
Bayliss e Waites ² (1979)								
1800	25	10,0 + UV	4	12	46	35	4,8	4,0
660	24	25,8	4	8	60	28	7,0	7,0
126	80	15	4	12	70	18	4,4	7,0
Marquis e Baldeck ³ (2006)								
60	25	0,1	0,5	12	46	35	4,8	4,0
60	75	0,1	0,5	8	60	28	7,0	7,0
120	75	0,1	1	12	70	18	4,4	7,0

(1) *B. subtilis* ATCC95244; (2): a- *B. subtilis* var. *niger*; b- *B. subtilis* 738; c- *B. licheniformis* 109 2AO;
 γ = número de reduções decimais.

As variações observadas podem ser explicadas pelas diferenças de temperatura, tempo, concentração, microrganismo e pela exposição ou não à radiação UV. Considerando-se as diferenças experimentais, o modelo apresenta resultados coerentes com a literatura.

4.2.1. Determinação do residual de peróxido de hidrogênio

As amostras obtidas nos ensaios do planejamento fatorial, que acusaram maiores residuais de H₂O₂ foram as relativas aos ensaios 7, 8, 12 e 14, para os tratamentos sem exposição à radiação UV. Observa-se pela matriz do planejamento, que estes foram os

ensaios onde se utilizaram as maiores concentrações de H₂O₂ (18 a 35%) e altas temperaturas (60 e 70°C). Pode-se explicar este maior residual pelo fato de que em temperaturas altas, há uma relação direta do aumento do residual com a elevação da temperatura, fato que foi confirmado no Experimento 1, item 3.2.3.4.

Já para os tratamentos realizados com exposição à radiação UV, o mesmo fato ocorre para os mesmos ensaios, 7, 8, 12 e 14, correspondentes as maiores concentrações de H₂O₂ (18 a 35%), com suas respectivas temperaturas mais elevadas (60 e 70°C).

4.2.2. Verificação da atividade do neutralizante

O resultado do *Teste em branco* para verificar a eficiência da solução neutralizante, foi de $2,23 \times 10^2$ UFC/20mL. O controle utilizado foi de $2,34 \times 10^2$ UFC/20mL.

Pode-se observar que a solução neutralizante mostrou-se eficiente sem inibir o crescimento microbiano, visto que não foi verificada grande diferença entre a contagem obtida para o controle e para os testes aplicados, sendo todas da ordem de 2×10^2 .

Toledo *et al.* (1973) neutralizaram 1mL de solução de H₂O₂ a 41% em 99mL de solução neutralizante contendo 0,5mg/mL de catalase. Tais dados mostram que a concentração aqui utilizada (0,8mg/mL) é maior do que a empregada por Toledo *et al.* (1973), tendo assim uma margem de segurança maior. Sabe-se que uma unidade de catalase é capaz de decompor 1μmol de H₂O₂ por minuto, ou seja, cada alíquota aqui utilizada é capaz de inativar 500mg de H₂O₂ neste mesmo tempo (Luck, 1971).

4.2.3. Testes de identificação do *Bacillus subtilis*

Os resultados dos testes de identificação do *B. subtilis* estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultado dos testes de identificação do *B. subtilis*.

Teste	Resultado
Coloração de Gram	(+)
Posição do esporo	central
Citrato	(+)
Catalase	(+)
Motilidade	(+)
Crescimento a 40°C	(+)
Crescimento em meio com 7% de NaCl	(+)
Redução NO ₃ - NO ₂	(+)
Arabinose	(+)
Crescimento anaeróbio	(-)

Os resultados obtidos estão de acordo com as características do *B. subtilis*, podendo-se afirmar que a cepa utilizada era de *B. subtilis* (Gallo, 1990; Gerhardt *et al.*, 1981).

4.2.4. Teste para verificação de evaporação do etanol

Através do controle utilizado, obteve-se uma contagem média de $2,4 \times 10^2$ UFC/mL. Nas superfícies-teste empregadas para avaliação, foram recuperados, em média, $2,2 \times 10^2$ UFC/mL. Pode-se considerar que um possível residual de etanol nas superfícies-teste esterilizadas e secas, não estaria inibindo o crescimento microbiano. Esta contagem, ligeiramente menor, pode estar associada ao grau de remoção dos esporos na superfície-teste, pois como descrito no item 4.8 a superfície dos materiais plásticos é hidrofóbica, ao contrário dos esporos de *B. subtilis* que podem ser bastante hidrofílicos (Reuter, 1988).

4.2.5. Intensidade da radiação ultravioleta

A Figura 25 mostra a redução da intensidade da radiação UV com o tempo de uso da lâmpada germicida.

Com o tempo de uso da lâmpada germicida da marca Philips de 15W de potencia, observou-se um decréscimo pouco acentuado na intensidade da radiação UV nas 144 horas de uso, constatando-se a perda de 1,14% da intensidade emitida pela lâmpada na faixa de comprimento de onda de 254nm. Reduções de intensidade também foram relatadas por Silva (2000), ao analisar a lâmpada germicida Hua Ning ZW 15W.

O fabricante da lâmpada germicida utilizada neste estudo assegura uma vida útil de 8000h com perda máxima de 15% da intensidade de radiação UV.

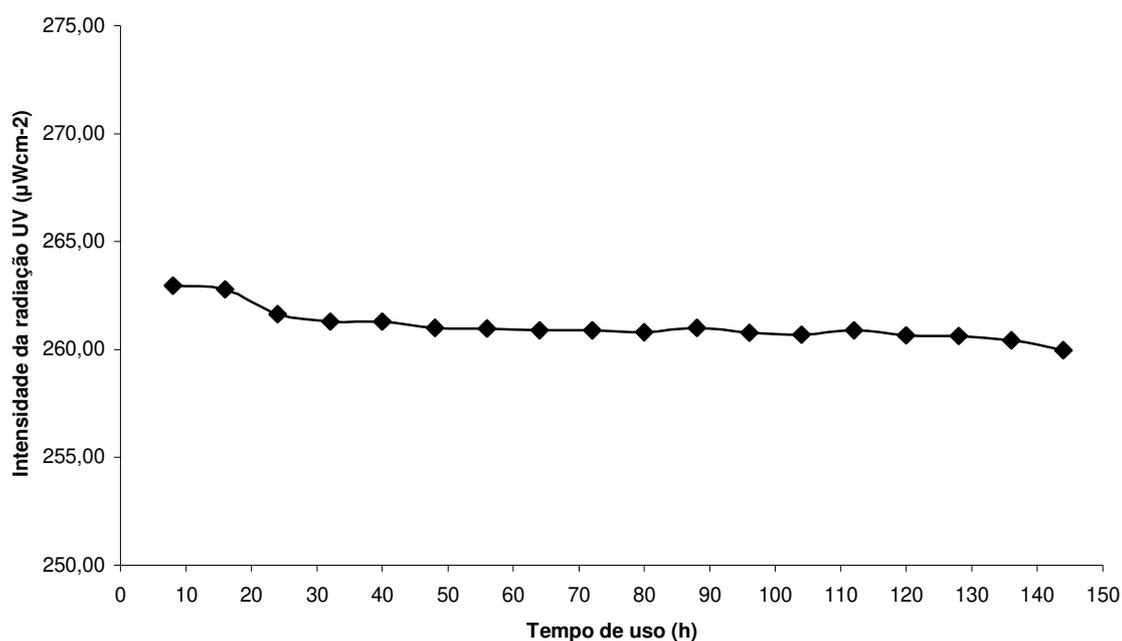


Figura 25 – Redução da intensidade da radiação UV com o tempo de uso.

4.3. EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO SENSORIAL

Os resultados da análise sensorial das amostras de água mineral envasadas em filme de PEBD após esterilização estão listados na Tabela 23. Os resultados foram analisados, separadamente, por seção.

As variáveis do tratamento para produção de embalagens estéreis para análise sensorial foram definidas segundo os ensaios do planejamento fatorial completo 2^3 . Achou-se mais prudente utilizar somente as que apresentaram um residual menos marcante, adotando-se o tratamento com uma concentração de H_2O_2 de 20%, temperatura de 60°C, tempo de contato com a solução esterilizante de 8 e 16s e exposição à radiação UV por 8s, obtendo-se assim, 5 reduções decimais e um residual de 5,0mg/L de H_2O_2 .

Tabela 23 – Análise sensorial de água mineral envasada em filme de PEBD esterilizado com solução de H₂O₂ (20%) a 60°C e radiação UV.

Provador	Amostras da 1ª seção			Amostras da 2ª seção		
	p1	1	2	p2	3	4
1	2	0	4	2	0	4
2	2	0	0	1	1	0
3	3	1	0	2	1	0
4	4	0	2	4	1	2
5	6	4	0	6	2	0
6	2	1	2	2	1	1
7	0	1	4	0	1	3
8	2	0	4	0	1	4
9	1	2	0	1	1	0
10	0	0	2	0	0	1
11	3	1	5	2	0	4
12	1	4	1	1	4	0
13	0	4	6	1	3	5
Total	26	18	30	22	16	24
Média	2,00	1,38	2,31	1,69	1,23	1,85

p1 e p2: água mineral natural; 1 e 3: tratamento com tempo de contato de 8s; 2 e 4: tratamento com tempo de contato de 16s.

Através da análise de variância dos resultados obtidos nas duas seções, verificou-se que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) das amostras de água envasadas em filme de PEBD conforme amostras padrão p1 e p2. Foi obtido um $F_{\text{calc.}} = 0,76$ para as amostras da 1ª seção e $F_{\text{calc.}} = 0,44$ para as amostras da 2ª seção, contra um $F_{\text{tab.}}$ de 3,4. Estes resultados indicam que as concentrações de H₂O₂ nas condições de aplicação (tempo e temperatura) utilizadas neste estudo, não conferiram gosto estranho à água. Este é um efeito que pode ser atribuído à degradação acelerada do H₂O₂ em oxigênio e

água. Também devido ao extenso percurso que a embalagem percorreu desde a imersão em solução esterilizante até o momento de fechamento e recebimento da água de envase, possivelmente o excesso de H_2O_2 na superfície do material plástico pode ter escoado bem como ter iniciado a degradação deste agente.

5. CONCLUSÕES

- O uso do H_2O_2 não apresentou decréscimo na qualidade de termosoldagem e impressão da embalagem para todos os tratamentos, com ou sem exposição à radiação UV;
- As amostras que foram submetidas à imersão em banho de H_2O_2 com ou sem exposição à radiação UV apresentaram resistência média à compressão entre 100 a 130kgf. Esta resistência mecânica do fechamento é suficiente para resistir às solicitações mecânicas decorrentes do próprio acondicionamento do produto, transporte, distribuição e manuseio da embalagem;
- Todas as amostras demonstraram boa integridade do fechamento, quando submetidas ao ensaio de emissão de bolhas;
- Na avaliação da qualidade visual da impressão das embalagens, nenhuma das amostras apresentou alterações quando comparadas ao padrão. No exame com colorímetro, a média da opacidade foi de 77,19%. Esta avaliação demonstrou que não houve degradação da impressão, quanto este foi comparado à opacidade de uma impressão em embalagem padrão, ou seja, não submetida a nenhum dos tratamentos.
- A solução de H_2O_2 , quando submetida ao aquecimento e exposta ao ar ambiente, manteve suas concentrações nos níveis desejados, garantindo assim, a qualidade durante todos os tratamentos.
- O material plástico esterilizado com solução de 5% de H_2O_2 não apresentou residual superior a 0,5mg/L para qualquer temperatura empregada, enquanto que para as soluções com 25 e 35% de H_2O_2 este residual foi em média de 10 a 25mg/L;

- O efeito esporicida do H₂O₂ foi potencializado pelo aumento da temperatura, porém houve uma relação direta desta elevação da temperatura com o aumento do residual deste agente químico no interior das embalagens;
- Os resultados obtidos indicam a possibilidade de trabalho com a concentração máxima de H₂O₂ (35%), pois não houve alterações na qualidade da impressão e na termossoldagem das embalagens;
- As superfícies de resposta e as curvas de níveis obtidas no planejamento fatorial indicaram uma tendência crescente do número de reduções decimais de esporos de *B. subtilis*, com o aumento da concentração do H₂O₂ e da temperatura, acima de 18% e 60°C, respectivamente;
- No planejamento fatorial completo, os parâmetros lineares temperatura e concentração de H₂O₂ apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) na inativação de esporos de *B. subtilis* para ambos os tratamentos, com e sem exposição à radiação UV. Os parâmetros quadráticos para as mesmas variáveis também foram significativos. As interações de tempo/temperatura e de temperatura/concentração de H₂O₂ foram consideradas significativas para o processo sem exposição à radiação UV. Já para aqueles com exposição a esta radiação, foi significativa somente a interação temperatura/concentração de H₂O₂;
- Para concentrações de H₂O₂ > 18% foram necessárias temperaturas > 60°C, para atingir no mínimo 4 reduções decimais na população de esporos, em intervalos de 12 a 19s;
- A irradiação UV e o H₂O₂ agiram sinergisticamente na morte de esporos de *B. subtilis* quando utilizados em conjunto. Verificou-se o aumento em média de um ciclo de redução decimal para este microrganismo em alguns ensaios experimentais;
- As amostras de água mineral analisadas sensorialmente não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) de sabor em relação ao padrão;

- O sistema de sanificação de filme de PEBD, avaliado neste estudo, mostrou eficiência com baixo custo operacional e fácil manuseio, obtendo-se de 4 a 7 reduções decimais na população de esporos de *B. subtilis* var. *globigii*; o sistema permite o uso de soluções de H₂O₂ em concentrações de 18 a 35% sob aquecimento de 46 a 70°C. Nessas condições, o residual de H₂O₂ que pode ser facilmente minimizado com a instalação de lâminas de ar quente ou a utilização de rolos espremedores sobre o filme.
- Conclui-se que o sistema pode ser utilizado pelas indústrias de pequeno e médio porte, por um custo baixo, se comparado aos demais sistemas disponíveis no mercado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 14637**: Métodos de ensaio para garrações de água para envase de água mineral. Rio de Janeiro, 2001.

ABREU, L. F.; FARIA, J. A. F. Evaluation of a system for chemical sterilization of packages. **Packaging Technology and Science**. v. 17, p.37-42, 2004.

ABREU, L.F.; Avaliação de processo de sanificação química de garrafas plásticas para sistemas assépticos. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

AFSAR, H.; APAK, R.; TOR, I. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using tris (1,10-phenantroline)iron (II). **Analyst**. n.115, p.99-103, 1990.

ALASRI, A.; VALDERDE, M.; ROQUES, C.; MICHEL, G. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, in comparison with chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal Microbiology**. v.38, n.7, 1992.

ALFA, M. J.; DeGAGNE, P; OLSON, N.; HIZON, R. Comparison of liquid chemical sterilization with peracetic acid and ethylene oxide sterilization for long narrow lumens. **American Journal of Infection Control**, v.26, n.5, p.469-477, 1998.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for leaks using bubble emission techniques ASTM E 515-95**. Philadelphia: ASTM, 2000, 3 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for thickness of solid electrical insulation – ASTM D374-99**. Philadelphia: ASTM, 1999. 11p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTIN AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for grammage of paper and paperboard (Mass per Unit Area). ASTM D646-96 (Reapproved 2001)**. Philadelphia: ASTM, 2001. 5p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTIN AND MATERIALS – ASTM. **Standard Test Method for Determining Compressive Resistance of Shipping Containers, Components, and Unit Loads**. ASTM D642. Philadelphia: ASTM, 2000. 5p.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos** São Paulo: Editora Varela, 1996. 182p.

ANON. Aseptic take off. **Food Technology**, Chicago, p.46-50, jan.1971.

BACHMANN, R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. **Brown Boveri Review**, v.5, p.206-209, 1975.

BALDRY, M. G. C.; FRASER, J. A. L. Disinfection with peroxygens. **Applied Chemistry**, v.22, p.91-116, 1988.

BALDRY, M.G.C. The bactericidal, fungicidal and esporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetics acid. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, n.3, p.417-423, 1983.

BANWART, G.J. Control of microorganisms by destruction. **Basic Food Microbiology**, 2thed., Chapman & Hall, London, 1989, 748p.

BENNETT, E.S.F. **Testes em áreas limpas**. In: SEMINÁRIO SOCIEDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO DE PROJETO E CONSTRUÇÃO DE ÁREAS LIMPAS, São José dos Campos, 1997.

BERGEY'S, D. T.; III, A. G.; SCOTT, V. N.; SHAFER, B. D.; STEVENSON, K. E.; UNVERFERTH, J. A.; CHANDARANA, D. I. Validation of aseptic processing and packaging. **Food Technology**. v.44, n.12, p.119-122, 1990.

BERNARD, D.T.; III, A.G.; SCOTT, V.N.; SHAFER, B.D.; STEVENSON, K.E.; UNVERFERTH, J.A.; CHANDARANA, D.I. Validation of aseptic processing and packaging. **Food Technology**. v.44, n.12, p.119-122, 1990.

BERUBE, R.; OXBORROW, G.S. Methods of testing sanitizers and bacteriostatic substances. In: BLOCK, S.S. (Ed) **Desinfeciton, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, 1991. Cap.60: p.1058-1068.

BEUCHAT, L.R.; FARBER, J.M.; GARRETT, E.H.; HARRIS, L.F.; PARISH, M.E.; SUSLOW, T.V.; BISCHOFF, E. Aseptic processing in the food industry – general observations regarding the application of aseptic processes in the food industry. In: REUTER, H. **Aseptic Packaging of Food**. Hambur: Technomic, 1988. Cap. 6.3. p.258-267.

BLAKSTONE, B.; CHUTYATE, R.; KEUTTER, JR., CHARBONNEAU, J.; SUIT, K. Efficacy of oxonia active against selected spore formers. **Journal of Food Protection**, v.62, n.3, p.262-267, 1999.

BLOCK, S. S. Sterilization. In: LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**. London: Academic Press, 1992. V.4, p.87-103.

- BLOCK, S.S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S.S. (Ed) **Desinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, 1991, chap.9, p.167-181.
- BOCK, F. G.; MEYERS, H.K.; FOX, H.W. Carcinogenic activity of peroxy compounds. **Journal National Cancer Institute**. v.55, p.1359-1361, 1975.
- BRISTON, J. H. **Plastic films**. Essex: George Godwin, 1983. 380p.
- BRODY, A. L. Aseptic and extended-shelf-life packaging. *Food Technology*:2006. V.60 (2), p.66-68.
- BROWN, W. E. **Plastics in food packaging**: properties, design, and fabrication. New York: Marcel Dekker, 1992. 539p.
- BUCHNER, N. Aseptic processing and packaging of food particulates. In: WILLHOFT, E.M.A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1993. Chap. 1, p.1-22.
- CERNY, G. Basic aspects of sterilization of packaging materials. In: SYMPOSIUM ON ASEPTIC PROCESSING AND PACKAGING OF FOODS, 1985. Sweden: Lund Institute of Technology, 1985. p.166-177.
- CHAMBERS, J.V.; NELSON, P.E. **Principles of aseptic processing and packaging**. 2^a ed. Washington, 1993. 257p.
- CREMIEUX, A.; FLEURETTE, F. Methods of testing disinfectants. In: BLOCK, S.S. (Ed) **Desinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, 1991. Chap.57.

DELGADO, D. A. Ação esporocida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados em laminados para embalagens assépticas. **Tese** (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

DUNKLEY, W.L.; STEVENSON, F.E. Ultra-high temperature processing and aseptic packaging of dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, n.10, p.2192-2202, oct.1987.

EGUSH, S.Y.; MASSAGUER, P.R. Desinfecção e Esterilização. **Curso de Treinamento**. Fundação de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, 1995.

FARIA, J. A. F. **Comunicação pessoal**, 2006.

FARIA, J. A. F. **Embalagem de Alimentos**: Controle de Qualidade. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Campinas, 1998, paginação irregular.

FARIA, J. A. F. **Estabilidade de alimentos processados assepticamente**. In: II SEMINÁRIO LATINO AMERICANO – AVANÇOS EM TECNOLOGIA PARA O PROCESSAMENTO E ENVASAMENTO ASSÉPTICO DE ALIMENTOS. Campinas: 1993. p.7-28.

FARIA, J. A. F. Material de aula TA711. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

FLUCKIGER, E. Alternative methods to avoid recontamination during aseptic filling and packaging. **Bulletin of the IDF 300**, p.52-56, 1995.

- GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mostos e dornas de fermentação alcoólica. **Tese** (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1990.
- GANGI, V. J.; LEONARD, I. E.; RODRIGUEZ, A. A.; MARGOLIN, A. B. Evaluation of materials as bacterial spore carrier for testing disinfectants. **Journal of AOAC International**, 80(6), p.1361-1367, 1997.
- GEHARD, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. Manual of methods for general bacteriology. **American Society for Microbiology**. Washington, 1981. 524p.
- GRIMM, L. Assepsia a frio – Um processo de envase do futuro? **Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, n.56, p.72-74, mar./abr.1998.
- GRIMM, L. Beverage aseptic cold filling. **Fruit Processing**. V.7, p.262-265, 1998.
- GUISE, B. Sterilised methods used in packaging. **Converter**. p.49-50, jun.1986.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT**, v.37, p.453-460, 2004.
- HAN, B. H.; SCHORNICK, G. S.; LONGIN, M. Destruction of bacterial spores on solid surfaces. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.4, n.1-2, p.95-110, 1980.
- HOLDSWORTH, S. D. **Aseptic processing and packaging of food products**. Elsevier Science Publisher Ltda. London, chap. 9, p.335-375, 1992.

HUANG, Y.-W., TOLEDO, R. Effect of high doses of high and low intensity UV irradiation on surface microbiological counts and storage-life of fish. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1667-1669, 1982.

JOYCE, D. A. Microbiological aspects of aseptic processing and packaging. In: WILLHOFT, E. M. A. (E.) **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow. Blackie Academic & Professional, 1993. Chap.8: p.155-180.

Koninklijke Philips Electronics. **UV Disinfection**: application information. Disponível em: <<http://www.lighting.philips.com/>>. Acesso em: 20 fevereiro 2006.

LUCK, H. Catalase. In: BERGEMEYER, H. U. Methods of enzymatic analysis. 4^a ed., 1971, 1064p.

MANO, E.B. **Polímeros como materiais de engenharia**. 1^a ed, São Paulo: Edgard Blücher, 1991, 356p.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147-179, jan.1999.

MELLY, E.; COWAN, A. E.; SETLOW, P. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.316-325, 2002.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Ed. Unicamp: Campinas/SP, 2003, 2^aed, 401p.

NICOLAS, R. Aseptic fillin of UHT dairy products in HDPE bottles. **Food Technology**, p.52-58, mar./apr.1995.

- OZEN, B. F.; FLOROS, J. D. Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. **Food Science and Technology**. v.12, p.60-67, 2001.
- PADULA, M.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.E.C.; OLIVEIRA, L.M. & ALVES, R.M.V. **Embalagens plásticas: controle de qualidade**. Campinas, ITAL/SBCTA, 1989. 202p.
- PETRUS, R. R.; CORREA NETO, R. S.; FARIA, J. A. F.; GANDARA, A. L. N. Sanificação química de garrafas plásticas. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.5, n.80/81, p. 80-90, jan.2001.
- PETRUS, R.R.; Adaptação e avaliação de desempenho de sistema asséptico para leite fluido em garrafa plástica. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- PETRUS, R. R.; FARIA, J. A. F.; DELBEN, L. A. S. Avaliação de conformidade das condições operacionais de uma área limpa para envase asséptico. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.17, n.12, p.22-30, set.2003.
- RAYNAUD, D., LELIEVELD, H.L.M. Decontamination of food-packing using moist heat. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 326-329, 1997.
- REUTER, H. Aseptic packaging of food. In: REUTEHR, H. **Aseptic packaging of food**. Pennsylvania: Technomic, chap:1, p. 3-10, 1988a.
- REUTER, H. **Aseptic packaging of food**. Pennsylvania: Technomic, chap:3, p. 83-92, 1988b.

REUTER, H. **Aseptic packaging of food**. Pennsylvania: Technomic, chap:4, p. 95-108, 1988c.

REUTER, H. Processes for packaging materials sterilization and system requirements. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1st ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap. 5 p.155-165.

RICE, J. What's new in aseptics? **Food Processing**, v.54, n.10, p.12-23. 1993.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 1^a ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

ROLAND, N. Aseptic packaging system for PET bottles. **Fruit Processing**, La Ferté Bernard, v.6, n.9, p.367-371, sep.1996.

ROMANO, M.A.; FARIA, J.A.F.; ANJOS, C.A. Sistemas assépticos para alimentos em embalagens plásticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.32, n.2, p.180-188, 1998.

RONNER, U.; HUSMARK, U.; SIK, H. Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, p.550-556, 1990.

ROWAN, N. J., MacGREGOR, S. J., ANDERSON, J.G., FOURACRE, R. A., McILVANEY e FARISH, O. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.1312-1315, 1999.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e**

avaliação de propriedades. Centro de Tecnologia de Embalagem – ITAL. Campinas, 2002. 267p.

SILVA, C. A. S. Avaliação da radiação ultravioleta no controle de microrganismos aderidos em filmes de polietileno de baixa densidade. **Tese** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UFV, Viçosa, 2000.

SIZER, C. E & BALASUBRAMANIAM, V. M. New intervention processes for minimally processed juices. **Food Technology**, v.53, n.10, p.64-67, 1999.

SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; SOUZA, S. M. A.; MONTERREY, E. S. Elaboração de filmes de proteína para uso como impermeabilizante ou embalagem flexível. **Seminário Internacional – Tópicos Especiais em Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, p.95-104, 1997.

SOLVAY PERÓXIDOS DO BRASIL Ltda. Tecnologia em peroxidados. **Peróxido de hidrogênio: determinação de concentração por permanganimetria**. São Paulo, 2005. 4p.

SUTTON, S.V.W. Neutralizer evaluations as control experimentes for antimicrobial efficacy tests. In: ASCENZI, J.M. (ED) **Handbook of disinfectants and antiseptics**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. Chap.3, p.43-64.

SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F; **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3^a ed, Washington: American Public Health Association. Chap.3, p.51-74, 1992.

- SWARTLING, P.; LINDGREN, B. The sterilizing effect against *Bacillus subtilis* spores of hydrogen peroxide at different temperatures and concentrations. **Journal of Dairy Research**, v.35, p.423-425, 1968.
- TOLEDO, R. T. Chemical sterilants for aseptic packaging. **Food Technology**, p.102-112, may.1975.
- TOLEDO, R.T.; CHAPMAN, J.R. Aseptic packaging in rigid plastic containers. **Food Technology**, p.68-76, nov.1973.
- TOLEDO, R.T.; ESCHER, F.E.; AYRES, J.C. Sporicidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage organisms. **Applied Technology**, p.592-597, oct.1973.
- TURTLE, B. I. Packaging materials – their properties and criteria of selection. In: WILLHOFT, E. M. A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional. Chap.3: p.39-73, 1993.
- VON BOCKELMANN, B.A.H.; VON BOCKELMANN, I.L.I. Aseptic packaging of liquid food products: a literature review. **Journal Agriculture Chemistry**. V.34, p.384-392, 1986.
- VON BOCKMAN, B. Aseptic packaging of milk. **Alimenta**. V.12, n.3, p.119-126, 1973.
- WAKABAYASHI, S. Aseptic packaging of liquid foods. In: WILLHOFT, E. M. A. **Aseptic processing and packaging of particulates foods**. Galsgow: Blackie Academic & Professional. Chap.9: p.181-187, 1993.
- WALTER, E. H. **Comunicação pessoal**, 2006.
- WALTER, E.H.M. Descontaminação da superfície do coco verde por métodos físicos e químicos e desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em água de coco fresca.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

WHYTE, W. Na introduction to the design of clean and containment areas. In: WHYTE, W. **Clean room desing**. Baffins Lane: John Wiley e Sons Ltd. Cap. 1, p.1-22, 1991.

YOUSEF, A.E., MARTH,E. H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. **Journal of Food Science**. V.53, n.2, p.571-573, 1988.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Ficha do teste “Diferença do Controle” para seleção de provedores

Nome:..... Data:.....

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e três amostras codificadas de ÁGUA MINERAL. Prove a amostra padrão e em seguida, prove cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

- 0 = nenhuma diferença
- 1
- 2 = ligeiramente diferente
- 3
- 4 = moderadamente diferente
- 5
- 6 = muito diferente
- 7
- 8 = extremamente diferente

Amostras:

Grau de diferença:

Comentários:.....

.....

Anexo 2 – Ficha do teste “Diferença do Controle” para avaliação das amostras de água mineral

Nome:..... Data:.....

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e três amostras codificadas de ÁGUA MINERAL. Prove a amostra padrão e em seguida, prove cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

- 0 = nenhuma diferença
- 1
- 2 = ligeiramente diferente
- 3
- 4 = moderadamente diferente
- 5
- 6 = muito diferente
- 7
- 8 = extremamente diferente

Amostras:

Grau de diferença:

Comentários:.....

.....