



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO, CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE
REATOR PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA TENSÃO DE
CISALHAMENTO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE
MICROORGANISMOS

ALUNO: Salatir Rodrigues Júnior
Engenheiro de Alimentos

ORIENTADORA: Profa. Pilar Rodriguez de Massaguer
Ph.D.

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos

Campinas, Dezembro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R618d Rodrigues Júnior, Salatir
Desenvolvimento, construção e validação de reator para
determinação do efeito da tensão de cisalhamento na resistência
térmica de microrganismos / Salatir Rodrigues Júnior. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2008.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Tensão de cisalhamento. 2. Pasteurização. 3. Processos não-
térmicos. 4. *Bacillus atrophaeus*. 5. Processos contínuos. I.
Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Development , construction and validation of a reactor for determination of the
effect of shear stress on microorganism's thermal resistance

Palavras-chave em inglês (Keywords): Shear stress, Pasteurization, Non-thermal process,
Bacillus atrophaeus, Continuous flow process

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer
Carlos Eduardo Vaz Rossel
Gláucia Maria Falcão de Aragão
José de Assis Fonseca Faria
Rosiane Lopes da Cunha

Data de defesa: 16/12/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Pilar Rodriguez de Massaguer, Ph.D.

Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossel

Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

“Não importa qual o assunto, é muito saudável colocar,
de vez em quando, um ponto de interrogação nas
coisas que tínhamos por certas.”

Bertrand Russell (1872-1970)

À minha mãe, Izabel (*in memoriam*), cuja estada foi breve, mas decisiva, para formar meu caráter e me deixar no caminho certo;

Ao meu pai, Salatir, que me manteve no caminho da retidão;

A minha querida mulher e companheira desta vida, Andressa, cujas presença de espírito e encorajamento constantes foram imprescindíveis para terminar esta Tese;

A minha querida avó, Therezinha, e tios, Vanda e Vanderlei, que são meu alento e porto seguro;

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Existe uma quantidade imensa de pessoas a quem eu devo gratidão para a conclusão dessa tese, e será difícil lembrar-me de todos, por isso, espero a compreensão daqueles que sabem que merecem estar aqui.

A Deus, por sempre me mostrar o caminho.

À minha querida professora, orientadora, amiga e por vezes mãe, Pilar, que sempre teve a paciência de sentar-se comigo para me ajudar a resolver meus pequenos e grandes problemas.

A Sudhir Sastry, que nos ajudou a ter a idéia inicial dessa tese, em 2003.

Aos membros da banca, por suas sugestões ao longo do trabalho e na apresentação final.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, onde tive o privilégio de tornar-me Engenheiro de Alimentos, e hoje me torna um Cientista, após uma década de convívio diário.

A todos os funcionários da FEA, cujo trabalho está por trás das páginas dessa Tese. Em especial, ao Adauto, que manteve a caldeira funcionando estável, dia após dia; ao Marquinhos, que manteve a rede funcionando para que sempre tivéssemos acesso à bibliografia virtual; e à Jardete, que muitas vezes me “carregou nas costas”.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Termobacteriologia de Alimentos, que sempre estavam dispostos a ajudar e dividir a carga diária de trabalho, além de prestar consultorias gratuitas e oferecer sua amizade sincera. Peço seu perdão se me esquecer de alguém: Rosinha, Alessandra Mãe e Filha, Márcio, Rafael, Verônica, Aline PAD e loira, Anderson, as três Anas Cláudias (Scachetti, Spinelli e Tahara), Édna, Guilherme Mina, Leandro, Izael, Wilson, Wilmer, Eliane, Jonas, Karina, Sheyla, Heloísa, Fernanda, as duas Anas Paulas, Aldrey, Denise e Cristiana.

A todos os amigos e colegas, Professores e alunos (de graduação e pós-graduação), que tornaram a minha passagem pela FEA muito mais agradável.

Aos meus irmãos de alma, amigos de qualquer hora, Juliano e Sandro.

E agora, que eu chego ao final dessa praia, antes de buscar a trilha para chegar até a próxima, olho para trás, e vejo ao lado de minhas pegadas uma infinidade de outras: algumas mais próximas, outras que seguiram para longe. E eu sei que, se valeu a pena cada passo, não foi por mérito só meu.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
NOMENCLATURA.....	xix
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
1. Introdução e Justificativa.....	1
2. Objetivos	9
3. Revisão Bibliográfica.....	10
3.1. Processamento Térmico	10
3.2. Método do Ponto Equivalente – <i>EPM</i> e Método de Exposições Equivalentes Pareadas – <i>PEIE</i>	22
3.3. Inativação através de forças de cisalhamento (<i>Shear Stress</i>)	26
3.4. <i>Bacillus atrophaeus</i> (antigo <i>Bacillus subtilis</i> var. niger - ATCC9372).....	31
4. Material e Métodos.....	35
4.1. Material	35
4.1.1. Equipamento para aplicação de Cisalhamento.....	35
4.1.2. Unidade piloto UHT-HTST Microthermics – modelo Lab 25-DH	41
4.1.3. Meio fluido usado como suspensão de esporos para os experimentos	43
4.1.4. Microrganismo utilizado	43
4.2. Métodos	44
4.2.1. Produção da suspensão de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> (antigo <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372)	44
4.3. Determinação da resistência térmica em tubo TDT	45
4.4. Determinação da resistência térmica sob cisalhamento em líquidos.....	46
4.4.1. Determinação da rotação do reator.....	49
4.4.2. Determinação do ângulo do fundo do rotor (<i>Bob</i>)	55
4.4.3. Planejamento experimental: testes no Reator de Cisalhamento.....	56
4.5. Determinação da queda de pressão dentro da unidade piloto UHT-HTST Microthermics.....	57
4.6. Determinação da resistência térmica em planta de Processo Térmico de Fluxo Contínuo.....	59
4.6.1. Avaliação da resistência térmica dentro da unidade HTST Microthermics	64
4.7. Tratamento Estatístico	70
5. Resultados e Discussão.....	73
5.1. Determinação da Resistência Térmica em Tubos TDT.....	73

5.2.	Determinação da Tensão de Cisalhamento máxima aplicada dentro do Reator de Cisalhamento	74
5.3.	Determinação da Resistência Térmica no Reator de Cisalhamento.....	75
5.3.1.	Resultados do planejamento experimental aplicado.....	77
5.3.2.	Análise dos resultados do planejamento experimental, usando o Valor Linear de D como variável dependente:.....	79
5.3.3.	Análise dos resultados do planejamento experimental usando o logaritmo do valor de D como variável dependente.....	83
5.4.	Resultados da determinação da resistência térmica em planta de Processo Térmico de Fluxo Contínuo.....	92
5.5.	Análise estatística: Comparação entre os parâmetros de resistência térmica obtidos pelos três métodos	105
5.5.1.	Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{TDT}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{reator}} \times \text{Temperatura}$	109
5.5.2.	Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{TDT}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 1}} \times \text{Temperatura}$	110
5.5.3.	Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{TDT}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 2}} \times \text{Temperatura}$	110
5.5.4.	Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{reator}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 2}} \times \text{Temperatura}$	111
5.5.5.	Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 1}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 2}} \times \text{Temperatura}$	111
5.5.6.	Regressão linear com dados $\text{Log } D_{\text{reator}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 1}} \times \text{Temperatura}$	112
5.6.	Considerações finais.....	115
6.	Conclusões	116
7.	Sugestões	117
8.	Bibliografia	118
9.	Anexos.....	125
9.1.	Anexo 01 – Resultados dos experimentos realizados para determinação do índice de redução decimal:	125
9.1.1.	Método do tubo TDT	125
9.1.2.	Reator de cisalhamento	129
9.1.3.	Unidade Piloto HTST Microthermics	141
9.2.	Anexo 02 – Meios de cultura usados – formulações e preparações.....	146
9.3.	Anexo 03 – Metodologia de determinação de ponto equivalente.....	147
9.4.	Anexo 04 – Planta do equipamento construído	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo de Gráfico de “Ponto equivalente”	24
Figura 2: Microfotografias de hemácias.....	28
Figura 3: Foto do Reator de Cisalhamento pronto para funcionamento	36
Figura 4: Corte transversal do sistema de aplicação de cisalhamento (copo, rotor e camisa), apresentando os principais componentes.....	37
Figura 5: Corte transversal do copo e rotor	38
Figura 6: Desenho esquemático de uma porta asséptica de amostragem.	60
Figura 7: Curva fantasma de <i>B. atrophaeus</i> em água destilada, pH 6,87, método TDT.....	73
Figura 8: Curva de sobreviventes de <i>B. atrophaeus</i> em água destilada, pH 6,87, teste realizado em Reator de Cisalhamento (T=93°C e $\sigma = 4,91\text{Pa}$). Experimento em que as amostras foram retiradas com uma agulha.....	75
Figura 9: Curva de sobreviventes de <i>B. atrophaeus</i> em água destilada, pH 6,87, teste realizado em Reator de Cisalhamento (T=95,4°C e $\sigma = 8,35\text{Pa}$). Amostras coletadas com duas agulhas	76
Figura 10: Gráfico 3D da temperatura e a tensão de cisalhamento codificados vs. o valor D obtido para <i>Bacillus atrophaeus</i> em água pH 6,87.....	78
Figura 11: Gráfico de valores de Log D observados x valores de Log D preditos pelo modelo. SQ resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$; SQ erro puro: = $3,21 \times 10^{-4}$	89
Figura 12: Superfície de Resposta do efeito da temperatura e tensão de cisalhamento sobre a Log D de <i>Bacillus atrophaeus</i> em água pH 6,87. Curva ajustada aos pontos experimentais (fatores codificados); $R^2 = 0,97$; SQ resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$; SQ erro puro: = $3,21 \times 10^{-4}$	90
Figura 13: Superfície de Resposta do efeito da temperatura e tensão de cisalhamento sobre a Log D de <i>Bacillus atrophaeus</i> em água pH 6,87. Curva ajustada aos pontos experimentais (valores reais); $R^2 = 0,97$; SQ resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$; SQ erro puro: = $3,21 \times 10^{-4}$	91
Figura 14: Curvas fantasma de <i>Bacillus atrophaeus</i> em suspensão aquosa pH 6,87, para as seções Retenção 1 e Retenção 2 da Unidade piloto HTST, com as respectivas retas de regressão linear.	101
Figura 15: Comparação entre a curva fantasma em unidade UHT e a curva fantasma predita pelo modelo do Reator de Cisalhamento, na Retenção 1, com as respectivas retas de regressão linear e intervalos de confiança (10%). Dados de $T_{eq} \times t_{eq}$ estimados por PEIE (Welt <i>et al.</i> , 1997)	102
Figura 16: Comparação entre curvas fantasmas: (n) em unidade UHT (Retenção 1), (l) predita pelo modelo do Reator de Cisalhamento, e (▲) predita pelo	

modelo TDT, com as respectivas retas de regressão linear. Dados de $T_{eq} \times t_{eq}$ estimados por PEIE (Welt et al., 1997).....	103
Figura 17: Comparação entre a curva fantasma em unidade UHT e a curva fantasma predita pelo modelo do Reator de Cisalhamento, na Retenção 2, com as respectivas retas de regressão linear. Dados de $T_{eq} \times t_{eq}$ estimados por PEIE (Welt et al., 1997)	104
Figura 18: Dados experimentais de valores de D obtidos com <i>B. atrophaeus</i> - tubos TDT (◆), no Reator de Cisalhamento (●), na unidade UHT – Retenção 1 (■) e na unidade UHT – Retenção 2 (▲).....	105
Figura 19: Dados experimentais de valores de D obtidos com <i>B. atrophaeus</i> - tubos TDT (◆); no Reator de Cisalhamento (●) a 4,91Pa; no Reator de Cisalhamento (○)-demais cisalhamentos; na unidade UHT – Retenção 1 (■) e na unidade UHT – Retenção 2 (▲), com as respectivas retas de regressão linear.....	109
Figura 20: Curva fantasma construída com os dados experimentais (Log do valor D) obtidos com <i>B. atrophaeus</i> no Reator de Cisalhamento (●) a 4,91Pa, na unidade UHT – Retenção 1 (■) com curva de regressão linear obtida, e pelo método de tubos TDT (u).....	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Valores encontrados para D(min), em experimentos realizados no laboratório de Termobacteriologia-FEA/UNICAMP.....	20
Tabela 2: Medidas das tubulações da unidade piloto UHT-HTST Microthermics que foram usadas – modelo Lab 25-DH – de acordo com especificação do fabricante (Microthermics, 1998)	42
Tabela 3: Planejamento Experimental: Variáveis e Níveis.....	56
Tabela 4: Planejamento Experimental	57
Tabela 5: Queda de pressão (δP) verificada em cada etapa da Unidade HTST – Microthermics. Valores em Pa.....	58
Tabela 6: Rotação necessária no reator de cisalhamento para causar a mesma tensão de cisalhamento estimada na unidade Microthermics. Valores em RPM.....	59
Tabela 7: Valores D obtidos em tubos TDT, em banho de óleo	73
Tabela 8: Planejamento experimental aplicado – valores reais das variáveis e valores obtidos para a resposta (Valor D)	77
Tabela 9: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos	79
Tabela 10: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro.....	79
Tabela 11: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos.....	80
Tabela 12: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro	81
Tabela 13: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos.....	81
Tabela 14: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro	82
Tabela 15: Estimativa dos efeitos para valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)”, “TEMPc (Q)” e “1L por 2L”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro..	82

Tabela 16: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos.....	83
Tabela 17: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro	84
Tabela 18: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos.....	85
Tabela 19: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro	85
Tabela 20: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L” e “SHEARc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos....	86
Tabela 21: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L” e “SHEARc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro.....	86
Tabela 22: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”, “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos	87
Tabela 23: Estimativa dos efeitos para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”, “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro	88
Tabela 24: Coeficientes de Regressão para log do valor D de <i>Bacillus atropheus</i> no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito dos termos “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma dos Erros Médios	88
Tabela 25: Análise de Variância (ANOVA) do modelo obtido	89
Tabela 26: Tratamentos térmicos (HTST) aplicados à suspensão de esporos de <i>Bacillus atropheus</i>	92
Tabela 27: Retenção 1 - Processos equivalentes, tensão de cisalhamento e fração de sobreviventes em cada experimento realizado em planta piloto HTST Microthermics com suspensão de esporos de <i>B. atropheus</i> em água pH 6,87	93
Tabela 28: Retenção 2 - Processos equivalentes, tensão de cisalhamento e fração de sobreviventes em cada experimento realizado em planta piloto HTST Microthermics com suspensão de esporos de <i>B. atropheus</i> em água pH 6,87	93

Tabela 29: Tempo e temperaturas equivalentes, e parâmetros cinéticos Energia de Ativação e valor D_{UHT-1} calculados pelo método <i>PEIE</i> para <i>Bacillus atrophaeus</i> em água pH 6,87 na unidade HTST piloto – Retenção 1. Cálculo de acordo com Welt <i>et al.</i> , 1997.....	96
Tabela 30: Tempo e temperaturas equivalentes, e parâmetros cinéticos Energia de Ativação e valor D_{UHT-2} calculados pelo método <i>PEIE</i> para <i>Bacillus atrophaeus</i> em água pH 6,87 na unidade HTST piloto – Retenção 1. Cálculo de acordo com Welt <i>et al.</i> , 1997.....	97
Tabela 31: Temperaturas e tempos equivalentes e valores D de <i>Bacillus atrophaeus</i> em água pH 6,87, para cada um dos processos realizados em unidade HTST piloto – Retenção 1. Cálculo de acordo com Swartzel, 1982 (<i>EPM</i>), e Welt <i>et al.</i> , 1997 (<i>PEIE</i>).....	98
Tabela 32: Erro médio verificado entre o valor D_{UHT-1} e o valores D_{TDT} e D_{Reator} preditos – Retenção 1.....	99
Tabela 33: Temperaturas e tempos equivalentes e valores D para cada um dos processos realizados em unidade HTST piloto – Retenção 2. Cálculo de acordo com Swartzel, 1982 (<i>EPM</i>), e Welt <i>et al.</i> , 1997 (<i>PEIE</i>).....	100
Tabela 34: Erro médio entre o valor D real e o valor D_{UHT-1} e os valores D_{TDT} e D_{Reator} preditos – Retenção 2.....	101
Tabela 35: Parâmetros estatísticos da regressão linear com log de valores D de <i>B. atrophaeus</i> vs. temperatura em tubos TDT	105
Tabela 36: Dados obtidos no Reator de Cisalhamento em ensaios de determinação de valor D de <i>B. atrophaeus</i> , usados para a regressão linear (cisalhamento: 4,91 Pa).....	106
Tabela 37: Parâmetros estatísticos da regressão linear dos dados obtidos em ensaios de determinação de valor D de <i>B. atrophaeus</i> , no Reator de Cisalhamento (cisalhamento: 4,91 Pa).....	106
Tabela 38: Dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de <i>B. atrophaeus</i> - Retenção 1 (cisalhamento: 1,9 Pa). Dados de T_{eq} e D estimados por <i>PEIE</i> (Welt <i>et al.</i> , 1997).....	107
Tabela 39: Parâmetros estatísticos da regressão linear dos dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de <i>B. atrophaeus</i> - Retenção 1 (cisalhamento: ~1,9 Pa)	107
Tabela 40: Dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de <i>B. atrophaeus</i> - Retenção 2 (cisalhamento: ~0,67 Pa). Dados de T_{eq} e D estimados por <i>PEIE</i> (Welt <i>et al.</i> , 1997).....	108
Tabela 41: Parâmetros estatísticos da regressão linear dos dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de <i>B. atrophaeus</i> - Retenção 2 (cisalhamento: ~0,67 Pa)	108

Tabela 42: Regressão linear realizada com os dados experimentais obtidos nos ensaios para obtenção do valor D, no reator de cisalhamento e na Unidade UHT piloto – Retenção 1	113
Tabela 43: Resumo da análise estatística	114
Tabela 44: Comparação entre os valores experimentais de D_{reator} e valores calculados de D_{TDT} (segundo o modelo TDT encontrado)	115
Tabela 45: Contagem de sobreviventes em tubo TDT - Ensaio a 92°C, com <i>B.atrophaeus</i> em água pH 6.87	126
Tabela 46: Contagens de sobreviventes em tubo TDT usados para calcular o valor $D_{92^{\circ}\text{C}}$	126
Tabela 47: Contagem de sobreviventes em tubo TDT - Ensaio a 94°C, com <i>B.atrophaeus</i> em água pH 6.87	127
Tabela 48: Contagens de sobreviventes em tubo TDT usados para calcular o valor $D_{94^{\circ}\text{C}}$	127
Tabela 49: Contagem de sobreviventes em tubo TDT - Ensaio a 96°C, com <i>B.atrophaeus</i> em água pH 6.87	128
Tabela 50: Contagens de sobreviventes em tubo TDT usados para calcular o valor $D_{96^{\circ}\text{C}}$	128
Tabela 51: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 27/08/2007, a 93°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	129
Tabela 52: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	129
Tabela 53: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 09/10/2007, a 93,4°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	130
Tabela 54: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	130
Tabela 55: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 26/10/2007, a 93,4°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	131
Tabela 56: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	131
Tabela 57: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 01/11/2007, a 93,4°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	132
Tabela 58: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	132

Tabela 59: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 29/11/2007, a 90,5°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	133
Tabela 60: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{90,5^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4,91\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	133
Tabela 61: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 18/12/2007, a 90,9°C e tensão de cisalhamento de 1,43Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	134
Tabela 62: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{90,9^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 1,43\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	134
Tabela 63: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 15/01/2008, a 95,4°C e tensão de cisalhamento de 1,43Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	135
Tabela 64: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{95,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 1,43\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	135
Tabela 65: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 16/01/2008, a 96,2°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	136
Tabela 66: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{96,2^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4,91\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	136
Tabela 67: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 14/02/2008, a 94,6°C e tensão de cisalhamento de 8,35Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	137
Tabela 68: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{94,6^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 8,35\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	137
Tabela 69: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 19/02/2008, a 95,1°C e tensão de cisalhamento de 8,35Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	138
Tabela 70: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{95,1^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 8,35\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	138
Tabela 71: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 19/02/2008, a 92,7°C e tensão de cisalhamento de 9,82Pa, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87.....	139
Tabela 72: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{92,7^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 9,82\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	139
Tabela 73: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 26/02/2008, a 93°C e sem tensão de cisalhamento, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	140
Tabela 74: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 0\text{Pa}$) de <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	140

Tabela 75: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 16/04/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	141
Tabela 76: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 16/04/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	141
Tabela 77: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 07/05/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	142
Tabela 78: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 07/05/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	142
Tabela 79: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 09/05/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	143
Tabela 80: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 09/05/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	143
Tabela 81: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 14/05/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	144
Tabela 82: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 14/05/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	144
Tabela 83: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 04/06/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	145
Tabela 84: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 04/06/2008, com <i>B. atrophaeus</i> em água pH 6.87	145

NOMENCLATURA

- $\dot{\gamma}$ taxa de cisalhamento média no tubo (**s⁻¹**)
- σ tensão de cisalhamento média no tubo (**Pa**)
- \bar{v} velocidade média do produto dentro da tubulação (**m/s**). É calculado como: [massa de produto em fluxo]*[área da tubulação]⁻¹*[densidade do produto]⁻¹
- ρ Densidade do fluido. (**g/mL**)
- γ Número de reduções decimais ocasionadas por determinado processo térmico.
- μ Viscosidade do fluido. (**Pa.s**)
- Ω velocidade angular de um rotor
- A** Área transversal da tubulação (**m²**)
- D₁** Diâmetro interno da tubulação
- D₂** Diâmetro da espiral (trocador)
- D_T** Índice de redução decimal. Tempo necessário, na temperatura T, para reduzir em 90% a população inicial de microrganismos, nutrientes ou fatores de qualidade (**min ou s**).
- E_a** energia de ativação da reação (**J/mol**)
- F₀** Valor de esterilização padrão, equivalente a minutos à Temperatura de referência de 121,1°C, calculado considerando o z de *Clostridium botulinum* (10°C).

- $F_z^{T_{ref}}$** Valor de esterilização, equivalente a minutos à Temperatura de referência qualquer, considerando o valor z do microrganismo ou composto de interesse
- G** Relação de redução térmica de Swartzel
- HTST** High Temperature Short Time, ou tratamento térmico a alta temperatura por curto (período de) tempo.
- k_T** constante de velocidade da reação à temperatura T (**min⁻¹**)
- lag** Fator de atraso térmico.
- log** Função logarítmica.
- m** massa de produto fluindo por unidade de tempo (**kg/seg**)
- min** Minuto
- n** índice de comportamento do fluido
- N** População final de microrganismos sobreviventes após um tempo t de tratamento térmico a uma temperatura definida, por unidade de volume (**UFC/mL**)
- N_{De}** = **N_{Re}** · $\sqrt{(D_1/D_2)}$ Número de Dean (**adimensional**)
- NMP** Número Mais Provável/mL
- No** População inicial de microrganismos por unidade de volume. (**UFC/mL**).
- N_{Re}** = $\rho \cdot \bar{v} \cdot 2 \cdot R / \mu$ Número de Reynolds (**adimensional**)
- PUNE** Probabilidade de uma Unidade Não Estéril.

- R** Constante universal dos gases ($8,3144 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
- r** Coordenada de raio
- R_t** Raio da tubulação (**m**)
- S** = $\log(N/N_0)$, Fração de sobreviventes (adimensional)
- s** Segundo
- T** Temperatura (**°C**)
- t** Tempo de residência durante o processo. (**seg**)
- TDT** Thermal Death Time, tempo de morte térmica. Nome dado ao tubo em que é determinada a resistência térmica de microrganismos e/ou fatores de qualidade. Este nome também é dado à curvas que descrevem a destruição do microrganismo/fator de qualidade.
- t_exT_e** tempo e Temperatura equivalentes a um certo processo térmico contínuo
- T_{H,C}** Temperatura do meio de aquecimento ou resfriamento (**°C**)
- UHT** Ultra High Temperature, ou tratamento térmico a alta temperatura (> 125°C).
- v** Velocidade do fluido ao longo do raio r
- z** Coeficiente de morte térmica. Intervalo de temperatura para causar variação de 10 vezes no valor D. (**°C**)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito da tensão de cisalhamento sobre os parâmetros cinéticos de inativação térmica (valores D e z) de *Bacillus atrophaeus* (antigo *B. subtilis* ATCC 9372), em suspensão aquosa pH 6,87. A fim de atingir esse objetivo, foi construído um reator de cisalhamento, capaz de aplicar tensões de cisalhamento de até 9,82Pa em temperaturas de pasteurização (90,5 a 96,2°C ± 0,5°C). Foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional, com duas variáveis independentes – Tensão de cisalhamento e Temperatura – e valor D como variável resposta. Foram executados 12 experimentos, e o modelo obtido foi “Log (D) = 11,30 – 1,104x10⁻¹ T(°C) – 1,153x10⁻² σ(Pa)”, com R² = 0,97, sendo os termos lineares das variáveis significativos a p < 0,1.

Também foram determinados os valores D e z de *B. atrophaeus* na faixa de temperatura de pasteurização (92~97°C), pelo método tradicional em tubos TDT (batelada), e usando dados cinéticos adquiridos de uma planta piloto HTST Microthermics (contínuo), em condições de tensão de cisalhamento similares àquelas aplicadas no reator. A fim de avaliar o processamento térmico contínuo aplicado na unidade HTST, foi usada a metodologia de determinação de processo equivalente conhecida como Paired Equivalent Isothermal Exposures – PEIE (Welt *et al.*, 1997).

Os valores de z obtidos foram: $11,8^{\circ}\text{C} \pm 1,56^{\circ}\text{C}$ pelo método TDT e $6,35^{\circ}\text{C} \pm 0,35^{\circ}\text{C}$ no reator de cisalhamento e na primeira seção de retenção da unidade piloto HTST.

Diversos autores reportaram mudanças nos parâmetros cinéticos de microrganismos, ao realizar a sua determinação por métodos em batelada (tubos TDT, ou capilar) e em processos contínuos. À semelhança desses autores, foi verificado que os valores D de *B. subtilis* foram significativamente ($p < 0.05$) inferiores em todos os processos em que foi aplicado cisalhamento.

A razão entre os valores D experimentais obtidos no reator de cisalhamento e os valores obtidos pelo modelo estimado pelo método TDT foi calculada, e variou entre 57% e 75%, indicando redução significativa na resistência térmica do microrganismo.

Existe, portanto, potencial de aplicação industrial imediata deste tipo de sistema, a fim de causar a redução da resistência de esporos suspensos em líquidos sob processamento térmico, e levando a processos térmicos mais brandos.

Palavras-chave: Tensão de cisalhamento, Pasteurização, Processos não-térmicos, *Bacillus atrophaeus*, Processos contínuos

ABSTRACT

This research aimed to determine the effect of temperature, and shear stress, on *Bacillus atrophaeus* (former *B. subtilis* ATCC 9372) spores suspended in sterile distilled water, pH 6.9.

To achieve such objective, a Shear Reactor was developed to be capable of applying 9.82Pa shear stress, under pasteurization conditions (90,5 a 96,2°C ± 0,5°C). A Central Composite Design of experiments was used and it was composed by two independent variables – Shear stress and Temperature – and one response – the D-value. Twelve experiments were performed, and the model obtained was “Log (D) = 11,30 – 1,104x10⁻¹ T(°C) – 1,153x10⁻² σ(Pa)”, with R² = 0,97, and the linear terms statistically significant (p < 0,1).

The D and z-values of *B. atrophaeus* were determined in the pasteurization range of temperature (92~97°C), using the classical TDT tube method (batch method), and using kinetic data acquired in a Microthermics HTST pilot plant (continuous method), under shear stress conditions similar to shear reactor. The continuous thermal process was evaluated through the Paired Equivalent Isothermal Exposures – PEIE – method (Welt et al., 1997).

The z-values obtained were: 11,8 ± 1,56°C (TDT-method), and 6,35 ± 0,35°C (Shear reactor and first retention section of the HTST pilot plant).

Several authors reported changes in the kinetic parameters of microorganisms, when determining it through batch or continuous methods. Just

like them, in this research it was verified that the D-values under shear stress process were statistically lower ($p < 0.05$) than those in batch method (no shear).

The ratio between experimental D values obtained in the shear reactor and those obtained from the TDT model was calculated and ranged between 57% and 75%, indicating a significant reduction of the microorganism's thermal resistance. Hence there is an immediate potential for industrial application of this kind of process since it causes the reduction of the resistance of spores in fluids under thermal process allowing for less aggressive thermal process.

Keywords: Shear stress, Pasteurization, Non-thermal process, *Bacillus atrophaeus*, Continuous flow process

1. Introdução e Justificativa

Alimentos são aquecidos por diversas razões, e uma das principais é inativar microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, a fim de aumentar a sua vida de prateleira. Porém, da mesma forma que inativa os microrganismos, a aplicação de processos térmicos também altera fatores de qualidade do alimento, como concentração de vitaminas, cor e sabor (Lewis; Heppell, 2000).

Os processos térmicos aplicados variam muito em seu grau de severidade, indo desde processos brandos, como termização e pasteurização, até processos drásticos, como é o caso da esterilização de alimentos já embalados. A severidade do processo térmico, considerada isoladamente, irá afetar tanto a vida de prateleira do produto como suas características de qualidade (Lewis; Heppell, 2000).

Os processos térmicos podem ser divididos em processos em batelada e contínuos. Historicamente, os processos em batelada são os mais antigos, tendo surgido em meados do século XVII, na França (Gava, 2002). Mais tarde, no século XIX, foi construído e patenteado um processo de esterilização contínuo, no qual o leite era aquecido a temperaturas entre 130°C e 140°C (Lewis; Heppell, 2000).

Tradicionalmente, o processo em batelada consiste em aquecer o alimento já envasado, em autoclaves ou em tachos abertos, sendo estes aquecidos com vapor saturado e/ou água em estado líquido até uma temperatura previamente estabelecida, seguido por manutenção a essa temperatura pelo tempo de processo, sendo então resfriados e as embalagens retiradas.

Nos processos térmicos contínuos, que são aplicados quase que somente a alimentos fluidos, o alimento é aquecido até a temperatura de pasteurização ou esterilização, esta é mantida durante um tempo de retenção, e em seguida resfriado. As operações de aquecimento e resfriamento devem ser tão rápidas quanto for possível, para reduzir os efeitos nocivos que ocorrem ao produto fluido nestas fases. Tal cuidado se justifica pelo fato de o cálculo do efeito de letalidade, para fins legais, considerar apenas o tempo de manutenção à temperatura de pasteurização/esterilização (FDA, 2002), não levando em consideração a letalidade causada pelo aquecimento e pelo resfriamento, que podem ser significativos.

A grande vantagem do processo contínuo sobre o processo em batelada está na velocidade do processo: os alimentos são aquecidos e resfriados muito mais rapidamente, a temperaturas mais altas (por tempo mais curtos) que nos processos em batelada, provocando aumentos expressivos, tanto na economia de energia, como na retenção dos fatores de qualidade do produto. Além dessas vantagens referentes à qualidade do produto, o processador também ganha em escala, processando quantidades muito maiores de produto no mesmo espaço de tempo. É importante ressaltar que, no processo contínuo, é exigido que o material de embalagem também seja esterilizado, e o produto deverá ser embalado em ambiente asséptico, a fim de evitar contaminação pós-processo.

Para o desenho de processos térmicos, é necessário modelar a cinética das reações que controlam:

- a inativação microbiana;
- as mudanças físicas, químicas e bioquímicas do produto em questão.

Estas cinéticas de reação de degradação térmica são funções de características do alimento, tais como:

- pH;
- atividade de água;
- densidade;
- viscosidade;
- propriedades térmicas, entre outras.

A taxa de destruição térmica à qual o microrganismo (e/ou o fator termodegradável considerado alvo do processo) é inativado é o principal ponto de estudo para o desenho de processos térmicos contínuos. Cada microrganismo apresenta uma resistência térmica característica, e esta depende não somente da espécie, mas também do estado fisiológico do microrganismo, se está na forma de célula vegetativa ou de esporo, e da composição do alimento.

Segundo Stumbo (1965), temperaturas pouco acima da máxima à qual ocorre crescimento bacteriano causarão a morte das células vegetativas; porém, os esporos dessas mesmas bactérias, em geral, sobrevivem a temperaturas muito superiores. Devido a essa característica, a inativação dos esporos deve ser o principal foco de atenção durante o desenho de tratamentos térmicos de produtos estáveis à temperatura ambiente.

O método mais comumente usado para estudar a cinética de destruição de microrganismos e/ou fatores de qualidade é conhecido como o método do tubo TDT (Thermal Death Time). Neste método, aquece-se rapidamente tubos selados de vidro tipo Pyrex de parede fina (1-2 mm), contendo suspensão do alimento com

uma concentração conhecida de microrganismos, em banho termostático de precisão, de água ou de óleo (meio de aquecimento), ajustado a uma temperatura constante, durante diferentes períodos de tempo, seguido de imediato resfriamento em água fria ou gelada. Em seguida, limpa-se o óleo do exterior dos tubos, esteriliza-se a sua superfície externa com um agente químico, inocula-se seu conteúdo em meios apropriados de subcultura para posterior contagem dos sobreviventes, e, por fim, determina-se a população sobrevivente. Constrói-se um gráfico com o logaritmo da população vs. tempo de tratamento térmico de cada amostra. Caso a curva obtida seja uma reta, através de regressão linear obtêm-se os parâmetros de morte térmica que permitem desenhar os tratamentos térmicos a temperaturas próximas àquelas em que foi realizado o teste (Bigelow e Esty, 1920), sendo possível interpolar os dados com razoável confiança.

Stumbo (1965) desenvolveu um aparelho chamado termoresistômetro: uma grande câmara de vácuo pressurizada capaz de manter-se estável à temperatura requerida, dentro da qual pequenos recipientes rasos, feitos de metal, são introduzidos contendo pequenos volumes de suspensão de esporos. Tal arranjo permite que sejam feitos testes a várias combinações de tempo e temperatura com um atraso térmico mínimo. Este aparelho foi utilizado por Pflug e Esselen (1953) e Gaze e Brown (1988). Estes últimos mediram as cinéticas de morte térmica de esporos de *Clostridium botulinum* nas temperaturas de tratamentos UHT. O termoresistômetro tinha por principais desvantagens o seu tamanho avantajado e seu elevado custo de construção, uma vez que sistemas comerciais não existem (Lewis e Heppel, 2000).

Lewis e Heppel (2000) relataram que a cinética de destruição térmica também pode ser determinada usando equipamentos de Processamento Térmico de Fluxo Contínuo, em escala laboratorial, piloto ou industrial.

Burton *et al.* (1977), usando uma planta de processamento contínuo de injeção direta, reportaram tempo de aquecimento de menos de 0,1 segundo, mas ressaltaram que:

- Existe uma distribuição no tempo de residência (DTR) do produto enquanto este atravessa o equipamento e, conseqüentemente, a medida da DTR para os diferentes tipos de alimentos líquidos não é trivial;

- O cálculo dos parâmetros da cinética de morte térmica a partir dos dados obtidos requer especial atenção.

Além de Burton *et al.* (1977), também Heppell (1985) e Daudin e Cerf (1977) usaram este método, sendo que Daudin e Cerf inseriram uma modificação no equipamento, eliminando o problema de distribuição do tempo de retenção encontrado por Burton *et al.* (1977).

Em tais sistemas de fluxo contínuo, os índices de redução decimal (valores D) são determinados a partir da contagem inicial do inóculo e da contagem final de sobreviventes, representando a destruição térmica total resultante das porções isotérmicas e não isotérmicas do sistema. As taxas de inativação determinadas a uma temperatura constante são mais úteis e apropriadas; porém, este é um ideal quase inatingível, mesmo em plantas de processamento contínuo em escala piloto. De fato, quase todos os processos térmicos não são isotérmicos, levando à necessidade de descrição detalhada do sistema, a fim de levar em conta a sua contribuição na morte térmica. Tal contribuição poderá ser então estimada a partir

do perfil térmico de aquecimento e resfriamento do processo. Em sistemas de injeção direta, como os utilizados por Burton *et al.* (1977) e Busta (1967), o aquecimento é quase instantâneo. No entanto, deve ser levado em conta o efeito de diluição do condensado para determinar as taxas de inativação térmica (Fairchild *et al.*, 1994).

Diversos autores têm encontrado dados conflitantes quanto à morte térmica predita para processos térmicos em sistemas contínuos, quando comparados com os dados experimentais obtidos pelo método do tubo TDT, para os mesmos microrganismos e em processos equivalentes (Mackey e Bratchell, 1989; Wescott *et al.*, 1995; Fairchild *et al.* 1994; Bunning *et al.* 1988; Busta, 1967; Burton *et al.*, 1977; e Vieira *et al.*, 2002). Tal fato é de grande interesse, pois, por volta de 1960-1980, foi comum utilizar os dados gerados em temperaturas inferiores àquelas praticadas na região de UHT para obter os parâmetros térmicos, e extrapolá-los para obter os parâmetros a 130-145°C. Lewis e Heppell (2000) indicaram que existe perigo considerável em prever as cinéticas de morte térmica a altas temperaturas pela extrapolação de dados obtidos a baixas temperaturas, e que, sempre que possível, as medidas devem ser tomadas na região próxima à temperatura de interesse, a fim de que o uso do modelo cinético ajustado aos dados não leve a erros significativos.

Edwards *et al.* (1965a e 1965b) observaram respostas atípicas de mesófilos anaeróbios e termófilos aeróbios ao Processamento Térmico de Fluxo Contínuo. Busta (1967) verificou valores de *z* excepcionalmente altos e resistência térmica relativamente alta de *Clostridium sporogenes* (PA3679) a 132°C, ressaltando as peculiaridades do tratamento Processamento Térmico de Fluxo Contínuo. Este

autor verificou ainda que os valores obtidos para as constantes de inativação térmica (índice de redução decimal – valor D e coeficiente de morte térmica – valor z) diferiam consideravelmente de outros apresentados, e conclui que é necessário avaliar experimentalmente os processos térmicos de fluxo contínuo em temperaturas ultra altas (UHT), ao invés de extrapolar dados obtidos em temperaturas inferiores, a fim de evitar erros significativos no estabelecimento de processos desse tipo.

Swartzel (1982) afirmou que “os pesquisadores teriam que desenvolver um método adequado para determinação das perdas totais de constituintes em sistemas de aquecimento indiretos. Esta informação é vital para pesquisadores que investigam efeitos físicos do processo térmico sobre os componentes químicos, físicos e microbianos do alimento”. Ou seja, é necessário que seja desenvolvido um sistema para determinação da cinética de inativação/destruição de microrganismos e constituintes do alimento, ao sofrer o efeito de um tratamento térmico em um sistema de aquecimento indireto.

Wescott *et al.* (1995) verificaram que o sistema contínuo mostrou-se mais letal que o processo em batelada, e sugeriram que a causa deste resultado pode ser a ação de forças de natureza física, tais como pressão e forças de cisalhamento, as quais não estão presentes no sistema de batelada (tubo TDT). Porém, até o momento, esta hipótese não havia sido provada em nenhuma pesquisa.

Este projeto apresenta a hipótese de que o método TDT não descreve apropriadamente a morte térmica de microrganismos presentes em alimentos aquecidos em sistemas de processamento térmico contínuo. Por outro lado,

conforme apresentado por Busta (1967), sempre que se utiliza uma unidade de processamento contínuo, está-se sujeito às peculiaridades desta unidade, e este fato dificulta a reprodutibilidade dos testes por outros laboratórios. Então, é necessária a construção de um dispositivo relativamente simples e confiável, capaz de simular diferentes processos térmicos com fluidos em movimento, no qual as principais variáveis relevantes ao processo sejam totalmente controladas.

A fim de superar tais problemas, ao longo dos trabalhos da presente tese foi construído um dispositivo que simula o efeito da tensão de cisalhamento observada num sistema contínuo agitado, para a determinação de parâmetros de resistência térmica de microrganismos, que possam ser aplicados ao desenho de processos térmicos desse tipo em escala piloto e industrial.

2. Objetivos

Verificar qual a extensão da contribuição da taxa de cisalhamento sobre a inativação de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, durante um tratamento térmico HTST.

Para atingir este objetivo, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- i. Desenvolver um equipamento capaz de aplicar as mesmas tensões de cisalhamento verificadas em equipamentos HTST, em temperaturas de pasteurização, num volume fechado e sem interferências externas;
- ii. Modelar a variação dos parâmetros cinéticos do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, usando tal equipamento e aplicando um desenho experimental tipo Delineamento Composto Completo Rotacional para temperatura e rotação;
- iii. Determinar os parâmetros cinéticos do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em tubo TDT;
- iv. Determinar os parâmetros cinéticos do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em uma unidade HTST piloto, usando o método do ponto equivalente (*EPM*) para análise dos dados de temperatura, tempo e letalidade;
- v. Comparar estatisticamente os parâmetros cinéticos encontrados.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Processamento Térmico

Rahn (1945) indicou que a ordem logarítmica de morte bacteriana permite encontrar taxas de morte térmica, e tirar conclusões a partir destas, as quais são independentes de qualquer explicação a respeito do mecanismo de inativação. Taxas de morte tornam possível comparar a resistência térmica de diferentes espécies à mesma temperatura, ou a resistência térmica de uma mesma espécie a diferentes temperaturas. Também permitem descrever em termos quantitativos o efeito de fatores relativos ao meio de aquecimento ou de subcultura, tais como concentração de sólidos e pH, na esterilização.

Lenz e Lund (1977) afirmaram que a motivação para desenhar um novo método para determinação precisa do ajuste de um processo térmico está baseada na suposição de que o novo método deverá ser conveniente para verificar os efeitos da variabilidade biológica nos cálculos de letalidade. Porém, antes de se começar a utilizar tal método, é necessário demonstrar que o novo método é tão aplicável, e pelo menos tão sensível e confiável, quanto os métodos existentes.

Quando as bactérias são sujeitas ao calor úmido, a taxa de morte é ordenada e, em aproximadamente 60% dos casos, a população segue uma redução exponencial com o tempo de exposição a temperatura constante (cinética de primeira ordem), ou log-linear (Stumbo, 1965).

Segundo Kessler (1981), a inativação térmica de microrganismos é, em geral, bem descrita como uma reação de primeira ordem (pseudo primeira ordem):

$$\text{Equação 1} \quad \frac{dN}{dt} = -k \cdot N$$

Se a Equação 1 for rearranjada e integrada:

$$\text{Equação 2} \quad \frac{dN}{N} = -k \cdot dt \therefore \int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k \cdot \int_0^t dt$$

cuja integração resulta em:

$$\text{Equação 3} \quad \ln \frac{N}{N_0} = -k \cdot t \therefore t = -\frac{2,303}{k} \log \frac{N}{N_0}$$

Onde:

N_0 : população (ou concentração) inicial de microrganismos

N : população (ou concentração) de microrganismos no tempo t

k_T : constante de velocidade da reação (taxa de morte)

t : duração do efeito (tempo de aquecimento)

fazendo

$$\text{Equação 4} \quad \left. \begin{array}{l} t = -\frac{2,303}{k_T} \log_{10} \frac{N}{N_0} \\ \frac{2,303}{k_T} = D_T \end{array} \right\} \Rightarrow \frac{t}{D_T} = -\log_{10} \frac{N}{N_0}$$

Onde D_T é o tempo necessário para reduzir a concentração de microrganismos em um ciclo logarítmico, a uma temperatura (T) constante, ou, em outras palavras, inativar 90% da população de microrganismos presente, reduzindo-a a 1/10 da inicial.

Da mesma forma, de posse de valores D de um mesmo microrganismo a diversas temperaturas, pode ser encontrada a resistência relativa de morte, o valor z (ou coeficiente de morte térmica) desse microrganismo:

$$\text{Equação 5} \quad \frac{\log(D_{T_1}) - \log(D_{T_2})}{T_1 - T_2} = \frac{1}{z}$$

Onde:

T_1 e T_2 são temperaturas distintas;

D_{T_1} e D_{T_2} são os valores D a cada uma dessas temperaturas;

z é a diferença de temperatura necessária para reduzir o valor D até 10% de seu valor inicial.

Lewis e Heppell (2000) indicaram que há poucos métodos práticos para determinação de cinéticas de destruição térmica. O mais antigo, e mais usado até hoje, é o método do tubo TDT selado.

Busta (1967) reportou diferenças significativas para as constantes térmicas de inativação (valores D e z) encontradas por ele e por outros pesquisadores (Esselen e Pflug, 1956; Franklin *et al.*, 1959; Stumbo *et al.*, 1950; Wang *et al.*, 1964), para *B. stearothermophilus* inoculado em sistema UHT, quando comparado ao sistema TDT.

Burton *et al.*(1977) também indicaram diferenças entre os valores dos parâmetros cinéticos de destruição térmica determinados pelo método do tubo TDT e em sistemas contínuos; estes autores verificaram que os resultados para morte térmica de *Bacillus stearothermophilus* em um processo contínuo e em tubo TDT a temperaturas inferiores a 145°C não coincidiam, sendo que a taxa de morte térmica a 137°C, em processo contínuo, era metade daquela verificada no tubo

TDT. Estes pesquisadores verificaram esta discrepância tanto para inóculo em água quanto para inóculo em leite. Os autores creditaram as inconsistências encontradas a erros experimentais, sugerindo que poderia se tratar de uma falha em caracterizar corretamente a planta de processo utilizada, em termos de tempo ou temperatura; ou que existe alguma diferença fundamental entre a destruição do esporo em tubos capilares e em processamento contínuo.

David e Merson (1990) *apud* Fairchild *et. al.* (1994) utilizaram um reator controlado por computador que permitia medir tempos muito curtos na faixa de temperatura UHT, tendo um atraso térmico de 0,4 seg. Estes autores demonstraram que a curva de sobreviventes de esporos de *B. stearothermophilus* era de natureza não linear, acima de 145°C, sendo necessário usar 2 coeficientes térmicos (valor z) diferentes para descrever a cinética relativa de morte. Na faixa de 115-145°C, determinaram valor z de 9,3°C; e entre 145-160°C, o valor z encontrado foi 16,9°C. Ainda, ressaltaram que a extrapolação de valores de D, obtidos em temperaturas abaixo de 145°C, levariam a uma estimativa de $D_{155^{\circ}\text{C}}$ com erro de 69%, em relação ao valor D real verificado.

Wescott *et al.* (1995) trabalharam com esporos de *Bacillus cereus* T (entre 99°C e 107°C) e *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (entre 128,5°C e 139°C), e obtiveram os seguintes resultados:

- O valor z do *Bacillus cereus* não foi significativamente diferente quando determinado em sistema contínuo e em sistema em batelada; no entanto, o sistema contínuo mostrou-se mais letal que o sistema em batelada;

- O valor z do *Bacillus stearothermophilus* em sistema contínuo e em sistema em batelada foram diferentes, sendo que o sistema em batelada mostrou-se mais letal que o sistema contínuo;

- Por fim, os autores concluem que os dados obtidos em sistema batelada podem não ser suficientemente precisos para prever ou desenhar processos contínuos, e sugeriram a atuação de forças físicas, dentro de sistemas contínuos, como responsável por este comportamento.

Bunning *et al.* (1988) determinaram a resistência de *Listeria monocytogenes* utilizando tubo TDT selado e trocador de calor de fluxo empistonado, e encontraram valores de z de 5,6°C e 8,0°C, respectivamente.

Fairchild *et al.* (1994) também compararam a cinética de destruição térmica nos sistemas de processamento térmico em batelada e contínuo, e encontraram valores diferentes para z , sugerindo, como Burton *et al.* (1977), que o mecanismo de morte térmica é fundamentalmente diferente nestes dois sistemas.

Em 1982, Swartzel publicou uma pesquisa onde apresentava uma nova maneira de desenhar processos térmicos mediante método computacional, conhecido como Método do Ponto Equivalente (*EPM*), relacionando o efeito de um processo térmico utilizando trocador de calor indireto com um processo equivalente em sistema direto. Este autor sugeriu que o perfil térmico de um trocador de calor indireto pode ser calculado a partir da equação exponencial apresentada por Deindoerfer e Humphrey (1959).

Para um trocador de calor indireto, esta solução apresenta-se na forma:

Equação 6

$$T_1 = T_{(H,C)} \cdot \left[1 + \left(\frac{T_0 - T_{(H,C)}}{T_{(H,C)}} \cdot e^{-\left(\frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot c_p} \right) t_{(H,C)}} \right) \right]$$

Onde

$T_{H,C}$ é a temperatura do meio de aquecimento ou resfriamento;

T_0 é a temperatura do produto no início do processo térmico;

T_1 é a temperatura do produto ao fim do processo térmico;

$t_{(H,C)}$ é o tempo total do processo térmico;

U_t : coeficiente global de transferência de calor;

A : área de troca de calor;

ω_p : massa de produto fluindo no trocador de calor;

C_p : calor específico do produto.

Para o cálculo exato do perfil térmico, as propriedades térmicas e os coeficientes de transferência de calor devem ser conhecidos. Entretanto, além de serem funções da temperatura, estão bem caracterizados somente para alguns poucos fluidos.

Porém, para cada processo térmico, a relação $(U_t \cdot A) / (\omega_p \cdot c_p)$ pode ser considerada constante, permitindo a sua substituição por uma nova variável **J**. Este artifício matemático elimina a necessidade de conhecer U_t , ou as propriedades térmicas do produto. Por outro lado, a Equação 6 assume que a temperatura dos meios de aquecimento/resfriamento ($T_{H,C}$) é constante, o que, na prática, raramente é verdadeiro.

Rearranjando a Equação 6, de maneira a isolar T_1 , e substituindo-o por $T(t)$, que é a temperatura em função do tempo, tem-se:

$$\text{Equação 7} \quad T(t) = T_{(H,C)} + (T_0 - T_{(H,C)}) \cdot e^{-J \cdot t}$$

Dessa forma, usando a Equação 7, foi possível construir o perfil térmico do produto dentro das tubulações de um sistema de tratamento térmico contínuo (Deindoerfer e Humphrey, 1959).

Jung e Fryer (1999) usaram um *software* CFD (Computational Fluid Dynamics) para simular processos de esterilização contínua de alimentos fluidos newtonianos e não-newtonianos em tubos de seção circular com temperatura uniforme nas paredes. Seu objetivo foi demonstrar como um modelo reológico de um fluido homogêneo pode ser usado para desenhar um processo HTST, e comparar seus resultados àqueles do método comumente utilizado para desenhar processos térmicos, segundo o qual o fluido, em toda a seção transversal da tubulação, está na temperatura média, e a partícula mais rápida movimenta-se com o dobro da velocidade média, de modo que o tubo de retenção deve ter comprimento suficiente para garantir que esta partícula receba o tratamento térmico necessário, em seu interior. Ao analisar os resultados das simulações, verificaram que, de acordo com o modelo reológico, existe grande diferença entre as temperaturas do fluido próximo à parede e no centro da tubulação: na saída do aquecedor, a temperatura era 131°C próximo à parede, e 83°C no centro; na saída do tubo de retenção, a temperatura na parede caiu para 105°C; e durante o início do resfriamento, embora a temperatura do fluido próximo à parede caia rapidamente, no centro do tubo continuou a subir.

Jung e Fryer (1999) verificaram que, com respeito à cinética microbiana, e à retenção de qualidade, o método usual de desenho de processo industrial (que assume que o produto flui com um perfil newtoniano completamente desenvolvido, com a velocidade máxima igual ao dobro da velocidade média) causa uma degradação até 10 vezes maior dos fatores de qualidade, comparado com o processo realmente necessário para produzir um produto seguro do ponto de vista de saúde pública.

Kelder *et al.* (2002) simularam o efeito do formato tridimensional de trocadores de calor tubulares em espiral, verificando numericamente que o efeito de forças centrífugas induzem a vórtices de Dean, resultando em misturas mais homogêneas, e aumentando substancialmente a transferência de calor. Ainda, no caso de a densidade do fluido ser dependente da temperatura, são induzidos vórtices de Morton, aumentando ainda mais a eficiência do processo. Dessa forma, trocadores de calor em espiral teriam menores distribuições de tempo de residência e melhor eficiência na transferência de calor, levando a perfis térmicos mais próximos daqueles empistonados, e otimizando o uso da estratégia UHT. Seus resultados indicaram que valores de N_{De} tão baixos como 1 levam a diferenças de mais de 50% no comprimento necessário para atingir a temperatura desejada, influenciando diretamente a letalidade obtida em seu interior.

Sahoo *et al.* (2002) reportaram um método computacional para dimensionar processos térmicos em trocadores de calor de tubos concêntricos, triplo (vapor-produto-vapor) para aquecimento e duplo (água-produto) para resfriamento. Neste método, que pode ser entendido como um método direto, quase didático, foi considerado que o produto atinge a saída de cada seção com temperatura

homogênea. Como tais trocadores ocupam grande espaço, os autores sugerem o uso do formato espiral a fim de torná-lo mais compacto. Entretanto, não foram considerados os efeitos de curvatura (N_{De}) ao longo de sua análise e validação experimental. Como precognizado pelo trabalho independente de Kelder *et al.* (2002), os resultados obtidos indicaram sobreprocessamento, uma vez que o tratamento desenhado pelo método proposto deveria reduzir a contaminação em 8 ciclos logaritmos, e foram obtidas mais de 9 reduções, de acordo com os seus dados experimentais.

Loss e Hotchkiss (2004) realizaram determinação de cinética de inativação térmica de microrganismos em um equipamento de tratamento térmico de fluxo contínuo em escala laboratorial, afirmando que o uso de um equipamento nessa escala é comparável com a prática comercial, especialmente quando trabalhando com patógenos. Este equipamento era formado por uma serpentina de aço inoxidável, imersa em um banho de óleo aquecido, seguida por outra serpentina imersa em mistura de água-gelo, através das quais foi bombeado leite inoculado com o microrganismo. As serpentinas tinham diâmetro interno de 0,254, 0,45 e 0,76 mm, com diâmetro externo de 1,588 mm. Os microrganismos testados foram *Pseudomonas fluorescens* R1-232 (células vegetativas) e *Bacillus coagulans* A1-029 (esporos). Neste equipamento, foram obtidos tempos de aquecimento de 3 e 0,29s para as serpentinas de 0,76 e 0,25mm (diâmetro interno), eliminando as limitações geralmente ligadas a tais experimentos. Os autores afirmam que, usando este aparato e o ajuste de curva pelo modelo de Weibull, foi possível usar todos os dados obtidos, sem a necessidade de descartar os dados iniciais

(ombro), caracterizando precisamente a resistência térmica de esporos e células vegetativas.

Em 1999, Bulut *et al.* verificaram forte correlação entre a destruição bacteriana e as taxas de cisalhamento causadas em um extrusor e em reômetro rotacional tipo cone-prato. Em seus experimentos, usaram células vegetativas de *Microbacterium lacticum*, uma bactéria Gram-positiva não formadora de esporos, resistente ao calor, originalmente isolada de ovos líquidos pasteurizados. O valor $D_{75^{\circ}\text{C}}$ foi determinado como 20 minutos (em gelatina com 65% de umidade). Seus resultados em extrusor indicaram que a aplicação de 409kPa a 73°C por 58s foram suficientes para reduzir a população em 5,3 log. Em seus ensaios em reômetro, foi aplicado uma taxa de cisalhamento de 804 s^{-1} , contra controle em tubo em banho aquecido, e foi observado que o microrganismo era inativado mais rapidamente sob cisalhamento, com valor $D_{75^{\circ}\text{C}} \approx 3,5\text{min}$, ou seja, uma redução de aproximadamente 6,5 vezes.

Em pesquisas do laboratório de Termobacteriologia da FEA/UNICAMP, sobre validação de processos térmicos de sucos de frutas, reportados por Massaguer (2002, 2003), verificou-se que os tratamentos térmicos em unidade asséptica têm produzido índices de pasteurização muito mais elevados do que seria esperado, conforme a determinação da resistência térmica de microrganismos em tubos TDT (Tabela 1). Esta constatação advém da análise dos dados de história térmica (perfil térmico simulado de acordo com Deindoefer e Humphrey, 1959), obtidos a partir de medidas registradas mediante termopares localizados em 5 posições ao longo da tubulação de uma unidade piloto

Microthermics, equipada com trocador de calor em espiral, durante a validação do processamento térmico de sucos de frutas inoculados com microrganismos, e dos resultados das contagens efetivas realizadas após processamento desses produtos para determinação de sobreviventes. Na Tabela 1 estão apresentados alguns dos resultados obtidos para ensaios com inoculação indireta de microrganismos (esporos imobilizados em esferas de alginato) em diversos produtos, assim como os valores D, determinados pelo método do tubo TDT, e o valor D estimado a partir das reduções decimais efetivas da população, verificadas por contagem de sobreviventes em amostras processadas.

Tabela 1: Valores encontrados para D(min), em experimentos realizados no laboratório de Termobacteriologia-FEA/UNICAMP.

Produto / microrganismo	D _T (min) determinado pelo método TDT	D _T (min) segundo a contagem de sobreviventes em tratamento em unidade asséptica
Polpa de tomate 8ºBrix e pH 4,3 / <i>Bacillus coagulans</i> – Pacheco (2004)	D _{105°C} = 0,424	D _{105°C} = 0,292
	D _{109°C} = 0,171	D _{109°C} ≤ 0,087
	D _{115°C} = 0,044	D _{115°C} ≤ 0,085
	D _{121°C} = 0,011	D _{121°C} ≤ 0,086
	D _{124°C} = 0,006	D _{124°C} ≤ 0,085
Polpa de tomate 8ºBrix e pH 4,3 / <i>Neosartorya fischeri</i> – Pacheco (2001)	D _{105°C} = 0,400	D _{105°C} = 0,246
	D _{109°C} = 0,194	D _{109°C} = 0,213
	D _{115°C} = 0,044	D _{115°C} ≤ 0,079
	D _{121°C} = 0,022	D _{121°C} ≤ 0,085
	D _{124°C} = 0,013	D _{124°C} ≤ 0,086
Suco de Maçã, 11ºB e pH 3,5 / <i>Paecilomyces variotti</i> – Massaguer (2003)	D _{78,7°C} = 46,8	D _{78,7°C} ≤ 0,036
	D _{83,7°C} = 29,4	D _{83,7°C} ≤ 0,036
	D _{88,7°C} = 18,46	D _{88,7°C} ≤ 0,036
	D _{91°C} = 14,9	D _{91°C} ≤ 0,011
	D _{95,7°C} = 9,6	D _{95,7°C} ≤ 0,036
Suco de laranja 10,5ºBRIX e pH 4,3 / <i>Byssochlamys nivea</i> – Massaguer (2002)	D _{90°C} = 2,30	D _{90°C} ≤ 0,621
	D _{92°C} = 1,81	D _{92°C} ≤ 0,015
	D _{93°C} = 1,61	D _{93°C} ≤ 0,016
	D _{95°C} = 1,27	D _{95°C} ≤ 0,015

Os resultados a partir da contagem de sobreviventes observados na Tabela 1 denotaram que, na prática, a taxa de morte térmica em processos contínuos é bem mais elevada do que a estimada a partir dos dados cinéticos obtidos pelo método TDT.

Numa revisão sobre modelos cinéticos para sobrevivência microbiana no processamento térmico e não térmico, que resumia o IFT Summit 2003, Teixeira *in* Heldman e Newsome (2003) ressaltaram que “(...) processos HTST e UHT operam em temperaturas bem acima das quais as curvas de sobreviventes (curvas TDT) podem ser geradas. Modelos derivados de curvas de sobrevivência para uso no desenho/especificação de tais processos deveriam ser modelos determinísticos que são baseados no entendimento dos mecanismos responsáveis pelos padrões de comportamentos observados.” Ainda nesta mesma revisão, Heldman e Newsome apresentaram que os seguintes tópicos são importantes para pesquisa em modelos de sobrevivência microbiana:

- Dados sobre a influência de processos de preservação na recuperação de microrganismos – injúria, ativação, reparo, germinação e crescimento, em função de calor, pressão e outros fatores de estresse ao microrganismo – devem ser entendidos e incorporados em modelos futuros.
- Modelos de processos que incorporem incerteza devem ser desenvolvidos.

E ainda destacam que:

- Publicações contendo parâmetros de curvas de sobreviventes devem incluir uma descrição detalhada da metodologia para coleta e análise de dados incluindo limites de detecção;

- Deve ser desenvolvido um modelo, preferencialmente universal, para medição de parâmetros de intensidade de agentes (de destruição), incluindo etapas de análises dos dados e apresentação dos resultados.

3.2. Método do Ponto Equivalente – EPM e Método de Exposições Equivalentes Pareadas – PEIE

A eficácia de um processo térmico geralmente é expressa em termos de um valor de esterilização (valor F). Uma unidade padrão de letalidade, conhecida como Fo, é utilizada para mensurar o efeito de esterilização de um processo. Esta unidade é igual a minutos equivalentes na temperatura de referência de 121,1°C, considerando z de 10°C. Para sistemas térmicos em que a temperatura é variável, Fo é dado por:

Equação 8
$$F_0 = \int_0^t 10^{\frac{T(t)-121.1}{10}} dt$$

Onde T(t) é a temperatura no ponto frio do produto a uma certa altura do processo.

Técnicas para avaliar a Equação 8 foram objeto de elaborados desenvolvimentos de procedimentos de cálculo para processos em batelada (Ball, 1928; Cheftel e Thomas, 1963; Tung e Garland, 1978; e Pflug, 1988a e 1988b). O procedimento mais usado é o Método Geral, descrito no clássico trabalho de Bigelow *et al.*(1920). Limitações do Método Geral levaram muitos pesquisadores a investigar métodos alternativos para determinações práticas do processo térmico.

Swartzel (1982) desenvolveu o Método do Ponto Equivalente (*Equivalent Point Method-EPM*) para processos contínuos, baseado no modelo cinético de Arrhenius. Este método foi usado para caracterizar sistemas térmicos que parecem, à primeira vista, como independentes dos parâmetros cinéticos de qualquer constituinte. Ele demonstrou que qualquer processo térmico contínuo pode ser representado por um tempo equivalente (t_e) e uma Temperatura equivalente (T_e). Isso seria especialmente verdadeiro no caso de um processo térmico direto, levando em consideração que o aquecimento e o resfriamento deste se dá realmente quase instantaneamente. Para tanto, usando a relação de Arrhenius de Energia de ativação, seria possível encontrar um Ponto Equivalente (T_e e t_e) que descreveria o processo isotérmico equivalente. O autor indica que este método seria suficientemente preciso para desenhar novos processos e equipamentos, e estudar parâmetros cinéticos de componentes dos alimentos, degradados na reação.

Partindo de um ponto de vista diferente, Ross (1993) chegou a conclusões semelhantes. Ele observou que a razão entre o logaritmo da destruição bacteriana e o logaritmo da formação de um marcador químico era dependente da temperatura máxima atingida durante o processo e da energia de ativação. Este trabalho apóia a noção de que um ponto equivalente não é restrito a apenas um certo perfil térmico.

A determinação do ponto equivalente envolve o cálculo de relações de redução térmicas (valores G), usando uma série de valores selecionados de Energia de Ativação (E_a) e dados de tempo-temperatura. Em um gráfico do logaritmo do tempo contra o recíproco da temperatura usando os dados para cada

par valor G-Ea se observa diversas linhas interceptando-se *quase* num único ponto (Figura 1). Se houvesse apenas um único ponto de intersecção, estaria comprovada a principal consideração do *EPM*: o ponto equivalente independe da energia de ativação.

Nunes *et al.* (1993) e Nunes(1993) introduziram um método de reparametrização, obtendo um aumento na precisão do *EPM*. Nunes e Swartzel (1990) verificaram que o uso do método de regressão ponderada usando mínimos quadrados é capaz de obter os melhores resultados.

Kyereme *et al.* (1999) apresentou a última contribuição publicada a este método, estabelecendo uma correlação entre *EPM* e Fo. Para isso, estes autores fizeram o gráfico dos diferentes pontos equivalentes obtidos de tempo e temperatura (para cada par valor G-Ea), obtendo uma curva. Estes autores testaram o novo método contra diversos dados da literatura, obtendo grau de precisão alto comparado ao Método Geral e ao *EPM* original.

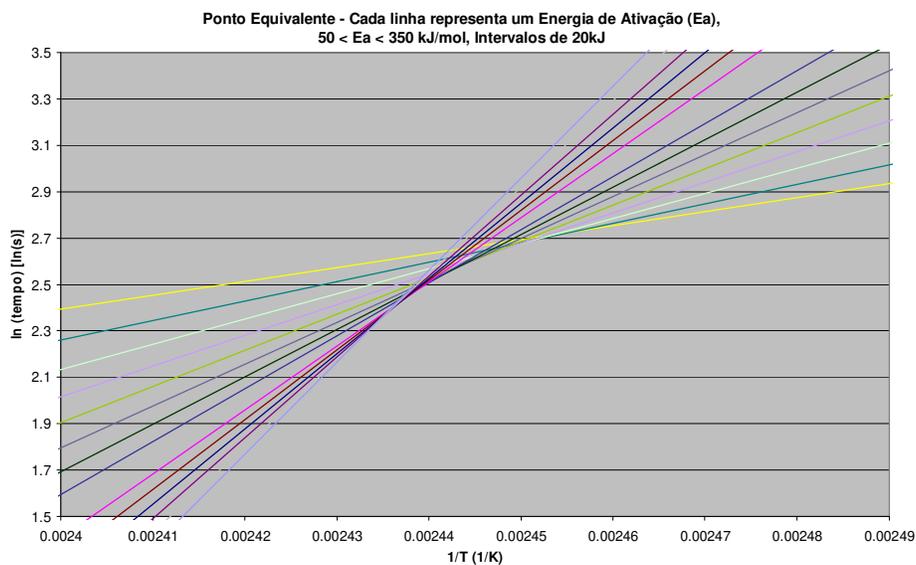


Figura 1: Exemplo de Gráfico de “Ponto equivalente”, construído em Microsoft Excel, de acordo com Nunes e Swartzel (1990).

Ao analisar matematicamente o método proposto por Swartzel (1982), Maesmans *et al.* (1995) concluíram que a consideração fundamental do método EPM – a de que as retas cruzam-se num único ponto – somente é válida para processos isotérmicos (“curvas quadradas”), e que não é possível encontrar tal ponto equivalente único para processos térmicos que não sejam desse tipo, como aqueles observados em trocadores de calor indiretos.

Já Welt *et al.* (1997) apontaram algumas dificuldades com o *EPM*, tais como: atrasos térmicos inevitáveis, amostras inconvenientemente pequenas, faixa de temperatura demasiado pequena para selecionar diferentes condições isotérmicas. Ainda, contestou a teoria de Swartzel de que o ponto equivalente é independente da Energia de ativação do composto, e sugeriu outro método para encontrar processos equivalentes, chamado *PEIE* (método de exposições pareadas equivalentes). Estes pesquisadores verificaram que a consideração de único ponto de intercepção não é válida, demonstrando isso usando cálculos simples. Eles criaram perfis térmicos, em que o aumento de temperatura seguia uma função monotônica de primeiro grau. Baseando-se nesta função simularam o efeito que tal processo teria sobre a concentração de tiamina, usando para isto os parâmetros cinéticos deste composto. Dessa forma, foram eliminados os erros devido aos sensores de temperatura ou imprecisões devido à integração numérica (fontes de erro apontadas por Sadegui *et al.* (1986) como as responsáveis pela existência de mais de um ponto de intercepção) e concluíram que o emprego do *EPM* para estimativa dos parâmetros cinéticos não pode ser preciso. Usando o *EPM* para realizar aproximações sucessivas (método que denominaram Exposição Pareada a Isotérmicas Equivalentes – *Paired Equivalent Isothermal*

Exposure, PEIE) determinaram com sucesso os parâmetros cinéticos de Arrhenius para a degradação da tiamina, que convergiram para os mesmos valores usados na simulação. Entretanto, ao tentar seguir os mesmos passos indicados por Welt *et al.* (1997), o presente autor obteve valores conflitantes, não conseguindo que os parâmetros cinéticos convergissem.

3.3. Inativação através de forças de cisalhamento (*Shear Stress*)

Embora seja bem conhecido que há diferenças entre o efeito de inativação de esporos causado em tubos TDT e em equipamentos de processamento térmico em fluxo contínuo, até o momento não havia sido reportada nenhuma pesquisa que buscasse elucidar tais diferenças.

Porém, diversos pesquisadores buscaram entender um fenômeno semelhante: a destruição de células sangüíneas em órgãos artificiais. Este tema tem sido estudado desde a década de 50, conforme relatado por Indeglia *et al.* (1967), que apresentou os resultados obtidos com os experimentos usando o “Hemoresistômetro Fleisch”, o qual consistia de um eixo capaz de girar e um cubo de 2,2 cm de aresta, imerso em um copo de 3 cm de diâmetro interno. Tanto o copo quanto o cubo eram feitos de Plexiglass ou aço inoxidável, e o copo possuía uma camisa através da qual era bombeada água a fim de manter a temperatura constante ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Quando em funcionamento, o sistema era tampado, de forma a eliminar a interface com o ar, e o cubo era colocado à rotação de 3.300 RPM por 15 minutos, à temperatura de 24°C . Estes autores usaram este equipamento para verificar fragilidade mecânica de eritrócitos de sangue humano e canino, retirados de indivíduos em jejum.

Em trabalho publicado em 1972, Leverett *et al.* reportaram estudo semelhante ao de Indeglia *et al.* (1967), em que estudaram os efeitos secundários que podem agir sobre a destruição de eritrócitos em cisalhamento, como interação com superfícies sólidas, força centrífuga, efeitos na interface líquido-ar, interação entre células e aquecimento viscoso. Por fim, verificaram que o limite de cisalhamento para causar hemólise é 150Pa, e que os diversos efeitos secundários estudados não interferem significativamente nos resultados obtidos.

Em 1975, Sutura e Mehrjardi estudaram o efeito do cisalhamento em fluxo em regime turbulento, aplicando tensões de cisalhamento entre 10 e 250 Pa. Para descrever o fluxo como turbulento, usaram o Número de Taylor (N_{Ta}) dado por:

Equação 9
$$N_{Ta} = \frac{\Omega \cdot \sqrt{R_i \cdot (R_e - R_i)^3}}{\nu}$$

Onde:

Ω é a velocidade angular do rotor;

R_i é o raio do rotor;

R_e é o raio do copo;

ν é a viscosidade cinemática do fluido ($= \mu / \rho$)

Os autores indicaram que o fluxo torna-se turbulento quando $N_{Ta} > 400$.

Estes autores obtiveram resultados muito interessantes ao injetar uma solução de 1% de glutaraldeído na suspensão de hemácias imediatamente após o fim do cisalhamento. O glutaraldeído torna a parede das células rígidas, de modo que estas fossem fixadas no formato adquirido devido ao cisalhamento. Assim, por meio de microfotografia eletrônica, pôde-se verificar que as células são afetadas

diretamente pelo cisalhamento, perdendo o seu formato típico, assumindo um formato elipsóide quando sob cisalhamento médio, e sendo destruídas quando sob maior cisalhamento (vide Figura 2).

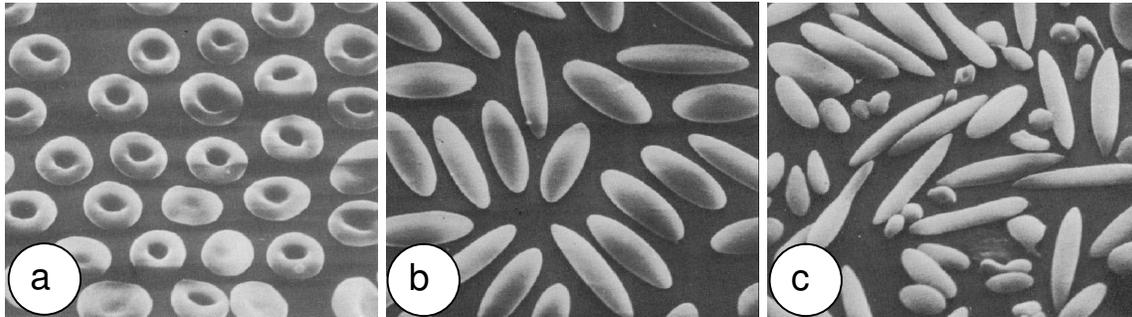


Figura 2: Microfotografias de hemácias (a)sem sofrer cisalhamento, (b)após sofrer cisalhamento a 200 Pa e (c)a 450 Pa (Fonte: Sutera e Mehrjardi, 1975)

Sutera e Mehrjardi (1975) concluíram que o cisalhamento agiu de forma regular e homogênea sobre toda a extensão de cada uma das células, como pode ser visto pelas microfotografias; isso é indicativo de que o efeito randômico de turbulência (“eddies”) tem comprimento maior que o das células, não agindo, portanto, diretamente sobre as mesmas.

Arnaud *et al.* (1993) desenharam um bioreator baseado no desenho de cilindros concêntricos, e usaram-no para cultivar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por 4h a 42°C, sob tensão de cisalhamento constante, com valores entre 0 e 72 Pa. Estes autores verificaram que o metabolismo celular melhorou significativamente a valores de tensão de cisalhamento de 36 e 50Pa, sendo que a concentração de biomassa foi maior a 36Pa. A essa tensão de cisalhamento, também foi observado aumento no comprimento da célula. Foi verificado ainda que os microrganismos cultivados a 36 Pa tiveram sua fase de adaptação(λ) e sua

taxa específica de crescimento(μ) melhorados em relação às culturas realizadas a 0 e a 72 Pa.

Lange *et al.* (2001) verificaram o efeito de altas tensões de cisalhamento sobre a viabilidade de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Para o estudo do cisalhamento, as suspensões de células foram bombeadas através de um capilar, atingindo tensão de cisalhamento máxima de 2770Pa. Entretanto, os ensaios foram realizados a 20°C, ignorando portanto os efeitos da temperatura. Os resultados não foram conclusivos, sendo verificado que a tensão de cisalhamento limite (para causar diminuição na viabilidade celular) era *maior* que 1292Pa para *S. cerevisiae*, e 1250Pa para *E. coli*. Os autores concluem sugerindo que a maior resistência da levedura (não apresentou lise da célula nem mesmo a 2770Pa) era devido à sua (relativamente) grossa camada de glucana e manana, enquanto que a baixa resistência da bactéria (lise celular a partir de 1810Pa) é devido à sua parede celular mais frágil.

Sahoo *et al.* (2003) criaram um bioreator no formato de cilindros concêntricos, capaz de manter o fornecimento de oxigênio ao fluido durante o seu funcionamento, sem afetar o fluxo dentro do espaço entre os cilindros. *B. subtilis* 168 foi cultivado neste aparelho (taxas de cisalhamento de 445, 741, 1111 e 1482s⁻¹) e em frascos de erlenmeyer agitados (taxa de cisalhamento de 0,028s⁻¹). Foi verificado que as células cultivadas a 1482s⁻¹ apresentaram menores tamanhos e duração da fase de adaptação, assim como maiores concentração final e taxa de crescimento específico, em comparação com os outros tratamentos. Aparentemente, todos esses resultados são dependentes da taxa de

cisalhamento, pois as culturas em frascos de erlenmeyer apresentaram maiores tamanhos celulares e duração da fase de adaptação, e menor taxa de crescimento específico. Em trabalho posterior (Sahoo *et al.*, 2004), estes pesquisadores verificaram que, dentre outros efeitos interessantes relacionados à expressão genética, a elevada taxa de cisalhamento também inibiu a esporulação de *B. subtilis*: ~100% de esporulação a $0,028s^{-1}$ contra 4% para $\dot{\gamma} \geq 445s^{-1}$ (esporulação induzida com HOCl ou H₂O₂).

Kameneva *et al.* (2004) estudaram o efeito da tensão de cisalhamento, em regime laminar e turbulento, sobre hemácias bovinas. Para aplicar o cisalhamento, foi usada uma bomba que impulsionava a suspensão através de um tubo capilar. A viscosidade aparente desta suspensão foi modificada pela adição de Dextran-40, de modo que variou entre 0,002 e 0,0063 Pa.s a 23°C, obtendo-se assim uma variação no valor de Reynolds entre 300 e 5000. Seus resultados indicaram que a presença de fluxo turbulento causou aumento de até 6 vezes na destruição das hemácias, quando submetidas à mesma tensão de cisalhamento.

Ge *et al.* (2008) fizeram uma análise crítica dos trabalhos já publicados sobre o efeito das tensões em um líquido em movimento sobre as células sanguíneas. Alguns dos trabalhos sugerem que o efeito destruidor sobre as hemácias pode ser devido à Tensão de Reynolds, ao invés da Tensão de cisalhamento. A tensão de Reynolds é o tensor de tensão em um fluido devido às flutuações turbulentas e randômicas durante o movimento do fluido. Ge *et al.* (2008) argumentam que o conceito de Tensão de Cisalhamento deve ser definido cuidadosamente em regimes turbulentos, pois depende da definição precisa da

distribuição de velocidades nesse fluido; por outro lado, a Tensão de Reynolds é uma aproximação estatística para as tensões presentes em tais regimes, não possuindo nenhuma ligação direta com nenhuma força física. Estes autores fazem então extensa análise dos dados obtidos para uma análise computacional do fluxo sanguíneo através de uma válvula cardíaca tipo bi-folha (prótese artificial). Por fim, estes autores concluem afirmando que a Tensão de Reynolds não é representativa do ambiente turbulento experimentado pelos elementos sanguíneos, falhando em explicar o mecanismo de ataque a eles. Verificaram que as estruturas de fluxo que surgem neste movimento são várias ordens de grandeza superiores às células sanguíneas, não sendo capazes de danificá-las. A conclusão mais importante à luz do presente trabalho é que tais tipos de fluxo (turbulento e em pequena escala) deveriam ser bem entendidos para se verificar seu efeito sobre células em suspensão e, para isso, é interessante o uso de simulações numéricas 3D de alta definição.

3.4. *Bacillus atrophaeus* (antigo *Bacillus subtilis* var. *niger* - ATCC9372)

Também citado como *Bacillus globigii* (Fritze e Pukall, 2001), este microrganismo foi escolhido por apresentar cinética de destruição térmica bem documentada, e encontrar-se prontamente disponível no Laboratório de Termobacteriologia (FEA/UNICAMP). Sua cepa pode ser encontrada sob os seguintes identificadores: ATCC 9372, DSM675, CIP 77.18, IFO 13721, NBRC 13721, NCDO 738 e NCIB 8058.

De acordo com Mossel *et al.* (1995), a espécie *Bacillus subtilis* é aeróbica estrita, produtora de ácido a partir de glicose, capaz de metabolizar manose,

xilose, amido e gelatina, hidrolizar uréia, reduzir nitrato e produzir acetil-metil-carbinol. Os autores reportam $D_{100^{\circ}\text{C}}=11,0\text{min}$, $D_{110^{\circ}\text{C}}=6,9\text{min}$ e $D_{120^{\circ}\text{C}}=0,5\text{min}$ ($a_w \geq 0,95$ e $\text{pH} = 7$). De acordo com Kramer e Gilbert (1989), embora esta espécie seja normalmente não patogênica, a ingestão de alimentos contaminados com $10^5/\text{g}$ ou mais pode levar a vômitos e enterite.

Ao microscópio, aparece como um bastonete Gram-positivo, medindo entre $0,7$ e $0,8\mu\text{m}$ de diâmetro e entre 2 a $3\mu\text{m}$ de comprimento. Seus endosporos são centrais, e as células não ficam entumecidas. É um microrganismo mesófilo (temperatura de incubação ótima 30°C), não apresentando nenhum crescimento a $55-60^{\circ}\text{C}$ (Marques, 2002).

Este microrganismo destaca-se por ser de fácil crescimento, esporulação simples, e apresentar boas características de reprodutibilidade entre ensaios (Pinto, 1991).

Licciardello e Nickerson (1963) determinaram a resistência térmica do *B. subtilis* var. *niger* em tampão fosfato ($\text{pH} 7,0$) dentro de capilares, e obtiveram valores D de $10,3$, $3,5$ e 1 min, a 90 , 95 e 100°C , respectivamente. Estes autores chamaram a atenção ao fato de a curva apresentar ombro pronunciado; porém, os autores aplicaram um choque térmico ($80^{\circ}\text{C}/10\text{min}$) à suspensão de esporos antes dos tratamentos térmicos, o que pode ter induzido dormência dos esporos, como indicado por Heldman e Newsome (2003). O valor z obtido foi aproximadamente 10°C .

Cho *et al.* (1999) testaram o efeito de aquecimento, pelo método convencional e pelo método ôhmico, sobre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em solução de NaCl $0,1\%$, reportando pequenas diferenças nos valores D

encontrados. Para aquecimento convencional, estes autores reportaram $D_{88^{\circ}\text{C}}=32,8\text{min}$, $D_{92,3^{\circ}\text{C}}=9,87\text{min}$, $D_{95^{\circ}\text{C}}=5,06\text{min}$ e $D_{97^{\circ}\text{C}}=3,05\text{min}$, apresentando valor z de $8,74^{\circ}\text{C}$ e Energia de Ativação de $293,1\text{ kJ/mol}$.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Equipamento para aplicação de Cisalhamento

Para atingir o objetivo específico “ i ”, um equipamento foi concebido, a partir da idéia de um viscosímetro tipo “Mooney-Couette” (cilindros concêntricos), em que um fluido é contido entre dois cilindros concêntricos, e submetido ao cisalhamento quando um destes cilindros é submetido à rotação constante (Steffe, 1996).

Este equipamento foi desenhado para ter as seguintes características:

- Copo de diâmetro interno de 100mm, com profundidade de 120mm;
- Rotor de diâmetro de 90mm, com extremidade inferior em forma de cunha circular, formando ângulo de 5,43° com a horizontal;
- “Camisa” através da qual o meio de aquecimento pudesse circular, com quatro orifícios de acesso para entrada/saída de meio; ao redor da camisa, uma manta de isolamento, a fim de aumentar a segurança ao operador e estabilizar a temperatura;
- Construção em aço inox, de tal forma que as superfícies que entrassem em contato com o fluido a ser cisalhado pudessem ser esterilizadas por calor úmido, entre cada experimento;
- Equipado com um motor controlado por variador de frequência, de modo que a velocidade de rotação pudesse ser variada, permitindo o controle sobre o cisalhamento aplicado.

Este equipamento foi denominado Reator de Cisalhamento. Sua planta completa está apresentada no “Anexo 04 – Planta do equipamento construído”, cujos detalhes serão discutidos a seguir.

Na Figura 3 está apresentada uma foto do equipamento montado, conectado ao sistema de aquecimento (água quente) através de mangueiras flexíveis de aço inox e com as agulhas e seringas de inoculação/amostragem instaladas. Protegidos pela carenagem, estavam o variador de frequência e o motor de 0,5 CV, responsáveis por transmitir a rotação desejada ao rotor.

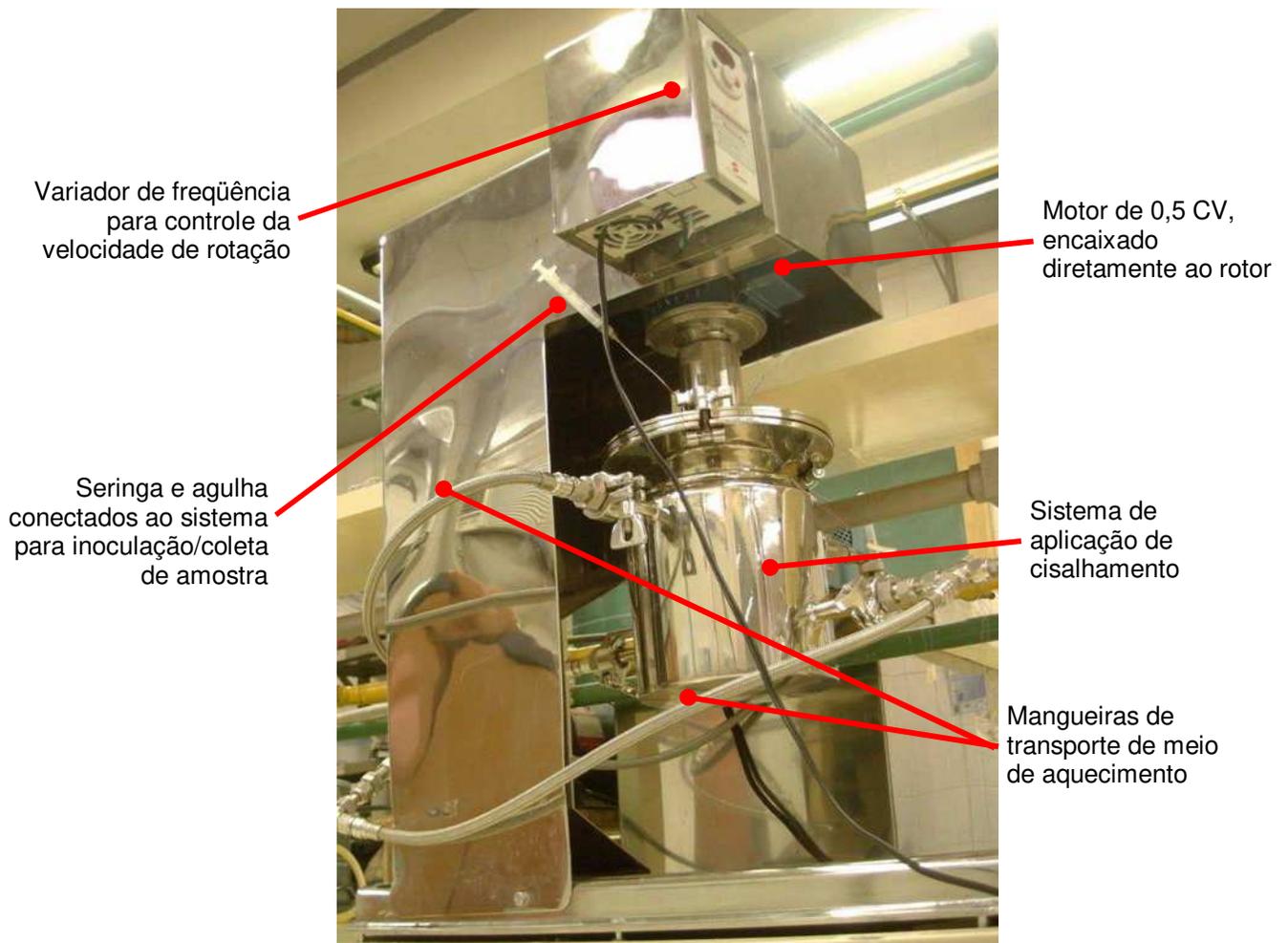


Figura 3: Foto do Reator de Cisalhamento pronto para funcionamento

A Figura 4 apresenta corte transversal da vista lateral do copo e rotor do reator de cisalhamento construído.

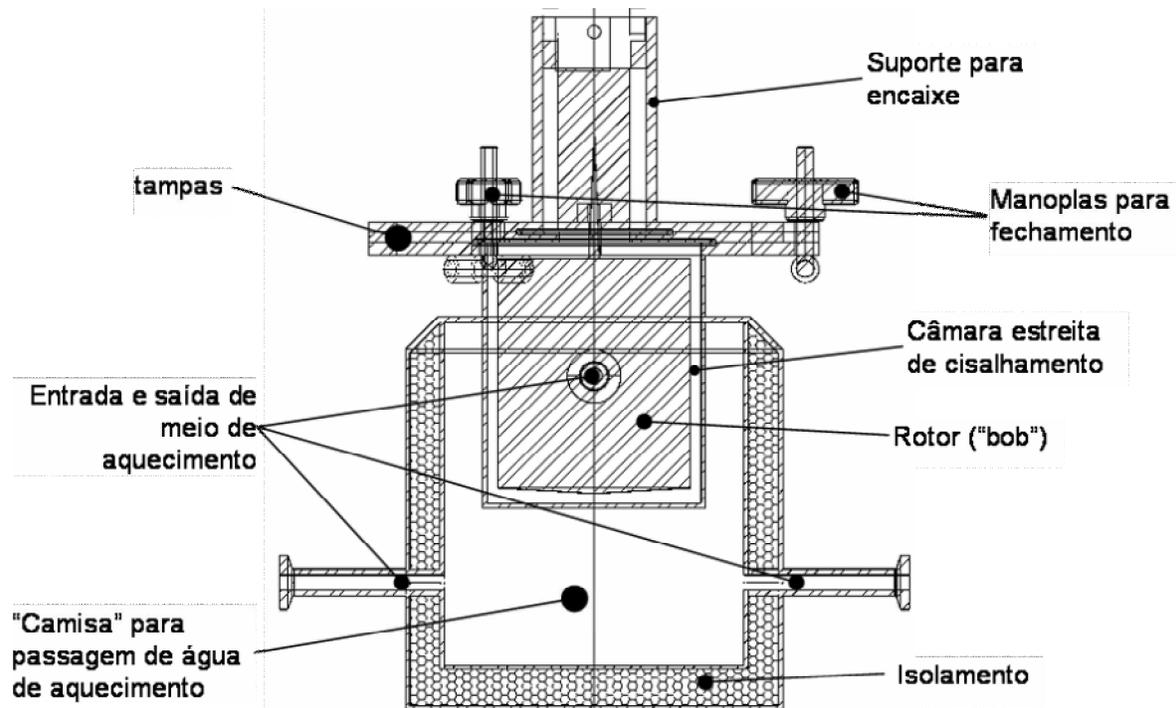


Figura 4: Corte transversal do sistema de aplicação de cisalhamento (copo, rotor e camisa), apresentando os principais componentes

As conexões, indicadas na Figura 4, para entrada e saída de água de aquecimento, eram de conexão rápida, tipo "tri-clamp". O grande volume interno da "camisa" tinha por objetivo fornecer uma inércia térmica suficientemente grande para diminuir as variações na temperatura. As duas tampas do sistema eram fixadas ao mesmo usando três manoplas para fechamento, em pontos tais que formavam ângulo de 120° entre si. A tampa superior possuía em seu corpo um encaixe de modo a conectar o sistema descrito no suporte e motor. Todo esse sistema, apresentado na Figura 4, foi construído em aço inox 316, à exceção do material isolante. Conforme a figura, este isolamento encontrava-se entre a superfície lateral externa e a camisa.

Conforme especificação de projeto, os 4 orifícios de entrada/saída de meio de aquecimento encontravam-se diametralmente opostos, e em alturas diferentes do cilindro. A entrada de meio de aquecimento se dava pelos orifícios inferiores, e a saída pelos orifícios superiores, a fim de aumentar a homogeneidade da temperatura do meio de aquecimento dentro da camisa.

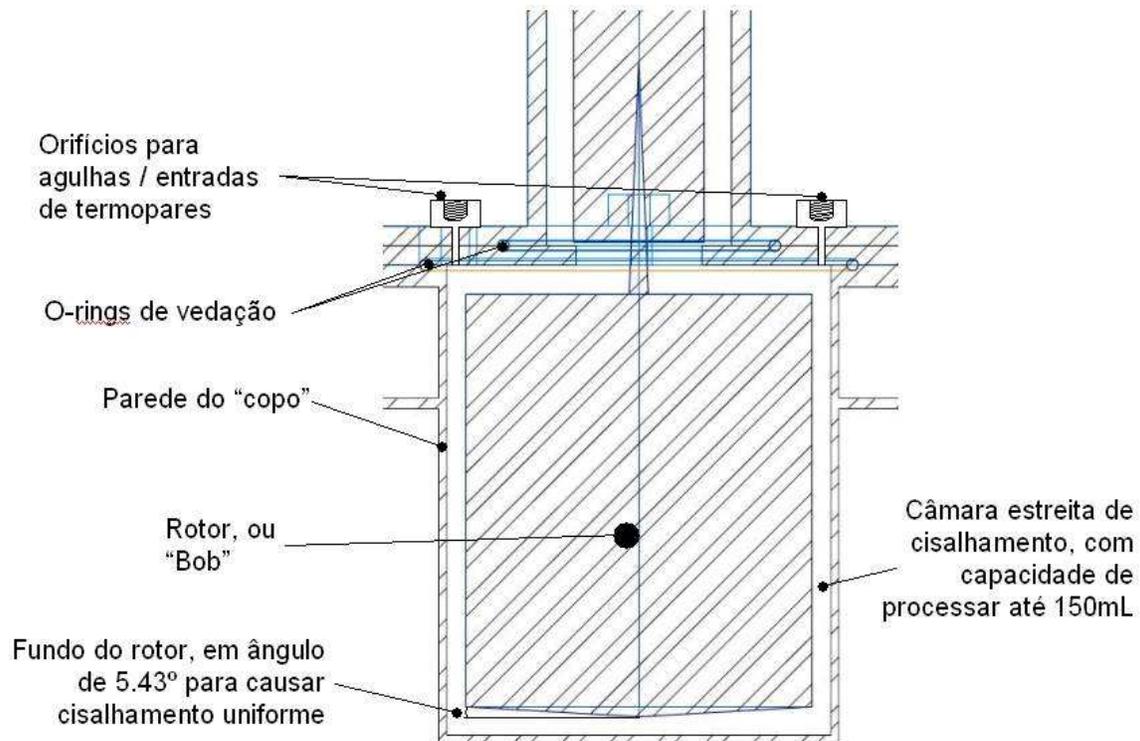


Figura 5: Corte transversal do copo e rotor

Na Figura 5, está apresentado um desenho em detalhe do copo e do rotor. Neste desenho pode-se ver:

- Os orifícios equipados com adaptador Ecklund C-5.2, guarnecido com "O-ring da mesma marca," através dos quais foram passadas as agulhas de inoculação/coleta de amostras. Através desses mesmos orifícios passavam os termopares flexíveis tipo T (Marca

Omega, especificação TT-T-30-SLE), para coleta de dados de temperatura;

- Os “O-rings” de vedação, que impediam que o líquido interno saísse de dentro da câmara através do espaço entre as tampas, quando o rotor estivesse em funcionamento;
- A parede do copo, que entrava em contato diretamente com o meio de aquecimento, de modo a aquecer o fluido até a temperatura desejada. A parede do copo recebeu tratamento de polimento para evitar rugosidade, a fim de reduzir efeitos de atrito devido a picos e vales da superfície, e tinha raio interno de 50 mm. Durante o funcionamento do equipamento, o copo manteve-se imóvel;
- O rotor (ou “Bob”), responsável pela aplicação do cisalhamento propriamente dito. Tratava-se de um cilindro oco e polido, com raio externo de 45 mm. Na extremidade superior, possuía uma conexão para fixar-se ao eixo do motor, e na extremidade inferior, foi construído em forma de cone circular, com $5,43^\circ$ com a horizontal. Tal ângulo tinha a finalidade de garantir que fosse aplicado aproximadamente o mesmo cisalhamento na parte inferior e na lateral do rotor. O cálculo de tal ângulo foi feito de acordo com Steffe(1996), e encontra-se descrito no item **4.4.2**, de Métodos;
- A câmara de cisalhamento apresentou capacidade de processar apropriadamente até 150mL de fluido. Embora possuísse capacidade interna total maior (195mL), testes preliminares

indicaram que volumes maiores que 150mL provocaram perda de líquido pelo espaço entre o eixo do rotor e a tampa superior;

Devido às limitações de construção, não foi possível operar este equipamento em temperaturas superiores a 100°C. Assim, somente foram realizados testes em temperaturas na região de pasteurização.

Para se obter aquecimento e resfriamento do equipamento, este seria, originalmente, conectado aos trocadores de calor de aquecimento da planta piloto UHT Microthermics, modelo UHT-HTST Lab 25-DH, instalada no Departamento de Ciência de Alimentos-FEA/UNICAMP, os quais atuariam como pulmão para fornecimento de água quente. Porém tal montagem mostrou-se inviável, devido às flutuações de temperatura aleatórias verificadas em tal unidade, causadas por fatores como instabilidade da caldeira, oscilações na pressão de vapor devido ao acionamento de purgadores, etc. Como cada ensaio no equipamento levaria entre 30 e 90 minutos, tempo durante o qual a temperatura deveria manter-se constante, o uso da planta piloto UHT mostrou-se inviável.

Por fim, foi usado um banho termostático (marca Fanem, precisão $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), capaz de suportar um grande volume de água (60 litros), como fornecedor de meio de aquecimento para o Reator de Cisalhamento. Para bombear o meio de aquecimento, foi usada uma bomba centrífuga (marca Dancor), modificada para suportar a alta temperatura usada nos testes. O meio de aquecimento recirculava entre o Reator de Cisalhamento e a bomba, à vazão de 40 Litros/minuto. Dessa maneira, foi obtida, dentro da câmara de cisalhamento, precisão da ordem de $0,5^{\circ}\text{C}$.

O variador de frequência usado no equipamento permitiu o controle sobre a frequência da corrente que chegava ao motor, com precisão de 0,05Hz abaixo de 100Hz e de 0,5Hz acima de 100Hz, permitindo o controle, por sua vez, sobre a rotação obtida.

4.1.2. Unidade piloto UHT-HTST Microthermics – modelo Lab 25-DH

A fim de atingir o objetivo “iv” foi usada a planta piloto instalada no Departamento de Ciência de Alimentos (FEA/UNICAMP). Esta planta piloto possuía diversas tubulações internas, intercambiáveis por meio de um painel de conexões (“jumpers”) frontal, que alteram o tamanho das seções de retenção da unidade. Usando conectores para fazer diferentes ligações entre estas tubulações, e variando a vazão de produto, foi possível obter diferentes tempos de retenção. Desse modo, conhecendo a taxa de fluxo, a viscosidade do fluido e as dimensões internas de cada tubulação, foi possível determinar a velocidade média, o regime do fluxo e a velocidade máxima e, portanto, o tempo de residência mínimo, em cada etapa da unidade (aquecimento, retenção e resfriamento). As dimensões das tubulações desta unidade estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Medidas das tubulações da unidade piloto UHT-HTST Microthermics que foram usadas – modelo Lab 25-DH – de acordo com especificação do fabricante (Microthermics, 1998)

	Trecho (tubulação) da unidade piloto	Distância (m)	Diâmetro interno (m)
	Entrada de produto até bomba	3,245	0,0072
	Bomba até painel (pump outlet)	1,965	0,0072
	Painel (pump outlet) até painel (preheater inlet)	0,313	0,0072
	Preheater (PH)	11,582	0,0070
Aquecedor	Preheater até painel (preheater outlet)	1,705	0,0072
	Painel (preheater outlet) até termopar PH e porta asséptica	0,230	0,0072
	Termopar PH até painel (to hold tube)	0,080	0,0072
	Painel (to hold tube) até Painel (product supply)	1,160	0,0072
	painel (product supply) até painel (EH1 inlet)	0,420	0,0072
	Primeira seção de retenção - EH1 hold	5,050	0,0104
	painel (EH1 outlet) até painel (EH2 inlet)	0,456	0,0072
	Segunda seção de retenção - EH2 hold	5,050	0,0104
	painel (EH2 outlet) até painel (EH3 inlet) e porta asséptica	0,456	0,0072
	Tereceira seção de retenção - EH3 hold	5,050	0,0104
	painel (EH3 outlet) até painel (EH4 inlet)	0,456	0,0072
	Quarta seção de retenção - EH4 hold	5,050	0,0104
	painel (EH4 outlet) até painel (product return)	0,421	0,0072
	painel (product return) até painel (from hold tube)	0,508	0,0072
	painel (from hold tube) até termopar (Hold) e porta asséptica	0,083	0,0072

As denominações apresentadas na Tabela 2 são as originais da unidade, onde “Preheater” refere-se ao trocador de calor de pré-aquecimento, que foi denominado “Aquecedor” no presente trabalho, e as siglas EH1, EH2, EH3 e EH4 referem-se aos tubos de retenção. O trecho formado pelas seções EH1 e EH2 foi denominado “Retenção 1”, e o trecho formado pelas seções EH3 e EH4 foi denominado “Retenção 2”, no presente trabalho.

4.1.3. Meio fluido usado como suspensão de esporos para os experimentos

Como o objetivo deste estudo foi verificar o efeito do cisalhamento sobre a inativação térmica de um microrganismo, foi necessário usar um fluido de comportamento perfeitamente Newtoniano, a fim de eliminar possíveis efeitos reológicos, devido à presença de solutos, como poderia ocorrer se fosse usada água peptonada, ou suco de laranja, por exemplo. Por essa razão, o fluido escolhido foi água destilada estéril.

4.1.4. Microrganismo utilizado

Inicialmente, foi escolhido, como microrganismo alvo, um isolado de uma amostra de suco de laranja concentrado brasileiro, que havia apresentado contaminação no Japão. Tal microrganismo foi identificado como *Clostridium pasteurianum*. Porém, por sugestão da banca de qualificação, os testes com este microrganismo foram deixados de lado, por se tratar de microrganismo fastidioso e anaeróbico, suscetível de sofrer danos pela exposição ao oxigênio, o que iria dificultar, sobremaneira, a modelagem da inativação dentro do reator de cisalhamento.

Por essa razão, o microrganismo escolhido foi o *Bacillus atrophaeus* (antigo *B. subtilis* ATCC9372), cuja cinética de morte térmica é bem conhecida (Peeler *et al.*, 1977; Cho *et al.*, 1999; Licciardello e Nickerson, 1963).

4.2. Métodos

4.2.1. Produção da suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus* (antigo *Bacillus subtilis* ATCC 9372)

A cepa utilizada foi obtida da coleção de culturas do Laboratório de Termobacteriologia do DCA/FEA-UNICAMP.

A partir do tubo contendo a cultura, foi realizado plaqueamento por esgotamento em meio Agar nutriente (DIFCO), e incubado a 30°C/24 horas. Uma colônia isolada foi coletada com alça de platina, diluída em 5mL de água destilada e a suspensão obtida foi plaqueada em 5 placas contendo Agar nutriente (DIFCO), que foram incubadas a 30°C/24 horas. Após a incubação, a superfície de cada uma das placas foi lavada com 5mL de água destilada estéril, e a suspensão resultante foi usada para inocular 50 placas de agar nutriente (DIFCO). As 50 placas foram incubadas a 33°C, até que o exame microscópico indicasse >70% das células esporuladas. Quando essa condição foi atingida, cada uma das placas foi lavada com 5 mL de água destilada. A suspensão obtida foi centrifugada a 5.000G, em centrífuga refrigerada a 4°C (Modelo RC5C, Marca Sorvall Instruments – DU PONT). O sobrenadante foi descartado, o decantado foi resuspendido em aproximadamente 30mL de água destilada estéril, e a seguir sofreu nova centrifugação. A operação de centrifugação, lavagem e resuspensão foi repetida 4 vezes, e o exame microscópico da suspensão de esporos obtida indicou que a maior parte dos esporos encontravam-se livres, dispensando o tratamento com lisozima e ultrassom. A contagem de esporos, após choque térmico a 80°C/20 minutos, indicou concentração de 10⁹ esporos/mL. A suspensão obtida foi mantida a 4°C até o seu uso (Stumbo, 1965).

4.3. Determinação da resistência térmica em tubo TDT

A resistência térmica em tubo TDT foi determinada segundo Pflug (1990).

Foram realizados tratamentos térmicos de intensidade progressiva, em banho de óleo termostático (Polystat® com $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de precisão) ajustado a 92, 94 e 96°C. Para cada uma destas temperaturas, foram retirados tubos em 7 tempos diferentes, em duplicata.

Os tubos TDT que foram utilizados eram de vidro Pyrex, de diâmetro externo de 8,0mm, diâmetro interno de 6,0mm e comprimento de 105mm.

O procedimento pode ser resumido da seguinte forma:

1. Preenchimento dos tubos TDT com 0,2mL de suspensão padronizada em 10^9UFC/mL e 1,8mL de água destilada estéril pH 6,7.
2. Selagem dos tubos com maçarico.
3. Mergulho do tubo em banho termostático estabilizado à temperatura de tratamento.
4. Decorrido o tempo de tratamento térmico, resfriamento imediato dos tubos em banho de gelo.
5. Preparo das diluições decimais sucessivas e plaqueamento do conteúdo dos tubos em meio Agar Nutriente (1,5% Agar Merck, 0,8% Caldo Nutriente DIFCO), em profundidade.
6. Incubação a 30°C por 48 horas.

O atraso térmico foi determinado usando um tubo TDT preenchido com 0,2mL de suspensão padronizada em 10^9 UFC/mL e 1,8mL de água estéril, contendo um termopar posicionado a 1/3 de altura e no centro da seção transversal do tubo. O tempo requerido para o termopar atingir a temperatura de ajuste do banho foi medido com cronômetro.

Os valores de D e z foram obtidos por regressão linear simples, a partir do gráfico semi-log da população de sobreviventes contra o tempo de tratamento térmico, utilizando o *software* Microsoft Excel.

4.4. Determinação da resistência térmica sob cisalhamento em líquidos

Para determinação da resistência térmica usando o Reator de Cisalhamento, as seguintes etapas foram realizadas:

1. Esterilização das peças do sistema de aplicação de cisalhamento, embaladas separadamente, em autoclave a 121°C/40 minutos. Estas peças eram:
 - a. Copo;
 - b. Tampas;
 - c. Rotor;
 - d. “O-rings” de vedação (das tampas e dos orifícios);
 - e. Agulhas de inoculação / coleta de amostra;
 - f. Peça de vedação Ecklund C-5.2;
 - g. Termopares flexíveis;
2. Montagem do sistema em capela de fluxo laminar. Foram colocados 146,5mL de água dentro do copo, assepticamente;

3. Flambagem do ponto de conexão do copo e do rotor com o resto do equipamento;
4. Conexão do sistema de aplicação de cisalhamento ao motor;
5. Conexão das mangueiras de alimentação de meio de aquecimento ao sistema de aplicação de cisalhamento;
6. Início do aquecimento do sistema de aplicação de cisalhamento;
7. Ativação do sistema de cisalhamento, a ~ 2000 rpm, e espera de cerca 40 a 60 minutos para que o sistema atingisse a temperatura de teste;
8. Inoculação de 1,5mL de suspensão do microrganismo alvo através da agulha de inoculação, usando seringa descartável estéril e fogareiro para flambagem dos utensílios e manutenção da esterilidade ambiente;
9. Imediatamente após a inoculação, usando outra seringa descartável estéril, foram injetados 2mL de água destilada estéril através da agulha de inoculação, a fim de arrastar os esporos que tenham sido retidos, completando o volume de 150 mL;
10. Com outra seringa descartável estéril, imediatamente após a injeção de água estéril, foi retirada a primeira amostra, constituída de 1,5mL de suspensão de esporos, que foi imediatamente resfriada em banho de gelo e levada para diluição e plaqueamento. Esta amostra compôs o tempo 0 (zero), e a partir de sua retirada foi marcado o tempo de coleta de cada amostra. Imediatamente após a coleta

- desta amostra, foi injetado 1,5mL de água destilada, a fim de arrastar esporos retidos na agulha;
11. Aos tempos programados, foram retirados 1,5mL de amostra, que foram resfriados, diluídos e plaqueados. Em seguida a todas as retiradas da amostra, foram injetados 1,5mL de água;
 12. A partir da 4^a amostra, as amostras foram retiradas pela segunda agulha coletora, pois a primeira agulha já se apresentava saturada de esporos;
 13. Imediatamente após o resfriamento de cada amostra, estas foram diluídas apropriadamente e plaqueadas em profundidade, em Agar Nutriente (1,5% Ágar Merck + 0,8% Caldo Nutriente DIFCO), e incubadas a 30°C/48 horas.
 14. Após a incubação, os resultados estatisticamente significativos (entre 25 e 250) foram usados para calcular a média e, com as médias das contagens e os tempos de tratamento térmico, foi calculado o valor D_{Reator} , à temperatura de teste, usando o *software* Microsoft Excel.
 15. Após cada uso, o equipamento foi esterilizado em autoclave (121°C/45min) para eliminar a população remanescente de *Bacillus subtilis*. A seguir, o copo e o rotor foram higienizados com uma esponja macia (a fim de evitar riscos na superfície de contato com o fluido), e enxaguados com água destilada para evitar incrustações.

4.4.1. Determinação da rotação do reator

O princípio de funcionamento do reator de cisalhamento é baseado no fato de que a taxa de cisalhamento dentro de um tubo pode ser simulado em um sistema copo-rotor. A seguir está apresentada a dedução de qual deve ser a velocidade de rotação desse rotor para simular o cisalhamento causado pelo fluxo em um tubo.

Conforme Steffe (1996), por definição, a taxa de cisalhamento para fluidos newtonianos é dada por:

Equação 10
$$\dot{\gamma} = \frac{\sigma}{\mu}$$

Onde $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, σ é a tensão de cisalhamento e μ é a viscosidade do fluido.

Para um viscosímetro do tipo cilindros concêntricos, girando à velocidade angular (Ω) e em estado estacionário, M é o torque requerido para manter a velocidade angular do cilindro interno constante. O torque que se opõe a esse movimento é dado pela tensão de cisalhamento (σ) causada pelo fluido no cilindro interno. Fazendo então o balanço de forças, tem-se que:

Equação 11
$$M = 2\pi \cdot r \cdot h \cdot \sigma \cdot r$$

Isolando a tensão de cisalhamento, tem-se:

Equação 12
$$\sigma = \frac{M}{2\pi \cdot r^2 \cdot h}$$

Isolando o raio, tem-se:

Equação 13
$$r = \left(\frac{M}{2\pi \cdot h} \right)^{1/2} \cdot (\sigma)^{-1/2}$$

Onde h é a altura do fluido em contato com os cilindros e $R_b < r < R_c$, sendo R_b o raio do cilindro interno e R_c o raio do cilindro externo.

Derivando a Equação 13, resolvida para r , em relação à tensão de cisalhamento, obtém-se:

$$\text{Equação 14} \quad \frac{dr}{d\sigma} = \left(\frac{M}{2\pi \cdot h} \right)^{1/2} \cdot \frac{-1}{2} \cdot (\sigma)^{-3/2}$$

Substituindo o torque (M) pela expressão que o define (Equação 11), fica:

$$\text{Equação 15} \quad \frac{dr}{d\sigma} = \left(\frac{2\pi \cdot r \cdot h \cdot \sigma \cdot r}{2\pi \cdot h} \right)^{1/2} \cdot \frac{-1}{2} \cdot (\sigma)^{-3/2}$$

Resolvendo a Equação 15, e agrupando os termos, encontra-se:

$$\text{Equação 16} \quad \frac{dr}{r} = -\frac{d\sigma}{2 \cdot \sigma}$$

A velocidade linear (u) de um elemento infinitesimal do fluido dentro do reator, em cada posição, pode ser definida como:

$$\text{Equação 17} \quad u = r \cdot \omega$$

Onde ω é a velocidade angular do elemento infinitesimal.

Derivando a Equação 17 em relação a r , tem-se:

$$\text{Equação 18} \quad \frac{du}{dr} = \frac{r \cdot d\omega}{dr} + \omega$$

Como ω está relacionado com a rotação do rotor, ele não se relaciona ao cisalhamento interno. Então, a Equação 18 fica:

$$\text{Equação 19} \quad \frac{du}{dr} = \frac{r \cdot d\omega}{dr}$$

Como a taxa de cisalhamento pode ser expressa em termos da relação entre a velocidade e o raio, a partir da Equação 19 pode-se relacionar a taxa de cisalhamento e a velocidade angular:

$$\text{Equação 20} \quad \gamma = -\frac{du}{dr} = -\frac{r \cdot d\omega}{dr} = f(\sigma)$$

Resolvendo para a derivada da velocidade angular:

$$\text{Equação 21} \quad d\omega = -\frac{dr}{r} f(\sigma)$$

Usando a Equação 16 na Equação 21:

$$\text{Equação 22} \quad d\omega = \frac{1}{2} f(\sigma) \frac{d\sigma}{\sigma}$$

Integrando a Equação 22 ao longo do espaço entre os cilindros:

$$\text{Equação 23} \quad \int_{\omega=0}^{\omega=\Omega} d\omega = \frac{1}{2} \int_{\sigma_b}^{\sigma_c} \frac{f(\sigma)}{\sigma} d\sigma$$

Resolvendo a integral:

$$\text{Equação 24} \quad \Omega = \frac{1}{2} \int_{\sigma_b}^{\sigma_c} \frac{f(\sigma)}{\sigma} d\sigma$$

Seja $f(\sigma) = \gamma$ (Equação 20), substituindo na Equação 24, conforme a Equação 10:

$$\text{Equação 25} \quad \Omega = \frac{1}{2} \int_{\sigma_b}^{\sigma_c} \frac{\sigma}{\mu \sigma} d\sigma$$

Onde σ_b é a tensão de cisalhamento na superfície do rotor e σ_c é a tensão de cisalhamento na superfície do copo. Resolvendo a integral:

$$\text{Equação 26} \quad \Omega = \frac{1}{2\mu} (\sigma_b - \sigma_c)$$

Se substituirmos σ_b e σ_c pela expressão apresentada na Equação 12:

$$\text{Equação 27} \quad \Omega = \frac{1}{2\mu} \left(\frac{M}{2\pi \cdot h \cdot R_b^2} - \frac{M}{2\pi \cdot h \cdot R_c^2} \right)$$

Simplificando a Equação 27:

$$\text{Equação 28} \quad \Omega = \frac{M}{4\pi \cdot h \cdot \mu} \left(\frac{1}{R_b^2} - \frac{1}{R_c^2} \right)$$

Isolando M na Equação 28:

$$\text{Equação 29} \quad M = \frac{4\pi \cdot \Omega \cdot h \cdot \mu \cdot R_c^2}{\alpha^2 - 1} \quad \text{Onde } \alpha = R_c/R_b.$$

Finalmente, substituindo na Equação 10, a expressão para σ apresentada na Equação 12, tem-se:

$$\text{Equação 30} \quad \gamma_{\theta} = f(r) = \frac{M}{2\pi \cdot R_b^2 \cdot h} \cdot \frac{1}{\mu}$$

Substituindo M pela expressão apresentada na Equação 29, tem-se:

$$\text{Equação 31} \quad \gamma_{\theta} = \frac{1}{2\pi \cdot R_b^2 \cdot h \cdot \mu} \cdot \frac{4\pi \cdot \Omega \cdot h \cdot \mu \cdot R_c^2}{\alpha^2 - 1}$$

Simplificando, encontra-se:

$$\text{Equação 32} \quad \gamma_{\theta} = \frac{2 \cdot \Omega}{(\alpha^2 - 1)} \cdot \frac{R_c^2}{R_b^2}$$

Por outro lado, para um fluido percorrendo uma tubulação horizontal de comprimento L e raio interno R, a diferença de pressão (δP) entre suas extremidades causará o fluxo pelo seu interior. Com o balanço de forças na parede da tubulação, obtem-se:

$$\text{Equação 33} \quad (\delta P)\pi \cdot r^2 = \sigma \cdot 2\pi \cdot r \cdot L$$

Isolando a tensão de cisalhamento (σ):

$$\text{Equação 34} \quad \sigma = \frac{(\delta P)\pi r^2}{2\pi \cdot r \cdot L}$$

Simplificando:

$$\text{Equação 35} \quad \sigma = \frac{(\delta P)r}{2 \cdot L}$$

Substituindo na Equação 10:

$$\text{Equação 36} \quad \dot{\gamma} = \frac{(\delta P)r}{2 \cdot L} \cdot \frac{1}{\mu}$$

Baseado na Equação 32 e na Equação 36, foi possível caracterizar o sistema de trocadores tubulares e quantificar a velocidade de rotação do rotor de reator para obter a mesma taxa de cisalhamento em ambos.

Como o que se deseja é obter a rotação tal que as tensões de cisalhamento dentro do tubo de retenção e dentro do Reator de Cisalhamento, igualando as taxas de cisalhamento em ambas (mesmo fluido – mesma viscosidade μ):

$$\text{Equação 37} \quad \dot{\gamma}_{\text{tubo}} = \dot{\gamma}_{\text{aparelho}}$$

$$\text{Equação 38} \quad \frac{(\delta P)}{2 \cdot L} \cdot r_T \cdot \frac{1}{\mu} = \frac{2 \cdot \Omega}{(\alpha^2 - 1)} \cdot \frac{R_c^2}{R_b^2}$$

$$\text{Equação 39} \quad \frac{(\delta P) \cdot r_T \cdot (\alpha^2 - 1) \cdot R_b^2}{4 \cdot L \cdot R_c^2} = \Omega \cdot \mu$$

Assim, a partir da Equação 39, conhecendo-se os valores de μ (viscosidade do fluido), R_b (raio do rotor do reator), R_c (raio do copo do reator), L (comprimento da tubulação de retenção), r_T (raio interno da tubulação de retenção) e δP (a perda de pressão ao longo da tubulação de retenção), pôde ser encontrado o valor de Ω

(velocidade angular do rotor) que causa a mesma taxa de cisalhamento que aquela verificada na tubulação de retenção de raio r_T , comprimento L e queda de pressão δP entre $l=0$ e $l=L$.

Para determinar as diferenças de pressão (δP) dentro da unidade UHT piloto, foi realizado um experimento com água bombeada a diferentes vazões (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 litros por minuto), e foram verificadas as perdas de pressão ao longo de cada seção da tubulação. Estes dados estão apresentados na Tabela 5.

A partir desses valores e da Equação 39, foi determinada a máxima rotação necessária para obter a taxa de cisalhamento equivalente à máxima aplicada nos tubos da unidade UHT, de modo a especificá-la para a construção do Reator de cisalhamento; a rotação máxima necessária resultou ser inferior a 7200RPM, que foi a máxima capaz de ser alcançada pelo motor do Reator (por especificação própria).

4.4.2. Determinação do ângulo do fundo do rotor (Bob)

De acordo com Steffe (1996), a superfície inferior do rotor entra em contato com o líquido, causando o chamado “*end-effect*”, afetando o cisalhamento total aplicado ao fluido. Para reduzir tal efeito, este autor sugere que a superfície inferior do rotor seja construída em ângulo, num esforço para tornar o cisalhamento nessa região equivalente ao cisalhamento no espaço lateral entre o rotor e o copo. A fim de obter este ângulo, este autor propõe igualar a taxa de cisalhamento na lateral do rotor com a taxa de cisalhamento na superfície inferior deste, como se esta região se tratasse de uma construção tipo “cone-prato”.

Conforme a definição apresentada na Equação 30, a taxa de cisalhamento pode ser dada por:

$$\dot{\gamma} = \frac{2 \cdot \Omega}{(\alpha^2 - 1)} \cdot \frac{R_c^2}{R_b^2}$$

aplicando a definição de α , ($\alpha = R_c/R_b$), tem-se:

Equação 40
$$\dot{\gamma} = 2 \cdot \Omega \cdot \left(\frac{\alpha^2}{\alpha^2 - 1} \right)$$

no cone, num arranjo tipo cone-prato, pode ser dada por:

Equação 41
$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega}{\tan(\theta)}$$

Onde θ é o ângulo do cone (com a horizontal).

Igualando a Equação 40 com a Equação 41, obtém-se:

Equação 42
$$2 \cdot \Omega \cdot \left(\frac{\alpha^2}{\alpha^2 - 1} \right) = \frac{\Omega}{\tan(\theta)}$$
$$\tan(\theta) = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\alpha^2 - 1}{\alpha^2} \right)$$

Como o valor de $R_c = 45\text{mm}$ e o valor de $R_b = 50\text{mm}$, resulta que $\alpha = 1,11$. Resolvendo a Equação 42, obtém-se que a superfície inferior do rotor deve ser um cone com um ângulo $\theta = 0.0947$ rad, ou $5,43^\circ$, com a horizontal.

4.4.3. Planejamento experimental: testes no Reator de Cisalhamento

A metodologia de planejamento experimental tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma ferramenta matemática suficientemente robusta para modelar, com razoável grau de confiança, a variação da cinética dentro da região estudada.

A fim de modelar o efeito da tensão de cisalhamento sobre os esporos de *Bacillus atrophaeus*, foi desenhado um Delineamento Composto Central Rotacional para 2 variáveis independentes (Rodrigues e lemma, 2005): tensão de cisalhamento e temperatura. Como a primeira variável é controlada no reator, pela rotação, o planejamento foi construído usando-a como variável. A variável resposta obtida serão os valores do Índice de redução decimal (valor D) obtidos. Os níveis das variáveis independentes usados estão apresentados na Tabela 3, e as combinações testadas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 3: Planejamento Experimental: Variáveis e Níveis

	Variáveis	Máximo	Mínimo	Ponto central
Valores reais	Temperatura($^\circ\text{C}$)	96	90	93
	Rotação(RPM)	7.200	0	3.600
Valores codificados	Temperatura	1,414	-1,414	0
	Rotação	1,414	-1,414	0

Tabela 4: Planejamento Experimental

RPM	Temperatura (°C)	RPM	Temperatura (°C)
-1	-1	1.025	90,8
1	-1	5.975	90,8
-1	1	1.025	95,12
1	1	5.975	95,12
-1,414	0	0	93
1,414	0	7.200	93
0	-1,414	3.600	90
0	1,414	3.600	96
0	0	3.600	93
0	0	3.600	93
0	0	3.600	93
0	0	3.600	93

Para estabelecer a faixa de valores das variáveis, foram considerados os valores máximos e mínimos de temperatura de pasteurização (temperaturas a serem usadas para determinação do valor D) e de rotação do rotor.

A partir da análise dos resultados do planejamento experimental, mediante *software* Statistica 7 (Tulsa-EUA), foi obtido um modelo para o cálculo de D_{Reator} , que foi denominado modelo “Reator de cisalhamento”.

4.5. Determinação da queda de pressão dentro da unidade piloto UHT-HTST Microthermics

A fim de resolver a Equação 39, foi necessário obter as medidas e outras características dos dois dispositivos usados (reator de cisalhamento e unidade HTST). Os valores foram obtidos por literatura (μ - viscosidade da água), medição direta (Reator de cisalhamento – R_b - raio do rotor, R_c - raio do copo) e especificação do fabricante (Unidade Piloto HTST – L - comprimento da tubulação, r_T - raio da tubulação). Porém, a perda de pressão ao longo da tubulação (δP) teve que ser medida para cada fluido, em cada vazão de trabalho.

Por este motivo, a queda de pressão em cada uma das etapas foi medida da seguinte forma:

1. Calibração de dois manômetros digitais idênticos, marca GP:50, modelo 311.
2. Instalação de um manômetro digital na entrada do aquecedor (PH) e do outro na saída desta etapa;
3. Início da entrada da água através da unidade;
4. Ajuste da vazão a 0,5 litro por minuto, por medida volumétrica;
5. Manutenção da vazão ajustada por 5 minutos, e coleta dos dados de diferença de pressão (δP);
6. Redução da vazão até 0 litro por minuto;
7. Repetição dos passos 3 a 6 para vazões de 1, 1,5 e 2 litros por minuto;
8. Repetição dos passos 3 a 7, instalando os manômetros na entrada e na saída das etapas Retenção 1 e Retenção 2.

Os resultados desses experimentos encontram-se na Tabela 5:

Tabela 5: Queda de pressão (δP) verificada em cada etapa da Unidade HTST – Microthermics. Valores em Pa

Etapa	Vazão				
	0 L/min	0,5 L/min	1 L/min	1,5 L/min	2 L/min
Aquecedor	0	2,85E+04	8,37E+04	1,21E+05	1,06E+05
Retenção 01	0	0*	1,31E+04	3,18E+04	5,49E+04
Retenção 02	0	3,65E+03	4,02E+03	4,83E+03	7,23E+03

*Os resultados indicaram que a perda de pressão na retenção 1 a 0,5 L/min, é desprezível

Usando os resultados apresentados na Tabela 5 e a Equação 39, foi possível encontrar a rotação necessária para aplicar a tensão de cisalhamento equivalente. Tais resultados são apresentados na Tabela 6, a seguir:

Tabela 6: Rotação necessária no reator de cisalhamento para causar a mesma tensão de cisalhamento estimada na unidade Microthermics. Valores em RPM

Etapa	Vazão				
	0 L/min	0,5 L/min	1 L/min	1,5 L/min	2 L/min
Aquecedor	0	1302	3820	5514	4826
Retenção 01	0	0*	1396	3385	5848
Retenção 02	0	426	470	564	845

*Os resultados indicaram que a perda de pressão na retenção 1 a 0,5 L/min, é desprezível

4.6. Determinação da resistência térmica em planta de Processo Térmico de Fluxo Contínuo

Para a determinação da resistência em unidade de Processo Térmico de Fluxo Contínuo, foi usado o método apresentado por Fairchild *et al.*(1994), modificado de forma que pudesse ser aplicado na planta piloto UHT Microthermics, modelo UHT-HTST Lab 25-DH, instalada no Departamento de Ciência de Alimentos-FEA/UNICAMP. Esta planta piloto possui diversas tubulações internas, acessíveis por meio de um painel de conexões (“jumpers”) frontal. Usando conectores para fazer a ligação entre estas tubulações, e variando a vazão de produto, é possível obter diferentes tempos de retenção.

O painel de conexões da unidade piloto UHT/HTST Microthermics foi configurado da seguinte forma:

Entrada de produto	Bomba	Aquecedor	Retenção 1	Retenção 2
Resfriador	Câmara de Enchimento	Asséptico	Descarte.	

Esta unidade piloto foi capaz de fornecer amostras ao longo do processo térmico, utilizando portas assépticas semelhantes às usadas por Fairchild *et al.*(1994), equipadas com trocador de calor para resfriamento rápido das amostras – vide Figura 6. Estas portas foram instaladas na saída do Aquecedor, na saída da Retenção 1 e na saída da Retenção 2, para a coleta das amostras. As dimensões das tubulações estão apresentados na Tabela 2.

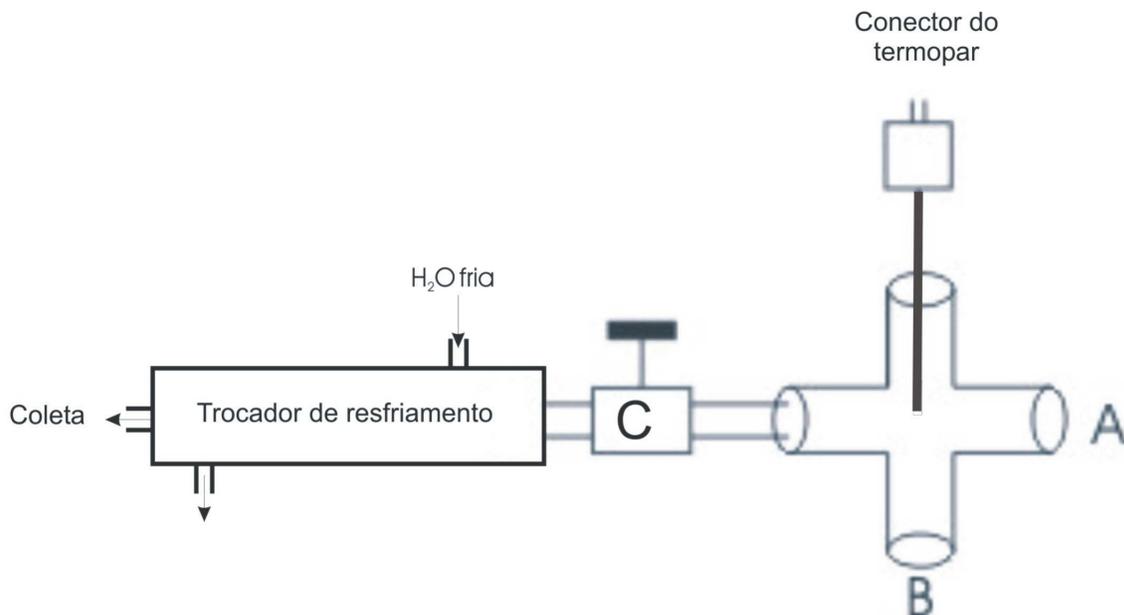


Figura 6: Desenho esquemático de uma porta asséptica de amostragem. Os pontos “A” e “B” indicam as conexões com a Unidade HTST Microthermics, e “C” é a válvula para amostragem (Tamega Jr., 2005)

Mediante contagem de sobreviventes nas amostras coletadas através destas portas, foi verificado o efeito das diversas etapas de processamento sobre o microrganismo, e como sua população foi reduzida ao longo da unidade de Processo Térmico de Fluxo Contínuo. O meio de contagem dos sobreviventes foi Agar Nutriente (1,5% agar Merck e 0,8% caldo nutriente DIFCO), e a incubação foi feita a 30°C por 48 horas.

A partir da suspensão de esporos de *B. atrophaeus* (10^9 esporos/mL) usada para os ensaios com tubo TDT e no Reator de Cisalhamento, foram retirados 4mL e diluídos em 36mL de água destilada estéril pH 6,87 refrigerada a 4°C. Esta nova suspensão, cuja concentração de esporos era de 10^8 /mL, foi mantida em estufa a 4°C e levada mais tarde à unidade UHT, para diluição em 39,96L de água

destilada estéril com pH corrigido para 6,87, obtendo-se nova suspensão cuja concentração foi 10^5 esporos/mL.

Após homogeneização da nova suspensão, foi coletada amostra (10mL), que foi plaqueada em triplicata nas diluições 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} , em profundidade em agar nutriente.

Antes de cada ensaio, as portas assépticas e os trocadores de calor foram esterilizados em Autoclave ($121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$), a fim de eliminar contaminantes remanescentes.

Imediatamente antes de cada ensaio, a unidade UHT foi esterilizada por 20 minutos a 121°C em cada lado do sistema de enchimento (temperatura medida no ponto mais frio da unidade). Quando terminada a esterilização, a unidade foi alimentada com água destilada estéril clorada (150ppm por 5 minutos), o sistema de resfriamento da unidade foi ligado, e a temperatura de saída do Aquecedor e a vazão do sistema foram ajustados para as condições do ensaio, de acordo com a programação. Após a água clorada, a unidade foi alimentada com água destilada estéril. Após a estabilização à temperatura de processo, seja 96 ou 95°C , a unidade foi alimentada com a suspensão de esporos (10^5 esporos/mL), que foi mantida sob agitação constante.

Foram coletadas amostras da suspensão de esporos nas portas assépticas na saída da Retenção 2, na saída da Retenção 1 e na saída do Aquecedor, nesta ordem. Imediatamente após passar pela válvula, o fluido passava através de um trocador de calor de resfriamento, que recebia água gelada como meio de resfriamento, retirada de banho de gelo. O instante de cada coleta foi marcado no

arquivo de dados, pela abertura de um termopar, de modo que a falha de sua leitura registrada no arquivo de dados indicasse o instante exato de coleta.

Logo em seguida, cada tubo contendo amostra foi identificado, mergulhado e mantido em banho de gelo, e imediatamente levado para o Laboratório de Termobacteriologia (FEA/UNICAMP), onde cada amostra foi plaqueada em duplicata nas diluições 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} , em superfície, em agar nutriente. As placas foram incubadas em BOD a 30°C/48h.

Foi usado o mesmo trocador de calor de resfriamento para coletar amostras na saída de Retenção 2 e na saída do Aquecedor, sendo que entre a primeira e a segunda coleta foi feita uma sanitização do interior do trocador de calor, com solução 2,5% de hipoclorito de sódio, por cerca de 4 minutos, a fim de causar cerca de 3 ciclos de redução (DeQueiroz e Day, 2008), seguido de enxágüe do interior do trocador com 1 litro de água destilada estéril, dentro da capela de fluxo laminar da unidade UHT.

Logo após a coleta das amostras, foi realizada a limpeza *Clean in Place* (CIP) na unidade, com vazão de 2,0 L/min, usando o seguinte protocolo:

- Enxágüe com água potável a 96°C por 10 minutos
- Aplicação de solução de Elsolve® (Ecolab) 0,13% por 10 minutos a 50°C
- Enxágüe com água potável por 10 minutos
- Aplicação de solução de Vortex ES® (Ecolab) 0,2% por 15 minutos a temperatura ambiente
- Enxágüe com água potável por 15 minutos.

Este procedimento de CIP foi repetido para cada lado do sistema de enchimento.

Os dados de temperatura coletados no sistema UHT foram analisados da seguinte maneira:

1. Determinação dos intervalos de dados efetivos, dentre o conjunto de dados coletados, que foram marcados graças à abertura do termopar.
2. Cálculo da temperatura média dentre esses valores, para cada ponto de medida.
3. Determinação do tempo de residência mínimo de cada amostra, a partir da vazão, das medidas da tubulação da unidade piloto e do valor do número de Reynolds (se Turbulento, $v_{\text{mín}} = 1,2 \times v_{\text{média}}$; se Laminar, $v_{\text{mín}} = 2 \times v_{\text{média}}$).
4. Cálculo do ponto equivalente ($t_{\text{eq}} \times T_{\text{eq}}$) referente ao processo sofrido por cada amostra.
5. Cálculo do valor D correspondente.
6. Comparação entre o valor D obtido e o valor D previsto pelo modelo Temperatura x Cisalhamento.

Para o cálculo do ponto equivalente, foi usada uma planilha construída em Microsoft Excel, que calcula o perfil térmico de processos de aquecimento e resfriamento, através do método proposto por Deindoerfer e Humphrey (1957). A partir deste perfil estimado, esta planilha calcula então o ponto equivalente a este

processo, calculando numericamente a integral $G = \int_0^t \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) dt$, pelo

método de Simpson, para valores de Energia de ativação entre 50kJ/mol e 370kJ/mol, a intervalos de 20kJ/mol.

Obtido o ponto equivalente a esse processo, foi então calculado o valor de D, baseado em $F = \gamma * D$, onde F foi o tempo equivalente calculado por *EPM*. O valor gama (γ) foi substituído pelo valor negativo da fração de sobreviventes, obtido como o logaritmo da razão entre a contagem de sobreviventes na amostra coletada em portas assépticas de etapas consecutivas.

É interessante chamar a atenção ao fato de que o valor da fração de sobreviventes cai com a diminuição da população de sobrevivente, ao passo que o valor de gama (γ) aumenta, e o valor absoluto (módulo) de ambos é idêntico.

4.6.1. Avaliação da resistência térmica dentro da unidade HTST Microthermics

A fim de comparar os resultados obtidos no Reator de Cisalhamento com aqueles obtidos na unidade HTST piloto Microthermics, foi necessário determinar qual o valor da resistência térmica dentro da mesma.

O Método do Ponto Equivalente – *EPM* – proposto por Swartzel (1982), teoricamente permite determinar qual a combinação de tempo e temperatura de uma curva de aquecimento e resfriamento instantâneos que é equivalente a todo o processo contínuo aplicado. De posse desse Ponto Equivalente e da variação na população do microrganismo, calcula-se o valor D. Feita essa estimativa para mais de um processo, estima-se o valor z.

Já o método de Exposições Isotérmicas Parciais Pareadas – *PEIE* – proposto por Welt *et al.* (1997), permite a determinação de valores de Energia de

Ativação (E_a) e constante cinética de reação àquela temperatura (k_T), que podem ser convertidos diretamente em D e z .

O *EPM* envolve diversos passos para a obtenção do par Tempo-Temperatura Equivalentes.

A Equação 1 (apresentada no item **3.1**) é comumente usada para representar reações de pseudo-primeira ordem, como a inativação de esporos:

$$\text{Equação 1} \quad \frac{dN}{dt} = -k \cdot N$$

Assumindo que k (taxa específica de reação) é independente do tamanho da população N , rearranjando a Equação 1 e integrando-a, resulta:

$$\text{Equação 43} \quad \int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \int_0^t k \cdot dt$$

$$\ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = \int_0^t k \cdot dt$$

O valor de k está relacionado à temperatura, através da relação de Arrhenius:

$$\text{Equação 44} \quad k = A \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right)$$

Onde A é o fator pré-exponencial e E_a é a energia de ativação da reação (kJ/mol). Substituindo a Equação 44 na Equação 43 e rearranjando-a de modo a isolar os parâmetros constantes, obtém-se:

$$\text{Equação 45} \quad \frac{\ln\left(\frac{N_0}{N}\right)}{A} = \int_0^t \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) dt$$

Swartzel (1982) definiu o lado esquerdo da Equação 45 como sendo a relação de redução térmica “G”.

$$\text{Equação 46} \quad G = \int_0^t \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) dt$$

Conhecendo-se a história térmica de um processo contínuo ($T(t)$), e resolvendo-se a integral da Equação 46, para um certo valor de E_a , obtém-se:

$$\text{Equação 47} \quad G = t_e \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T_e}\right)$$

onde t_e e T_e são o tempo equivalente e a temperatura equivalente, respectivamente. A história térmica é obtida pela resolução da Equação 7.

Swartzel (1982 e 1984) sugeriu que para cada par G - E_a , obtém-se um par t_e - T_e (tempo equivalente – Temperatura equivalente), e esses pontos seriam coincidentes, não importando o valor de E_a utilizado. Na prática, para diferentes valores de E_a , diferentes pares de t_e - T_e são encontrados, conforme pode ser verificado na Figura 1 (item 3.2), onde o ponto de intersecção entre cada par de retas representa um ponto equivalente.

Numa tentativa de tornar o método *EPM* mais preciso, Nunes e Swartzel (1990) apresentaram uma reparametrização do método, inserindo um termo a mais na Equação 46, e sugerindo que a regressão fosse feita de acordo com o método de Regressão não-Linear com Pesos, onde os pesos eram dados por G^2 . A Equação 46, após a modificação proposta, é apresentada a seguir:

$$\text{Equação 48} \quad G = \int_0^t \exp\left(\frac{E_a}{R \cdot T_{ref}} - \frac{E_a}{R \cdot T(t)}\right) dt$$

Como o método proposto por Swartzel não apresentou respostas precisas, mesmo após a implementação dos aprimoramentos propostos (Nunes e Swartzel, 1990), também foram usados os parâmetros cinéticos obtidos mediante o método de “Exposições Isotérmicas Parciais Pareadas” – *PEIE*, proposto por Welt *et al.* (1997), conforme usado por Vieira *et al.* (2002) e Tamega Jr. (2006).

Segundo este método, embora não se possa determinar os parâmetros cinéticos (k – taxa específica de reação, e E_a – Energia de Ativação) a partir dos dados de um único processo térmico, se forem realizados mais de 2 processos contínuos, é possível estimar tais parâmetros por iterações sucessivas. Da mesma forma que o método *EPM*, é calculado o valor de G para cada um dos processos realizados (Equação 46), porém este cálculo somente é feito para dois valores de Energia de Ativação, sendo que o primeiro valor trata-se de uma aproximação e o segundo valor é obtido a partir de uma relação arbitrária com o primeiro.

Este procedimento, conforme descrito por Welt *et al.* (1997), pode ser descrito pelo seguinte algoritmo:

1. Realiza-se alguns processos térmicos (ao menos três), em que ocorra alguma reação catalisada pelo calor;
2. Registra-se as temperaturas em cada etapa do processo;
3. Determina-se as concentrações iniciais e finais do composto de interesse em cada processo.
4. Se necessário, estima-se a história térmica ao longo do processo, através do método proposto por Deindoerfer e Humphrey (1959), usando a Equação 7.

5. Estabece-se um valor para a primeira Energia de Ativação (E_{a1}) da reação (por exemplo 300kJ/mol), e um critério para o cálculo da segunda Energia de Ativação, como por exemplo, o dobro da primeira ($E_{a2} = 2 * E_{a1}$).
6. Calcula-se o valor de G, para cada um dos processos, para cada Energia de Ativação, resolvendo-se a Equação 46.
7. Determina-se o Ponto Equivalente para cada processo pela intersecção entre as duas retas encontradas (E_a), encontrando-se uma temperatura equivalente, e um tempo equivalente.
8. A partir da variação na concentração do composto de interesse, verificada experimentalmente, determina-se o valor da Constante de reação, $k = \text{Ln}(C/C_0) * t_{eq}^{-1}$;
9. De posse da Constante de reação e da Temperatura equivalente (T_{eq}) para dois processos diferentes, obtém-se o valor da Energia de Ativação, através da Equação 49:

Equação 49

$$E_a = \frac{R \cdot \ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{\left(\frac{T_{eq,1} - T_{eq,2}}{T_{eq,1} \cdot T_{eq,2}}\right)}$$

Onde E_a é a energia de ativação; R é a constante universal dos gases, k_1 é a constante de reação da primeira reação, k_2 é a constante de reação da segunda reação, T_{eq1} é a temperatura equivalente encontrada para a primeira reação e T_{eq2} é a temperatura equivalente encontrada para a segunda reação.

10. De posse da energia de ativação, repete-se o processo a partir do passo 5.

11. Após a convergência (foi usado o critério de $\varepsilon < 10^{-6}$), os valores de D e z foram calculados a partir de E_a e k_T , através da relação de Ramaswamy *et al.* (1989), segundo a qual a relação entre o valor z e a energia de ativação é dada por:

$$\text{Equação 50} \quad \text{valor } z = \frac{\ln(10) \cdot R \cdot T_{\min} \cdot T_{\max}}{E_a}$$

Onde T_{\min} e T_{\max} são, respectivamente, a menor e a maior temperatura equivalente encontradas.

Este algoritmo converge rapidamente, de forma que não são necessárias mais que 5 iterações para obter-se precisão maior que 0,1 J/mol.

Foi construída uma planilha em Microsoft Excel® para a realização desses cálculos, considerando o tempo de residência mínimo dentro de cada etapa da unidade HTST Microthermics.

Foi considerado que o processo térmico somente teve letalidade efetiva a partir da saída do Aquecedor. A cinética de inativação foi então avaliada ao longo da Retenção 1 e da Retenção 2, considerando como contagem inicial aquela obtida na amostra na saída do Aquecedor.

4.7. Tratamento Estatístico

A modelagem dos resultados obtidos segundo o Delineamento Composto Completo Rotacional no Reator de Cisalhamento foi efetuada conforme descrito por Rodrigues e Lemma (2005), mediante modelo polinomial, utilizando como resposta o valor D_{Reator} e como variáveis independentes a temperatura e a tensão de cisalhamento, até os termos quadráticos.

Foi feita a regressão linear do logaritmo de D vs. a temperatura do tratamento térmico (curva fantasma) para cada um dos três métodos de inativação de *B. atrophaeus* empregados – método TDT, tratamento em reator de cisalhamento e em unidade HTST piloto. A regressão linear realizada tinha por objetivo encontrar as equações das retas que descrevessem a variação do logaritmo de D vs. Temperatura, em modelos tipo “ $y = mx + b$ ”, onde “y” é o Log (D), “x” é a temperatura, “m” é o coeficiente angular e “b” é o coeficiente linear da reta.

Os coeficientes angulares (m) e lineares (b) das retas foram comparados por teste “t” de Student, de diferença entre valores, conforme descrito por Zar (1999). De acordo com este autor, os coeficientes são estatisticamente diferentes quando o valor t calculado (de acordo com a Equação 51), for maior que o valor t de significância estatística a 90%.

$$\text{Equação 51} \quad t = \frac{\text{coeficiente1} - \text{coeficiente2}}{\text{desvio padrão combinado}}$$

Onde o desvio padrão combinado é dado por:

$$\text{desvio padrão combinado} = \sqrt{\frac{\left(\frac{SQR_1 + SQR_2}{GL_1 + GL_2}\right)}{\left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n X_i\right)^2}{n}\right]_1} + \frac{\left(\frac{SQR_1 + SQR_2}{GL_1 + GL_2}\right)}{\left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n X_i\right)^2}{n}\right]_2}}$$

Onde SQR_j é a soma quadrática dos erros de ajuste (resíduos) do conjunto de dados j (índice dos colchetes na equação), GL_j é o número de graus de liberdade da regressão do conjunto de dados j , X_i é o valor x da i -ésima observação experimental, e n é o número total de observações.

Ainda de acordo com a metodologia de análise proposta por este autor, quando a inclinação das retas (m_1 e m_2) resultaram não diferentes ao nível de significância desejado, foi verificado se as mesmas eram coincidentes ou paralelas, calculando o valor t para os coeficientes lineares (b_1 e b_2).

5. Resultados e Discussão

5.1. Determinação da Resistência Térmica em Tubos TDT

Os dados de sobreviventes vs. tempo, apresentados “Anexo 01 – Resultado do Método do Tubo TDT para avaliação da resistência térmica de *B. atrophaeus*” (item 9.1.1), foram tratados por regressão linear para determinar o Índice de Redução Decimal deste microrganismo nas temperaturas 92, 94 e 96°C.

Tabela 7: Valores D obtidos em tubos TDT, em banho de óleo

T(°C)	D(min)	Erro Padrão	R ²	95% inferior	95% superior
92	33,41	6,726	0,90	20,67	46,60
94	20,73	2,973	0,94	14,32	32,40
96	15,33	4,250	0,88	7,26	23,66

O gráfico construído com a temperatura e o logaritmo dos valores D apresentados na Tabela 7 é denominado de “Curva Fantasma” (vide Figura 7). Realizando a regressão linear destes valores, foi obtido um valor de $z = 11,82^{\circ}\text{C}$ (erro padrão: $1,56^{\circ}\text{C}$), com $R^2 = 0,983$.

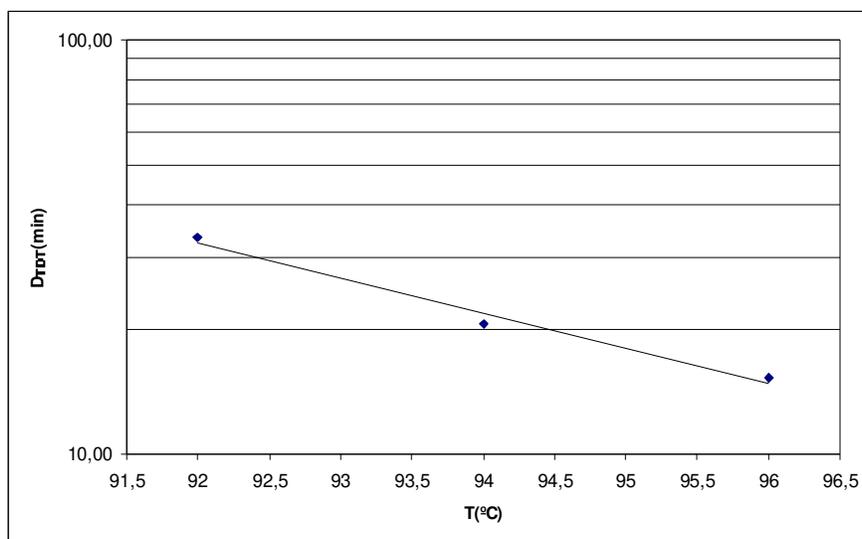


Figura 7: Curva fantasma de *B. atrophaeus* em água destilada, pH 6,87, método TDT.

Este resultado difere em pouco do obtido por Licciardello e Nickerson (1963), que encontraram um valor z de aproximadamente 10°C para *Bacillus subtilis* var. *niger* em tampão fosfato pH 7.0 (tubo capilar). Porém, este valor difere do valor encontrado por Cho *et al.* (1999), cujo valor z encontrado foi de $8,74^{\circ}\text{C}$, para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em solução de NaCl 0.1%.

Por outro lado, estes autores não usaram *Bacillus atrophaeus* em seus ensaios, nem água pura como meio de suspensão dos esporos, o que pode explicar a diferença verificada entre os valores.

5.2. Determinação da Tensão de Cisalhamento máxima aplicada dentro do Reator de Cisalhamento

O Reator de Cisalhamento foi capaz de aplicar 7200RPM (753,98 rad/s) na velocidade máxima, que, de acordo com a Tabela 6, foi suficiente para causar a mesma tensão de cisalhamento que a unidade HTST piloto, até a vazão de 2L/min a temperatura ambiente. Usando essa rotação máxima, resolvendo numericamente a Equação 32, foi encontrada a taxa de cisalhamento máxima que pode ser aplicada no Reator de Cisalhamento:

$$\dot{\gamma} = \frac{2 \cdot \Omega}{(\alpha^2 - 1)} \cdot \frac{R_c^2}{R_b^2}$$

Onde Ω é a rotação (753,98 radianos por segundo), R_c é o raio do copo (0,05m), R_b é o raio do rotor (0,045m) e α é a razão R_c/R_b (1,11). Substituindo na Equação 32 e resolvendo-a:

$$\dot{\gamma} = \frac{2 \cdot 753,98}{(1,087^2 - 1)} \cdot \frac{0,05^2}{0,045^2} \therefore$$

$$\dot{\gamma} = 9817,5 s^{-1}$$

Conhecendo a viscosidade da água ($\mu_{\text{água}} = 0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), a tensão de cisalhamento máxima a ser aplicada no reator foi:

$$\begin{aligned}\sigma &= \gamma \cdot \mu \therefore \\ \sigma &= 9817,5 \cdot 0,001 \therefore \\ \sigma &\cong 9,82 \text{ Pa}\end{aligned}$$

Esta tensão de cisalhamento representa o valor mais alto que foi atingido pelo reator de cisalhamento, sendo suficiente para simular as tensões de cisalhamento causadas pela vazão dentro da unidade HTST (vazão ≤ 2 litros por minuto).

5.3. Determinação da Resistência Térmica no Reator de Cisalhamento

Como citado no item 4.4, inicialmente as amostras eram retiradas do interior do copo através de uma única seringa estéril. Porém, como pode ser visto na Figura 8, as amostras retiradas após 4ª amostragem apresentaram efeito de cauda (“tailing”), por possível acúmulo de sobreviventes das 3 primeiras amostragens.

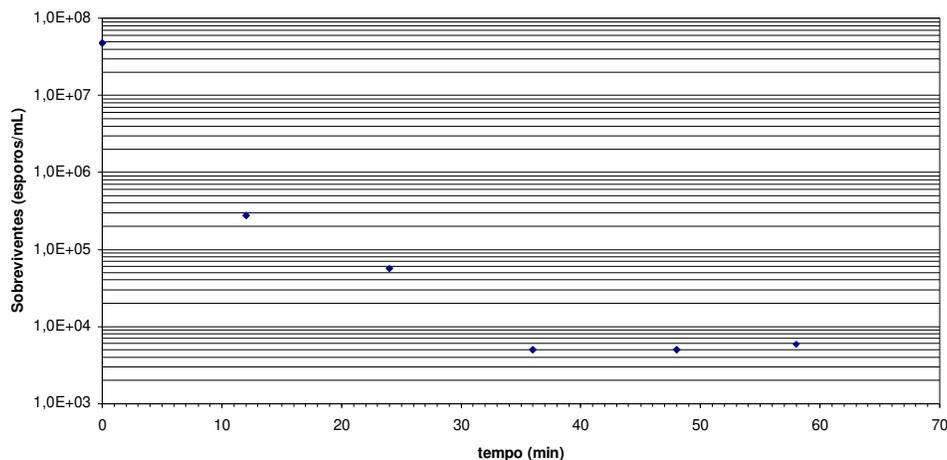


Figura 8: Curva de sobreviventes de *B. atrophaeus* em água destilada, pH 6,87, teste realizado em Reator de Cisalhamento ($T=93^{\circ}\text{C}$ e $\sigma = 4,91\text{Pa}$). Experimento em que as amostras foram retiradas com uma agulha.

Para corrigir este efeito, foi utilizada uma segunda agulha para retirada da 4ª, 5ª, 6ª e 7ª amostras. Como pode ser visto na Figura 9, o efeito de acúmulo foi eliminado com o uso desta segunda agulha, observando um comportamento linear.

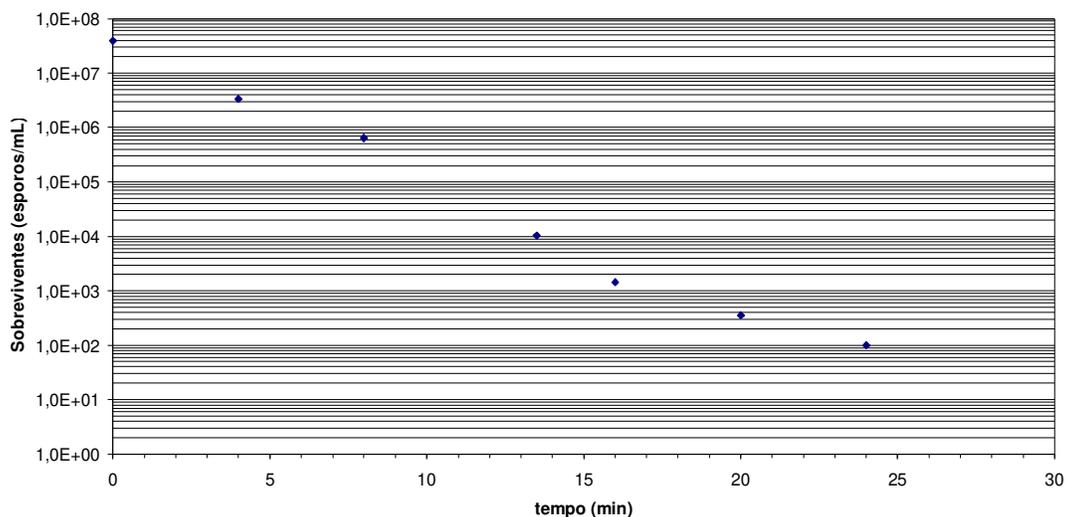


Figura 9: Curva de sobreviventes de *B. atrophaeus* em água destilada, pH 6,87, teste realizado em Reator de Cisalhamento ($T=95,4^{\circ}\text{C}$ e $\sigma = 8,35\text{Pa}$). Amostras coletadas com duas agulhas (agulha 01: 1ª, 2ª e 3ª amostra; agulha 02: 4ª, 5ª e 6ª amostra).

Mediante regressão linear dos dados de sobreviventes apresentados no “Anexo 01 – Reator de Cisalhamento” (item 9.1.2), foram calculados os valores D para cada combinação de Temperatura e tensão de cisalhamento. Esses valores D , bem como os dados usados para determiná-los, encontram-se no mesmo anexo.

5.3.1. Resultados do planejamento experimental aplicado

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados para o planejamento experimental desenhado para verificar o efeito da tensão de Cisalhamento (em Pa) e da Temperatura de pasteurização (em °C) sobre o valor D de *Bacillus atrophaeus* em água destilada estéril pH 6,87.

Tabela 8: Planejamento experimental aplicado – valores reais das variáveis e valores obtidos para a resposta (Valor D)

Nº experi- mento	Variáveis Reais			Variáveis Codificadas		Resposta
	Rotação (RPM)	Shear stress (Pa)	Tempe- ratura (°C)	Shear stress_c	Tempe- ratura_c	Valor D(min)
01	1050	1,43	90,9	-1,00	-0,99	17,4
02	6120	8,35	94,6	0,99	0,75	6,3
03	1050	1,43	95,4	-1,00	1,13	5,5
04	6120	8,35	95,4	0,99	1,13	4,1
05	0	0	93,0	-1,414	0	11,3
06	7200	9,82	92,7	1,414	-0,141	9,4
07	3600	4,91	90,5	0	-1,179	15,4
08	3600	4,91	96,2	0	1,509	3,9
09	3600	4,91	93,4	0	0,189	9,1
10	3600	4,91	93,3	0	0,141	8,7
11	3600	4,91	93,3	0	0,141	9,2
12	3600	4,91	93,0	0	0	9,5

Nesta tabela, os valores de temperatura indicados foram obtidos analisando os dados de cada um dos experimentos, e calculando sua média. As condições de controle de temperatura não permitiram refinamento suficiente para obter, com precisão, as temperaturas programadas inicialmente, e por isso foi necessário alterar os valores da temperatura codificada para refletir os valores reais.

A maior resistência (maior valor D) foi observada à temperatura mais baixa (90,9), sob uma tensão de cisalhamento baixa (1,43Pa) – experimento 01. A mais baixa resistência foi observada à temperatura mais alta (96,2°C), sob tensão de

cisalhamento média (4,91Pa) – experimento 08. Em primeira análise, isso comprova o efeito principal da temperatura sobre a resistência do *Bacillus atrophaeus*. Para os pontos centrais do desenho experimental, os valores da resposta são relativamente próximos.

De acordo com esses dados, foi construído o gráfico tridimensional apresentados na Figura 10:

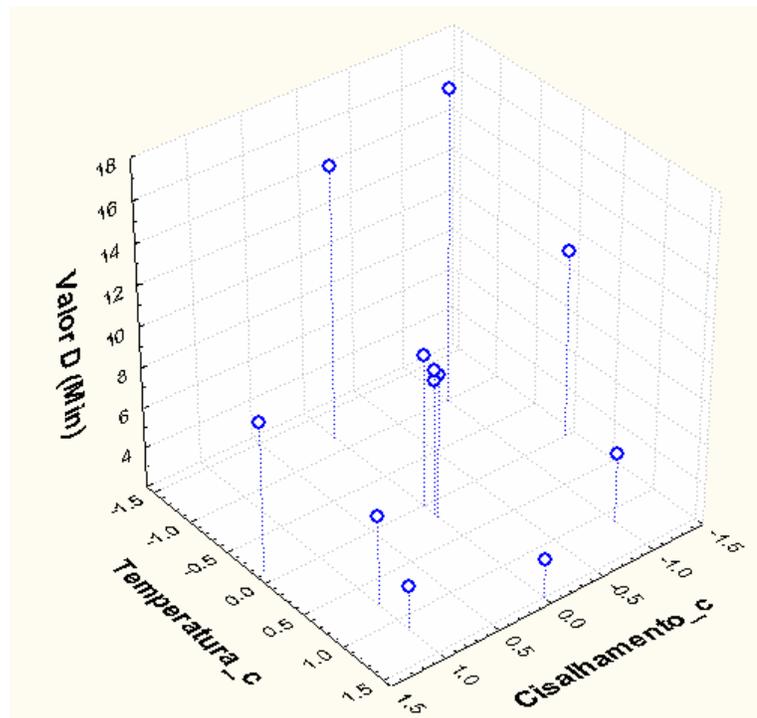


Figura 10: Gráfico 3D da temperatura e a tensão de cisalhamento codificados vs. o valor D obtido para *Bacillus atrophaeus* em água pH 6,87.

O gráfico sugere uma correlação inversa entre o valor D e a tensão de cisalhamento, da mesma forma que era esperado para a temperatura.

A seguir, é apresentada a análise dos resultados da implementação do planejamento experimental para identificar os efeitos significativos das variáveis envolvidas, usando o software *Statistica V.7.1*, módulo *Experimental Design – Central composite, non-factorial, surface designs - Analyse*.

5.3.2. Análise dos resultados do planejamento experimental, usando o Valor Linear de D como variável dependente:

Como apresentado na Tabela 9, o termo quadrático da tensão de cisalhamento foi o único não significativo, sendo que o termo linear da temperatura foi o mais significativo das variáveis. A soma quadrática dos resíduos foi baixa, indicando bom ajuste do modelo, assim como o alto valor de R^2 . Os índices “c” indicam que trata-se da análise dos valores codificados.

Tabela 9: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro:

Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Valor D; $R^2 = 0,99036$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = 0,3001743				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,324	0,271	34,394	4,02E-08
<i>(1)SHEARc (L)</i>	-2,108	0,415	-5,079	0,002
SHEARc (Q)	0,437	0,430	1,016	0,349
<i>(2)TEMPc (L)</i>	-9,931	0,468	-21,234	7,11E-07
<i>TEMPc (Q)</i>	1,064	0,540	1,969	0,097
<i>1L por 2L</i>	1,426	0,643	2,216	0,069

Valores em vermelho denotam significância estatística de 90% ($p < 0,1$)

Quando o termo de erro usado foi a soma quadrática do erro puro (Tabela 10), o termo quadrático da temperatura deixou de ser significativo, assim como a interação entre temperatura e cisalhamento.

Tabela 10: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro:

Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Valor D; R ² = 0,98413; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática do Erro Puro = 0,1352				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,324	0,182	51,248	0,012
<i>(1)SHEARc (L)</i>	-2,108	0,279	-7,568	0,084
SHEARc (Q)	0,437	0,289	1,514	0,372
<i>(2)TEMPc (L)</i>	-9,931	0,314	-31,640	0,020
TEMPc (Q)	1,064	0,363	2,934	0,209
1L por 2L	1,426	0,432	3,302	0,187

A análise foi refeita, retirando o termo quadrático do cisalhamento (“SHEARc (Q)”), o qual apresenta o maior valor p, tanto quando analisado o erro puro como quando analisada a soma quadrática dos resíduos.

Na Tabela 11, observa-se novamente que o maior efeito é causado pelo termo linear da temperatura. Porém, o efeito do termo quadrático da temperatura (“TEMPc (Q)”) deixou de ser estatisticamente significativo ($p > 0,1$).

Tabela 11: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)”;

Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Valor D; R ² = 0,9887; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = 0,301574				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,494	0,214	44,453	7,62E-10
<i>(1)SHEARc (L)</i>	-2,127	0,416	-5,116	0,001
<i>(2)TEMPc (L)</i>	-9,905	0,468	-21,161	1,32E-07
TEMPc (Q)	0,958	0,531	1,803	0,114
<i>1L por 2L</i>	1,488	0,642	2,319	0,053

Realizando esta análise usando como termo de erro a soma quadrática do erro puro (Tabela 12), observa-se que os termos significativos a $p < 0,1$ foram somente os termos lineares da tensão de cisalhamento e da temperatura.

Tabela 12: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)”;

Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Valor D; $R^2 = 0,9887$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática do Erro Puro = 0,1352				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,494	0,143	66,390	0,010
(1)SHEARc (L)	-2,127	0,278	-7,641	0,083
(2)TEMPc (L)	-9,905	0,313	-31,604	0,020
TEMPc (Q)	0,958	0,356	2,692	0,226
1L por 2L	1,488	0,430	3,463	0,179

A análise foi feita novamente, ignorando-se o efeito do termo quadrático da temperatura (“TEMPc (Q)”), que apresentou o mais alto valor p.

De acordo com a Tabela 13, o termo linear do cisalhamento (“SHEARc (L)”), da temperatura (“TEMPc (L)”) e a interação (“1L por 2L”) apresentam significância estatística ao nível de valor $p < 0,05$. Também chama a atenção o alto valor de R^2 .

Tabela 13: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”;

Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Valor D; $R^2 = 0,98346$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = 0,3863874				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,732	0,190	51,254	2,33E-11
(1)SHEARc (L)	-2,262	0,463	-4,889	0,001
(2)TEMPc (L)	-9,679	0,511	-18,960	6,19E-08
1L por 2L	1,711	0,713	2,400	0,043

Por outro lado, como apresentado na Tabela 14, de acordo com a Análise por Erro Puro, a Interação Cisalhamento x Temperatura (“1L por 2L”) apresenta baixa significância estatística (Valor p > 0,15), levando à necessidade de verificar qual o comportamento do valor p dos termos restantes quando da sua retirada.

Tabela 14: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Valor D; R ² = 0,98346; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma do Erro Puro = 0,1352				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,732	0,112	86,647	0,007
<i>(1)SHEARc (L)</i>	-2,262	0,274	-8,265	0,077
<i>(2)TEMPc (L)</i>	-9,679	0,302	-32,053	0,020
1L por 2L	1,711	0,422	4,058	0,154

Os resultados apresentados na Tabela 15 permitem concluir que tanto o efeito linear da temperatura quanto a tensão de cisalhamento afetam significativamente o Valor D do *Bacillus atropheus*, sendo que o efeito da temperatura é quase cinco vezes maior que o efeito do cisalhamento.

Tabela 15: Estimativa dos efeitos para valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “SHEARc (Q)”, “TEMPc (Q)” e “1L por 2L”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Valor D; R ² = 0,97154; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma do Erro Puro = 0,1352				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	9,854	0,108	91,031	0,007
<i>(1)SHEARc (L)</i>	-1,982	0,265	-7,484	0,085
<i>(2)TEMPc (L)</i>	-9,934	0,295	-33,632	0,019

5.3.3. Análise dos resultados do planejamento experimental usando o logaritmo do valor de D como variável dependente

Tradicionalmente, a cinética de valor D vs. temperatura é log-linear (cinética de primeira ordem). Portanto, foi analisado o efeito das variáveis temperatura e tensão de cisalhamento vs. o logaritmo do valor D. Esta transformação da variável resposta é conveniente, pois reduz a variabilidade, fazendo com que a Soma Quadrática dos Resíduos e do Erro Puro sejam menores.

A análise com $p < 0,1$ demonstrou, de acordo com a Tabela 16, que os termos lineares de temperatura e tensão de cisalhamento foram significativos, assim como o termo quadrático da temperatura. O efeito da interação ("1L por 2L") e o termo quadrático do cisalhamento ("SHEARc (Q)") apresentaram baixa significância estatística.

Tabela 16: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Log(D); $R^2 = 0,98925$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = $8,099 \times 10^{-4}$				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,972</i>	<i>0,014</i>	<i>69,059</i>	<i>6,20E-10</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,088</i>	<i>0,022</i>	<i>-4,084</i>	<i>0,006</i>
SHEARc (Q)	0,009	0,022	0,423	0,687
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,481</i>	<i>0,024</i>	<i>-19,792</i>	<i>1,08E-06</i>
<i>TEMPc (Q)</i>	<i>-0,078</i>	<i>0,028</i>	<i>-2,792</i>	<i>0,032</i>
1L por 2L	0,001	0,033	0,029	0,978

Segundo os resultados das análises, apresentados na Tabela 16 e na Tabela 17, o termo que apresentou menor significância estatística foi a interação (“1L por 2L”), com valor $p > 0,97$. Por esse motivo, seu efeito deve ser descartado nas análises seguintes.

Tabela 17: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados com todos os parâmetros; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Log (D); $R^2 = 0,98925$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática do Erro Puro = $3,207 \times 10^{-4}$				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,972</i>	<i>0,009</i>	<i>109,754</i>	<i>0,006</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,088</i>	<i>0,014</i>	<i>-6,491</i>	<i>0,097</i>
SHEARc (Q)	0,009	0,014	0,672	0,624
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,481</i>	<i>0,015</i>	<i>-31,454</i>	<i>0,020</i>
TEMPc (Q)	-0,078	0,018	-4,436	0,141
1L por 2L	0,001	0,021	0,046	0,971

É interessante notar que nesse caso, em que é analisado o efeito dos fatores estudados no logaritmo da resposta (Log D), tanto a Soma Quadrática dos Resíduos quanto a Soma Quadrática do Erro Puro apresentaram valores que são 3 ordens de grandeza menores que o efeito estimado para o intercepto. Quando da análise usando o Valor D diretamente, a razão entre os erros e o valor do intercepto foi de apenas uma ordem de grandeza. Tal diferença não pode ser explicada simplesmente pela transformação (Linear → Log) influenciando nos valores dos erros, sugerindo que a correlação linear é melhor ajustada após tal transformação da variável resposta.

Na Tabela 18, assim como na Tabela 19, são apresentados os resultados dos efeitos das variáveis independentes quando desprezado o efeito da interação.

Observa-se que, enquanto na Tabela 18 o termo quadrático da temperatura é significativo, na Tabela 19 o mesmo não ocorre. Ambos resultados indicam que o termo quadrático de Cisalhamento (“SHEARc (Q)”) deve ser retirado do modelo, pois apresenta alto valor de p ($> 0,6$).

Tabela 18: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Log (D); R ² = 0,9893; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = 6,943x10 ⁻⁴				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,972</i>	<i>0,013</i>	<i>74,590</i>	<i>2,05E-11</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,088</i>	<i>0,019</i>	<i>-4,587</i>	<i>0,003</i>
SHEARc (Q)	0,010	0,021	0,461	0,658
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,481</i>	<i>0,022</i>	<i>-22,096</i>	<i>9,82E-08</i>
<i>TEMPc (Q)</i>	<i>-0,078</i>	<i>0,025</i>	<i>-3,075</i>	<i>0,018</i>

Tabela 19: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Log (D); R ² = 0,9893; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática do Erro Puro = 3,207x10 ⁻⁴				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,972</i>	<i>0,009</i>	<i>109,758</i>	<i>0,006</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,088</i>	<i>0,013</i>	<i>-6,750</i>	<i>0,094</i>
SHEARc (Q)	0,010	0,014	0,679	0,620
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,481</i>	<i>0,015</i>	<i>-32,514</i>	<i>0,020</i>
TEMPc (Q)	-0,078	0,017	-4,525	0,138

Na Tabela 20 observa-se que os efeitos dos termos lineares de Cisalhamento (“SHEARc (L)”) e de Temperatura (“TEMPc (L)”), bem como o termo quadrático do Cisalhamento (“SHEARc (Q)”) são estatisticamente significativos ($p > 0,1$). Porém, deve ser verificada qual a resposta da análise por erro puro, antes de estabelecer o modelo.

Tabela 20: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L” e “SHEARc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Log (D); $R^2 = 0,9889$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = $6,26 \times 10^{-4}$				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	0,976	0,010	100,698	1,06E-13
(1)SHEARc (L)	-0,088	0,018	-4,840	0,001
(2)TEMPc (L)	-0,481	0,021	-23,267	1,24E-08
TEMPc (Q)	-0,080	0,024	-3,378	0,010

Pelos dados da Tabela 21, o termo quadrático da temperatura ainda apresenta baixa significância estatística ($p > 0,1$), indicando que seu efeito também deve ser retirado do modelo.

Tabela 21: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L” e “SHEARc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Log (D); $R^2 = 0,9889$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática do Erro Puro = $3,207 \times 10^{-4}$				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	0,976	0,007	140,698	0,005
(1)SHEARc (L)	-0,088	0,013	-6,762	0,093
(2)TEMPc (L)	-0,481	0,015	-32,509	0,020
TEMPc (Q)	-0,080	0,017	-4,720	0,133

Pelos dados da Tabela 21, o termo quadrático da temperatura ainda apresenta baixa significância estatística ($p > 0,13$), indicando que seu efeito também deve ser retirado do modelo.

Nas Tabelas 22 e 23 são apresentados os resultados finais da análise estatística do efeito da tensão de cisalhamento e da temperatura sobre o logaritmo do valor D. Cabe ressaltar o alto coeficiente de correlação encontrado ($R^2 = 0,97$), bem como o baixo valor de Soma Quadrática de Resíduos e de Erro Puro (respectivamente $1,35 \times 10^{-3}$ e $3,207 \times 10^{-4}$). Como as diferenças entre os valores p apresentados na Tabela 15 e na Tabela 23 são relativamente pequenos, serão considerados os resultados desta última, para a qual foi considerada a relação log-linear entre as variáveis independentes temperatura e tensão de cisalhamento, e a variável dependente, log do valor D.

Tabela 22: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”, “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”;
Termo de Erro: Soma Quadrática dos Resíduos

Variável resposta: Log (D); $R^2 = 0,97313$; 2 fatores, 12 Ensaios; Soma Quadrática dos Resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,955</i>	<i>0,011</i>	<i>88,274</i>	<i>1,56E-14</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,080</i>	<i>0,026</i>	<i>-3,012</i>	<i>0,015</i>
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,497</i>	<i>0,030</i>	<i>-16,831</i>	<i>4,13E-08</i>

Tabela 23: Estimativa dos efeitos para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito de “1L por 2L”, “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma Quadrática do Erro Puro

Variável resposta: Log (D); R ² = 0,97313; 2 fatores, 12 Ensaio; Soma Quadrática do Erro Puro = 3,207x10 ⁻⁴				
	Efeito	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,955</i>	<i>0,005</i>	<i>181,136</i>	<i>3,51E-03</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,080</i>	<i>0,013</i>	<i>-6,180</i>	<i>0,10</i>
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,497</i>	<i>0,014</i>	<i>-34,537</i>	<i>0,02</i>

Na Tabela 24 a seguir, são apresentados os coeficientes de regressão obtidos para o modelo.

Tabela 24: Coeficientes de Regressão para log do valor D de *Bacillus atropheus* no Reator de cisalhamento - Análise dos resultados desprezando o efeito dos termos “SHEARc (Q)” e “TEMPc (Q)”; Termo de Erro: Soma dos Erros Médios

Variável resposta: Log (D); R ² = 0,97313; 2 fatores, 12 Ensaio; Soma Quadrática dos Resíduos = 1,35x10 ⁻³				
	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(6)	Valor p
<i>Intercepto</i>	<i>0,971</i>	<i>0,011</i>	<i>87,838</i>	<i>1,63E-14</i>
<i>(1)SHEARc (L)</i>	<i>-0,040</i>	<i>0,013</i>	<i>-3,012</i>	<i>0,015</i>
<i>(2)TEMPc (L)</i>	<i>-0,234</i>	<i>0,014</i>	<i>-16,831</i>	<i>4,13E-08</i>

O modelo encontrado, em função das variáveis codificadas foi:

Equação 52 $\text{Log (D)} = 0,971 - 0,234 \text{ Temp} - 0,04 \text{ Tensão de Cisalhamento}$

O modelo obtido com esses parâmetros tem boa capacidade de predição, como pode ser verificado na Figura 11, que apresenta o gráfico de Log D observado vs. Log D predito: Como pode ser visto, não há nenhuma evidência de tendência entre os dados experimentais e os valores preditos pelo modelo.

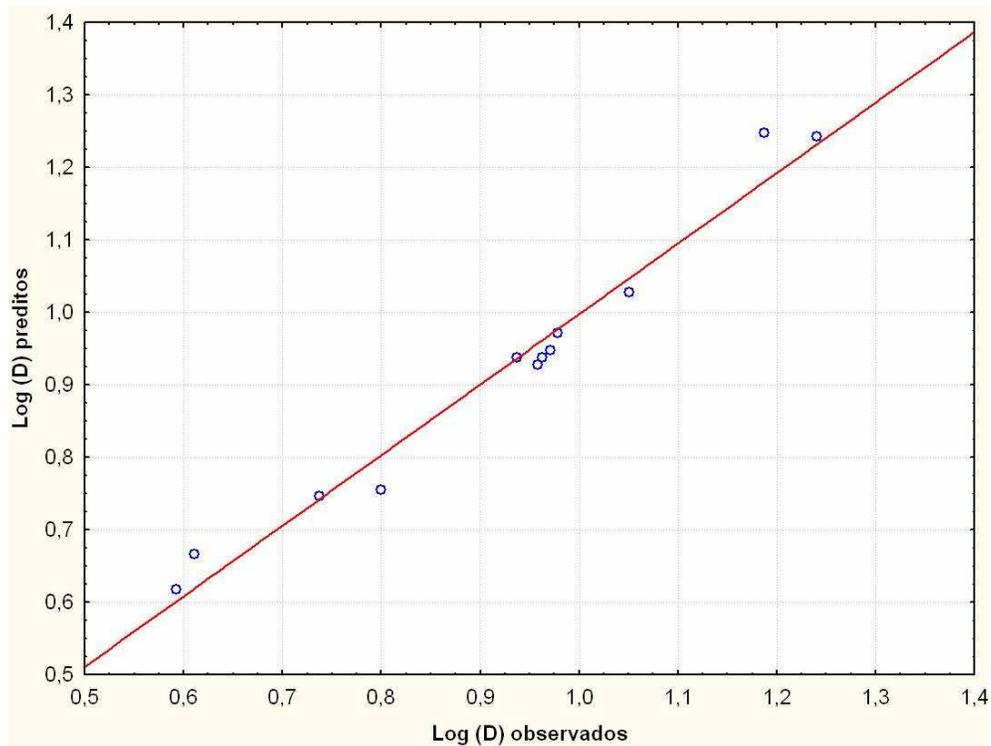


Figura 11: Gráfico de valores de Log D observados x valores de Log D preditos pelo modelo. SQ resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$; SQ erro puro = $3,21 \times 10^{-4}$

Como pode ser visto na Figura 11, não há nenhuma evidência de tendência entre os dados experimentais e os valores preditos pelo modelo.

Foi realizada análise de Variância para avaliar a capacidade de ajuste do modelo aos dados experimentais (Tabela 25); note-se que o valor de $F_{\text{calc.}}$ foi 54 vezes maior que o valor de $F_{\text{tab.}}$ para nível de confiança de 90%.

Tabela 25: Análise de Variância (ANOVA) do modelo obtido

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}^*	Valor p
Regressão	0,4400	2	0,2200	162,97	3,01	< 0,0000001
Resíduos	0,0122	9	0,0014			
Total	0,4522					

* $F_{2,9,10\%}$

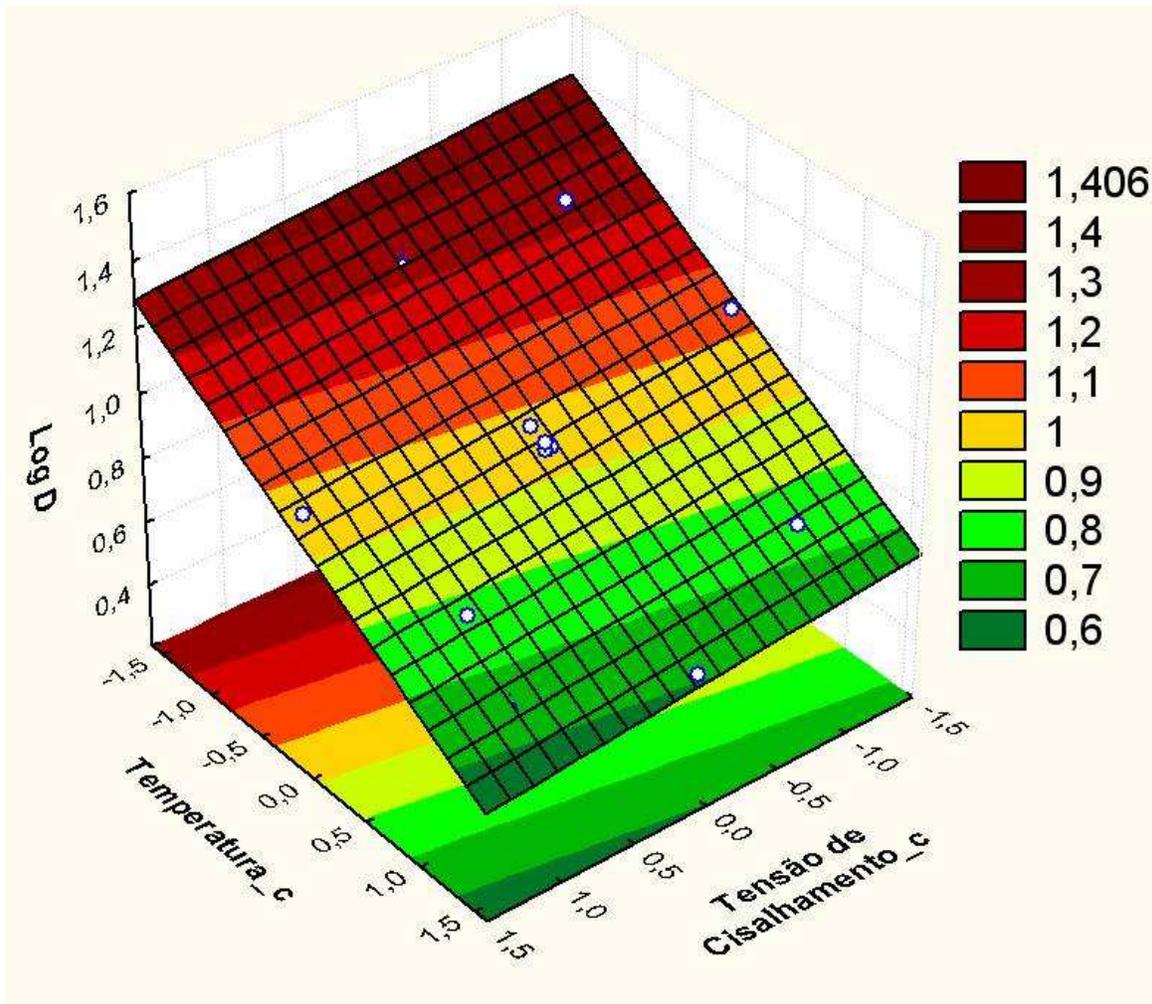


Figura 12: Superfície de Resposta do efeito da temperatura e tensão de cisalhamento sobre a Log D de *Bacillus atropheus* em água pH 6,87. Curva ajustada aos pontos experimentais (fatores codificados); $R^2 = 0,97$; SQ resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$; SQ erro puro: = $3,21 \times 10^{-4}$

A superfície apresentada na Figura 12 denota a correlação negativa entre os parâmetros estudados (Tensão de Cisalhamento e Temperatura) e a variável resposta (log D).

É conveniente transformar o modelo codificado para o modelo com as variáveis reais; o modelo real, considerando a Tensão de Cisalhamento em Pa e a Temperatura em °C, foi:

Equação 53:

$$\text{Log}(D) = 11,30 - 1,104 \times 10^{-1} T(^{\circ}\text{C}) - 1,153 \times 10^{-2} \sigma(\text{Pa})$$

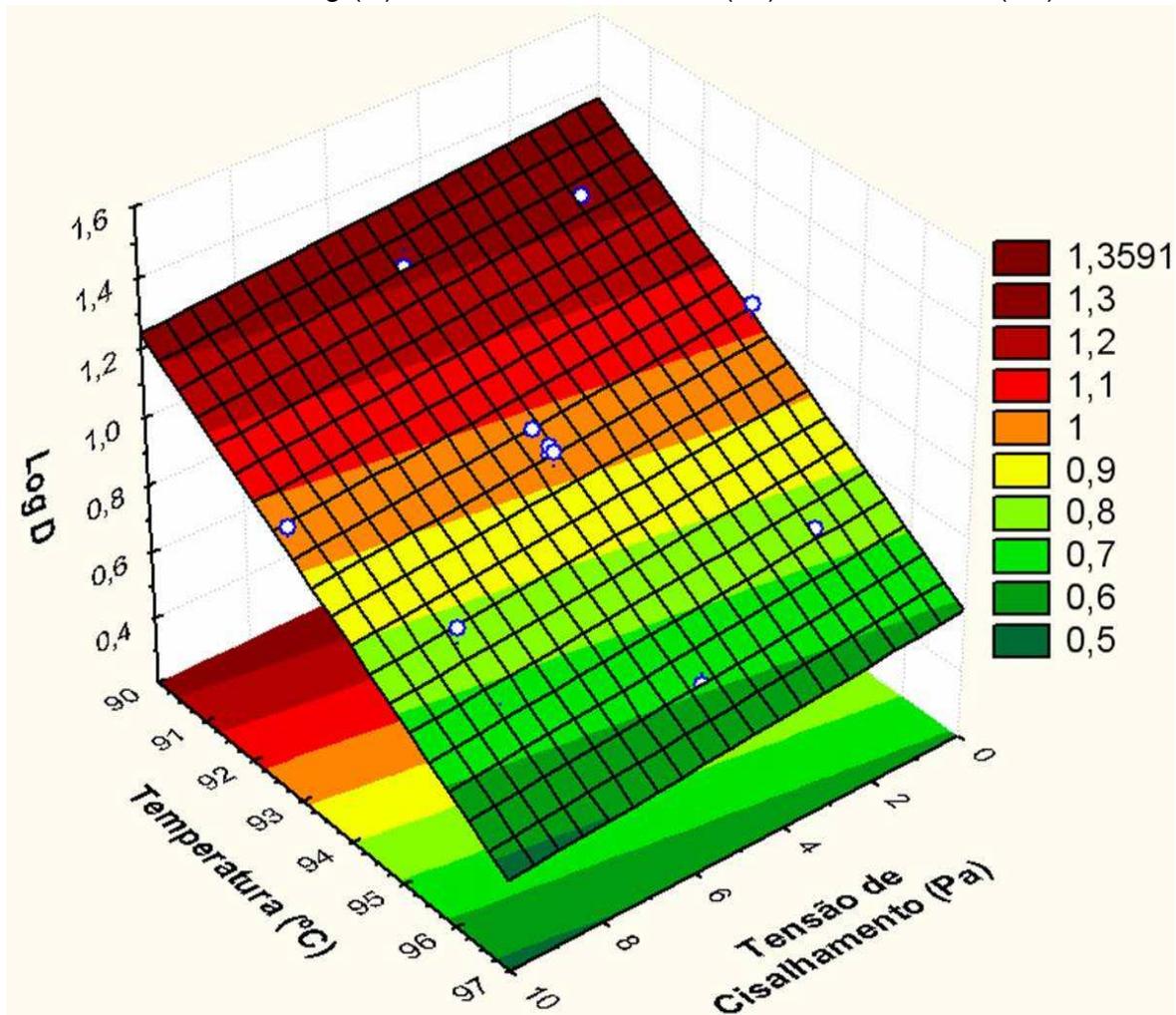


Figura 13: Superfície de Resposta do efeito da temperatura e tensão de cisalhamento sobre a Log D de *Bacillus atrophaeus* em água pH 6,87. Curva ajustada aos pontos experimentais (valores reais); $R^2 = 0,97$; SQ resíduos = $1,35 \times 10^{-3}$; SQ erro puro: = $3,21 \times 10^{-4}$

Não existem dados na literatura que possam ser usados para comprovar estes resultados, pois trata-se de pesquisa inédita.

5.4. Resultados da determinação da resistência térmica em planta de Processo Térmico de Fluxo Contínuo

Os tempos de residência mínimo de cada amostra no aquecimento, na retenção 1 e na retenção 2, em cada experimento, são apresentados na Tabela 26, assim como a queda de pressão estimada.

Tabela 26: Tratamentos térmicos (HTST) aplicados à suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus*

Data processo	Retenção 1					Retenção 2				
	$t_{resid}(s)$	$T_{ent} (^{\circ}C)$	$T_{saída} (^{\circ}C)$	$\Delta P (10^3Pa)$	Vazão (L/min)	$t_{resid}(s)$	$T_{ent} (^{\circ}C)$	$T_{saída} (^{\circ}C)$	$\Delta P (10^3Pa)$	Vazão (L/min)
16/04/08	48,31	99,16	97,07	13,1	1,00	46,03	97,21	95,26	4,02	1,00
07/05/08	46,42	99,09	97,58	13,6	1,04	44,27	97,81	96,21	4,18	1,04
09/05/08	48,06	96,31	94,67	13,2	1,01	45,74	94,81	92,46	4,05	1,01
14/05/08	47,75	95,39	93,87	13,7	1,05	46,03	93,91	92,10	4,17	1,04
04/06/08	51,25	97,07	93,76	31,7	1,50	30,78	93,70	92,18	4,82	1,50

Os tempos de residência foram calculados a partir da vazão, comprimento e diâmetro interno de cada seção (Tabela 2).

Na Tabela 26 estão apresentados os tratamentos térmicos aplicados à suspensão aquosa de esporos de *B. atrophaeus*. Não foram incluídos os dados referentes à etapa de aquecimento pois, em alguns dos experimentos realizados, ocorreu aumento na população de sobreviventes nessa etapa, em relação à anterior, possivelmente devido à ativação dos esporos (vide Anexo 01 – Resultados dos experimentos realizados para determinação do índice de redução decimal – unidade Piloto UHT Microthermics). A partir dos dados de tempo de processo e temperaturas de entrada e saída em cada etapa, é possível calcular as temperaturas e tempos equivalentes a cada etapa, através do método *EPM* proposto por Swartzel (1982), conforme modificação proposta por Nunes e Swartzel (1990), apresentado no item 4.6.1. Os processos equivalentes, a tensão de cisalhamento estimada e a contagem de sobreviventes de cada amostra em

cada etapa estão apresentados na Tabela 27 para a Retenção 1 e na Tabela 28, para a Retenção 2.

Na Tabela 27, pode-se observar que a maior redução na fração de sobreviventes (-0,688) ocorreu no processo a temperatura mais elevada e tensão de cisalhamento relativamente baixo (processo de 07/05/2008). Já quando sob alta tensão de cisalhamento e baixa temperatura (95,3°C), mesmo com tempo equivalente pouco mais alto, a fração de sobreviventes indicou menor redução da população (S = -0,244 no processo de 04/06/2008). Por outro lado, considerando o experimento a temperatura equivalente similar e tempo equivalente pouco menor (processo de 04/06/2008), observa-se redução na população proporcional à redução na tensão de cisalhamento – 58% e 48%, respectivamente.

Tabela 27: Retenção 1 - Processos equivalentes, tensão de cisalhamento e fração de sobreviventes em cada experimento realizado em planta piloto HTST Microthermics com suspensão de esporos de *B. atrophaeus* em água pH 6,87

Data processo	t _{equiv.} (s)	T _{equiv.} (°C)	Tensão de cisalhamento (Pa)	Fração de sobreviventes
16/04/08	48,28	98,06	1,90	-0,494
07/05/08	46,40	98,31	1,98	-0,688
09/05/08	48,04	95,45	1,91	-0,127
14/05/08	47,73	94,60	2,00	-0,150
04/06/08	51,17	95,31	4,61	-0,244

T_{ref} utilizada: 145°C, de acordo com o proposto por Nunes *et.al.*, 1993

Na Tabela 28, observa-se que todos os valores de tensão de cisalhamento são menores que aqueles apresentados na Tabela 27, isto é, a tensão de cisalhamento na Retenção 2 é menor do que na Retenção 1. No entanto, a fração de sobreviventes registradas nos experimentos de 16/04/2008 e de 07/05/2008 resultaram mais baixas, indicando maior inativação. Nesses dois experimentos, a

temperatura equivalente foi em torno a 96°C, e os tempos equivalentes foram 46 e 44,3 segundos.

O experimento de 14/05/2008 resultou num aumento na contagem de sobreviventes ao longo da Retenção 2. Os esporos foram expostos a uma baixa tensão de cisalhamento na Retenção 01 (2 Pa), seguida por baixas tensão de cisalhamento e temperatura na Retenção 02, o que resultou numa taxa de ativação dos esporos *maior* que a taxa de inativação. É interessante notar que a contagem obtida no experimento de 04/06/2008 indicou pequena redução na população sobrevivente, embora a temperatura e a tensão de cisalhamento fossem aproximadamente as mesmas. O que parece ter contribuído para tal resultado foi a tensão de cisalhamento aplicada na etapa anterior do processo contínuo (Retenção 1), em que a tensão de cisalhamento foi mais alta, causando danos aos esporos e aumentando a sua taxa de inativação.

Tabela 28: Retenção 2 - Processos equivalentes, tensão de cisalhamento e fração de sobreviventes em cada experimento realizado em planta piloto HTST Microthermics com suspensão de esporos de *B. atrophaeus* em água pH 6,87

Data processo	t _{equiv.} (s)	T _{equiv.} (°C)	Tensão de cisalhamento (Pa)	Fração de sobreviventes
16/04/08	46	96,19	0,640	-0,921
07/05/08	44,25	96,98	0,666	-0,940
09/05/08	45,70	93,57	0,645	-0,178
14/05/08	46,01	92,96	0,665	0,208
04/06/08	30,76	92,91	0,767	-0,069

T_{ref} utilizada: 145°C, de acordo com o proposto por Nunes *et.al.*, 1993

A partir dos tempos de residência, das temperaturas de entrada e saída em cada etapa, e da contagem de sobreviventes obtida em cada ponto, foram calculados a Temperatura Equivalente, o Tempo Equivalente e a Energia de Ativação de acordo com o método *PEIE*, conforme descrito por Welt *et al.*, 1997.

Os resultados para a Retenção 01 são apresentados na Tabela 29, e os resultados para a Retenção 02 estão apresentados na Tabela 30. Note-se que esse método, por seu próprio princípio, exige a comparação entre dois processos diferentes, a fim de fornecer o resultado de Temperatura e tempo equivalentes. Por este motivo, a Tabela 29 e a Tabela 30 apresentam os resultados para cada uma dessas comparações. Somente serão apresentados os resultados das comparações entre processos correspondentes a mesma etapa, em dias diferentes, por apresentarem a mesma tensão de cisalhamento, permitindo a sua comparação com o valor D estimado pelo modelo (Equação 53).

Tabela 29: Tempo e temperaturas equivalentes, e parâmetros cinéticos Energia de Ativação e valor D_{UHT-1} calculados pelo método *PEIE* para *Bacillus atrophaeus* em água pH 6,87 na unidade HTST piloto – Retenção 1. Cálculo de acordo com Welt *et al.*, 1997.

		07/05/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08
16/04/08	T_{eq} (°C)	N/C	98,32	98,22	98,17
	t_{eq} (s)	N/C	43,99	46,35	47,31
	Ea (J/mol)	N/C	585.753,5	384.915,2	272.823,5
	D_{UHT-1} (min)	N/C	1,48	1,56	1,60
07/05/08		16/04/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08
	T_{eq} (°C)	N/C	98,46	98,41	98,39
	t_{eq} (s)	N/C	43,4	44,95	45,46
	Ea (J/mol)	N/C	691.717,0	474.892,2	381.786,3
09/05/08		16/04/08	07/05/08	14/05/08	04/06/08
	T_{eq} (°C)	95,61	95,64	N/C	N/C
	t_{eq} (s)	45,27	44,26	N/C	N/C
	Ea (J/mol)	585.753,5	691.717,0	N/C	N/C
14/05/08		16/04/08	07/05/08	09/05/08	04/06/08
	T_{eq} (°C)	94,69	94,71	N/C	94,82
	t_{eq} (s)	46,35	46,13	N/C	42,33
	Ea (J/mol)	384.915,2	474.852,2	N/C	905.236,5
04/06/08		16/04/08	07/05/08	09/05/08	14/05/08
	T_{eq} (°C)	95,14	95,29	N/C	N/C
	t_{eq} (s)	48,48	45,73	N/C	N/C
	Ea (J/mol)	272.823,5	381.786,3	N/C	N/C
	D_{UHT-1} (min)	3,31	3,12	N/C	N/C

D_{UHT-1} : Valor D calculado, a temperatura equivalente, a partir da fração de sobreviventes (Tabela 27) e do tempo equivalente de processo ($D = F / \gamma$; $F = t_{eq}$)

T_{eq} : Temperatura equivalente calculado (°C)

t_{eq} : tempo equivalente calculado (s)

N/C: Algoritmo de determinação de T_{eq} e t_{eq} : não convergiu

Foi feita a regressão linear dos valores apresentados na Tabela 29 (Log D_{UHT-1} vs. T_{eq} respectivamente), e foi encontrado um valor z de 6,52°C ($R^2 = 0,947$) para o *Bacillus atrophaeus*, dentro da Unidade HTST Microthermics, Retenção 1 – gráfico apresentado na Figura 15 e Figura 16. Tal valor concorda com o que foi obtido por Edwards *et al.* (1965), que obtiveram valor z semelhante (6,67°C) em sistema UHT, com *B. subtilis* A em leite desnatado, e por Odlaug *et al*

(1961), que reportaram valor D próximo ($\sim 6,4^{\circ}\text{C}$) em tampão fosfato 0,067M em termoresistômetro.

Tabela 30: Tempo e temperaturas equivalentes, e parâmetros cinéticos Energia de Ativação e valor $D_{\text{UHT-2}}$ calculados pelo método PEIE para *Bacillus atrophaeus* em água pH 6,87 na unidade HTST piloto – Retenção 2. Cálculo de acordo com Welt *et al.*, 1997.

		07/05/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08
16/04/08	T_{eq} ($^{\circ}\text{C}$)	96,21	96,46	N/C	96,47
	t_{eq} (s)	45,95	40,79	N/C	40,41
	Ea (J/mol)	85.068,0	715.250,3	N/C	743.910,2
	$D_{\text{UHT-2}}$ (min)	0,83	0,74	N/C	0,73
07/05/08		16/04/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08
	T_{eq} ($^{\circ}\text{C}$)	96,99	97,12	N/C	97,14
	t_{eq} (s)	44,21	41,97	N/C	41,57
	Ea (J/mol)	85.068,0	570.550,2	N/C	622.650,5
09/05/08		16/04/08	07/05/08	14/05/08	04/06/08
	T_{eq} ($^{\circ}\text{C}$)	93,97	93,89	N/C	94,02
	t_{eq} (s)	38,35	40,73	N/C	36,32
	Ea (J/mol)	715.250,3	570.550,2	N/C	830.783,0
14/05/08		16/04/08	07/05/08	09/05/08	04/06/08
	T_{eq} ($^{\circ}\text{C}$)	N/C	N/C	N/C	N/C
	t_{eq} (s)	N/C	N/C	N/C	N/C
	Ea (J/mol)	N/C	N/C	N/C	N/C
04/06/08		16/04/08	07/05/08	09/05/08	14/05/08
	T_{eq} ($^{\circ}\text{C}$)	93,09	93,06	93,11	N/C
	t_{eq} (s)	28,32	29,02	27,78	N/C
	Ea (J/mol)	743.910,2	622.650,5	830.783,0	N/C
	$D_{\text{UHT-2}}$ (min)	6,86	7,03	6,73	N/C

$D_{\text{UHT-2}}$: Valor D calculado, a temperatura equivalente, a partir da fração de sobreviventes (Tabela 28) e do tempo equivalente de processo ($D = F / \gamma$; $F = t_{\text{eq}}$)

T_{eq} : Temperatura equivalente calculado ($^{\circ}\text{C}$)

t_{eq} : tempo equivalente calculado (s)

N/C: Algoritmo de determinação de T_{eq} e t_{eq} : não convergiu

Foi feita a regressão linear dos valores apresentados na Tabela 30 (Log $D_{\text{UHT-2}}$ vs. T_{eq} respectivamente), e foi encontrado um valor z de $3,98^{\circ}\text{C}$ ($R^2 = 0,977$), para o *Bacillus atrophaeus*, dentro da Unidade HTST Microthermics, Retenção 2.

Diversas interações não convergiram, talvez devido à pequena diferença de temperatura entre os processos, conforme apontado por Vieira *et al.* (2002).

Com a finalidade de comparar os resultados entre os valores D apresentados na Tabela 29 com os valores D preditos pelo modelo UHT e o os valores D obtidos com o modelo do reator de cisalhamento (Equação 53), foi construída a Tabela 31. Na coluna indicada *EPM* estão apresentados os valores obtidos através desse método, e apresentados anteriormente na Tabela 27. Os valores de D_{UHT-1} foram calculados usando a relação $D = F / \gamma$, onde F é o tempo equivalente (t_{eq}) e γ é a fração de sobreviventes apresentada na Tabela 27. Para o cálculo de D_{TDT} , foi usado o valor z encontrado por este método (item 5.1), e a T_{eq} . Para o cálculo de D_{modelo} foi usado o valor de T_{eq} . e o cisalhamento estimado apresentado na Tabela 6.

Tabela 31: Temperaturas e tempos equivalentes e valores D de *Bacillus atrophaeus* em água pH 6,87, para cada um dos processos realizados em unidade HTST piloto – Retenção 1. Cálculo de acordo com Swartzel, 1982 (*EPM*), e Welt *et al.*, 1997 (*PEIE*).

	<i>EPM</i>	<i>PEIE</i>				
		07/05/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08	
16/04/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	98,06°C/ 48,28s	N/C	98,32°C/ 43,99s	98,22°C/ 46,35s	98,17°C/ 47,31s
	D_{UHT-1}	1,63 min	N/C	1,48 min	1,56 min	1,60 min
	D_{TDT}	9,97 min	N/C	9,48 min	9,66 min	9,76 min
	D_{modelo}	2,83 min	N/C	2,65 min	2,72 min	2,75 min
	<i>EPM</i>	<i>PEIE</i>				
		16/04/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08	
07/05/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	98,31°C/ 46,40s	N/C	98,46°C/ 43,40s	98,41°C/ 44,95s	98,39°C/ 45,46s
	D_{UHT-1}	1,12 min	N/C	1,05 min	1,09 min	1,10 min
	D_{TDT}	9,50 min	N/C	9,22 min	9,31 min	9,35 min
	D_{modelo}	2,65 min	N/C	2,55 min	2,59 min	2,60 min

Continuação Tabela 31

	EPM	PEIE				
		16/04/08	07/05/08	14/05/08	04/06/08	
09/05/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	95,45°C/ 48,04s	95,61°C/ 45,27s	95,64°C/ 44,26s	N/C	N/C
	D_{UHT-1}	6,33 min	5,96 min	5,83 min	N/C	N/C
	D_{TDT}	16,57 min	16,06 min	15,97 min	N/C	N/C
	D_{modelo}	5,50 min	5,28 min	5,24 min	N/C	N/C
14/05/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	EPM	16/04/08	07/05/08	09/05/08	04/06/08
			94,60°C/ 47,73s	94,69°C/ 46,35s	94,71°C/ 46,13s	N/C
	D_{UHT-1}	5,30 min	5,14 min	5,12 min	N/C	4,70 min
	D_{TDT}	19,56 min	19,22 min	19,14 min	N/C	18,74 min
	D_{modelo}	6,81 min	6,66 min	6,63 min	N/C	6,44 min
04/06/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	EPM	16/04/08	07/05/08	09/05/08	14/05/08
			95,31°C/ 51,17s	95,14°C/ 48,48s	95,29°C/ 45,73s	N/C
	D_{UHT-1}	3,49 min	3,31 min	3,12 min	N/C	1,85 min
	D_{TDT}	17,03 min	17,60 min	17,10 min	N/C	14,95 min
	D_{modelo}	5,31 min	5,54 min	5,33 min	N/C	4,47 min

$T_{eq} \times t_{eq}$: Processo equivalente, calculado de acordo com o método indicado

D_{UHT-1} : Valor D, à temperatura T_{eq} , calculado a partir do número de sobreviventes e do tempo de processo ($D = \gamma / F$; $F = t_{eq}$)

D_{TDT} : Valor D à temperatura T_{eq} , calculado de acordo com o modelo TDT

D_{modelo} : Valor D, à temperatura T_{eq} , calculado de acordo com o modelo encontrado com o Reator de Cisalhamento, considerando o cisalhamento aplicado na Retenção 1.

Calculando o erro percentual entre os valores D preditos pelos modelos (D_{TDT} e D_{modelo}) e o valor D_{UHT-1} encontrado, verifica-se que o D_{modelo} aproxima-se muito mais dos valores D_{UHT-1} do que os valores calculados pelo modelo TDT (em pelo menos uma ordem de grandeza). Os erros foram calculados de acordo com a Equação 54 e estão apresentados na Tabela 32.

$$\text{Equação 54} \quad \text{Erro}(\%) = 100 \cdot \frac{D_{modelo} - D_{UHT-1}}{D_{UHT-1}}$$

Tabela 32: Erro médio entre o valor D_{UHT-1} e o valores D_{TDT} e D_{Reator} preditos conforme modelos matemáticos encontrados – Retenção 1.

	Data do experimento				
	16/04/2008	07/05/2008	09/05/2008	14/05/2008	04/06/2008
Erro % D_{TDT}	520%	758%	168%	279%	423%
Erro % D_{modelo}	75%	138%	-12%	31%	63%

Os mesmos parâmetros foram calculados com relação à seção retenção 02, e os resultados estão apresentados na Tabela 33, a seguir.

Tabela 33: Temperaturas e tempos equivalentes e valores D para cada um dos processos realizados em unidade HTST piloto – Retenção 2. Cálculo de acordo com Swartzel, 1982 (EPM), e Welt *et al.*, 1997 (PEIE).

	EPM	PEIE				
		07/05/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08	
16/04/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	96,19°C/ 46,00s	96,21°C/ 45,95s	96,46°C/ 40,79s	N/C	96,47°C/ 40,41s
	D_{UHT-2}	0,83 min	0,83 min	0,74 min	N/C	0,73 min
	D_{TDT}	14,35 min	14,29 min	13,61 min	N/C	13,59 min
	D_{modelo}	4,71 min	4,69 min	4,40 min	N/C	4,39 min
	EPM	PEIE				
		16/04/08	09/05/08	14/05/08	04/06/08	
07/05/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	96,98°C/ 44,25s	96,99°C/ 44,21s	97,12°C/ 41,97s	N/C	97,14°C/ 41,57s
	D_{UHT-2}	0,78 min	0,78 min	0,74 min	N/C	0,74 min
	D_{TDT}	12,30 min	12,28 min	11,97 min	N/C	11,93 min
	D_{modelo}	3,85 min	3,84 min	3,72 min	N/C	3,70 min
	EPM	PEIE				
		16/04/08	07/05/08	14/05/08	04/06/08	
09/05/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	93,57°C/ 45,70s	93,97°C/ 38,35s	93,89°C/ 40,73s	N/C	94,02°C/ 36,32s
	D_{UHT-2}	4,29 min	3,60 min	3,82 min	N/C	3,41 min
	D_{TDT}	23,90 min	22,11 min	22,46 min	N/C	21,89 min
	D_{modelo}	8,87 min	8,01 min	8,17 min	N/C	7,91 min
	EPM	PEIE				
		16/04/08	07/05/08	09/05/08	14/05/08	
04/06/08	$T_{eq} \times t_{eq}$	92,91°C/ 30,76s	93,09°C/ 28,32s	93,06°C/ 29,02s	93,11°C/ 27,78s	N/C
	D_{UHT-2}	7,45 min	6,86 min	7,03 min	6,73 min	N/C
	D_{TDT}	27,18 min	26,24 min	26,40 min	26,14 min	N/C
	D_{modelo}	10,81 min	10,33 min	10,41 min	10,28 min	N/C

$T_{eq} \times t_{eq}$: Processo equivalente, calculado de acordo com o método indicado

D_{UHT-2} : Valor D, à temperatura T_{eq} , calculado a partir do número de sobreviventes e do tempo de processo ($D = \gamma / F$; $F = t_{eq}$)

D_{TDT} : Valor D à temperatura T_{eq} , calculado de acordo com o modelo TDT

D_{modelo} : Valor D, à temperatura T_{eq} , calculado de acordo com o modelo encontrado com o Reator de Cisalhamento, considerando o cisalhamento aplicado na Retenção 1.

Tabela 34: Erro médio entre valor D_{UHT-2} e os valores D_{TDT} e D_{Reator} preditos conforme modelos matemáticos encontrados – Retenção 2.

	Data do experimento			
	16/04/2008	07/05/2008	09/05/2008	04/06/2008
Erro % D_{TDT}	1688%	1495%	500%	278%
Erro % D_{modelo}	482%	397%	119%	49%

Embora os resultados indicados na Tabela 34 indiquem que houve um erro superior na predição do valor D na etapa Retenção 2, este erro também é uma ordem de grandeza menor que o erro causado pelo uso do método TDT. Isso poderia significar processos térmicos dez vezes menores, com implicações econômicas significativas.

Os valores D dentro da etapa Retenção 2 são menores do que o predito pela cinética verificada na etapa Retenção 1, conforme pode ser visto na Figura 14.

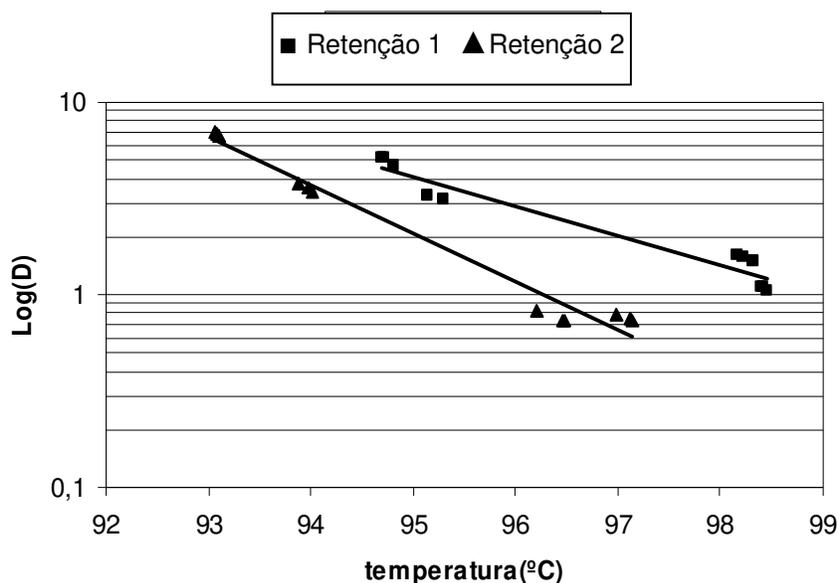


Figura 14: Curvas fantasma de *Bacillus atrophaeus* em suspensão aquosa pH 6,87, para as seções Retenção 1 e Retenção 2 da Unidade piloto HTST, com as respectivas retas de regressão linear.

Aparentemente, há um efeito *cumulativo* da temperatura, cisalhamento e tempo de exposição sobre os esporos de *B. atrophaeus*, que pode ter causado a redução observada na resistência em Retenção 2, pois, ao entrar nesta etapa, os

esporos já percorreram toda a Retenção 1, sob alta temperatura e tensão de cisalhamento, tornando-os mais sensíveis.

Esse efeito também pode ser visto ao comparar a Figura 15 e a Figura 17, que apresentam, respectivamente, a Comparação entre a curva fantasma UHT-Retenção 1 e os valores preditos pelo modelo do reator de cisalhamento e a Comparação entre a curva fantasma UHT-Retenção 2 e os valores preditos pelo modelo do reator de cisalhamento.

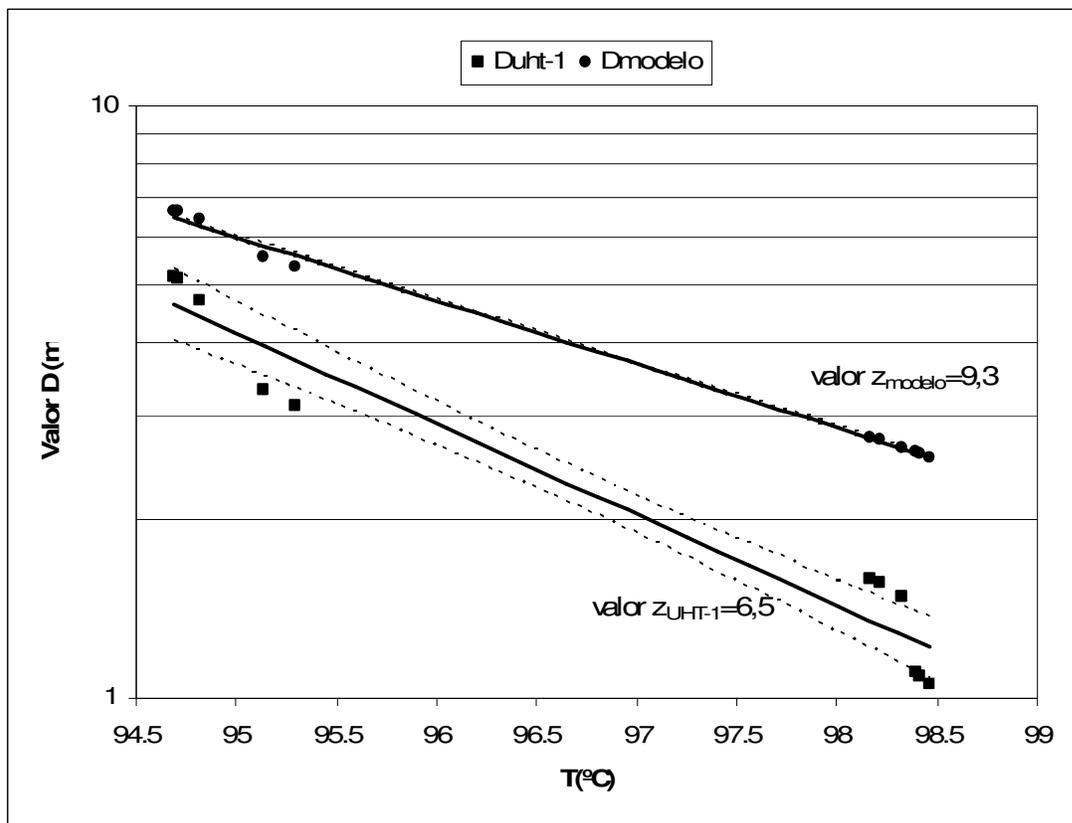


Figura 15: Comparação entre a curva fantasma em unidade UHT e a curva fantasma predita pelo modelo do Reator de Cisalhamento, na Retenção 1, com as respectivas retas de regressão linear e intervalos de confiança (10%). Dados de $T_{eq} \times t_{eq}$ estimados por PEIE (Welt *et al.*, 1997)

Como pode ser visto na Figura 15 (Retenção 1), as inclinações das curvas fantasmas são significativamente diferentes entre si, ao nível de 10% de

confiança. Porém, embora as inclinações sejam significativamente diferentes, os valores absolutos de D preditos pelo modelo encontram muito mais próximos aos valores de DUHT-1 do que os valores preditos pelo modelo TDT, conforme apresentado na Tabela 31. Isso fica claro ao comparar graficamente os três modelos, como apresentado na Figura 16, onde fica evidente como o modelo que inclui o cisalhamento se aproxima muito mais dos resultados experimentais que o modelo TDT.

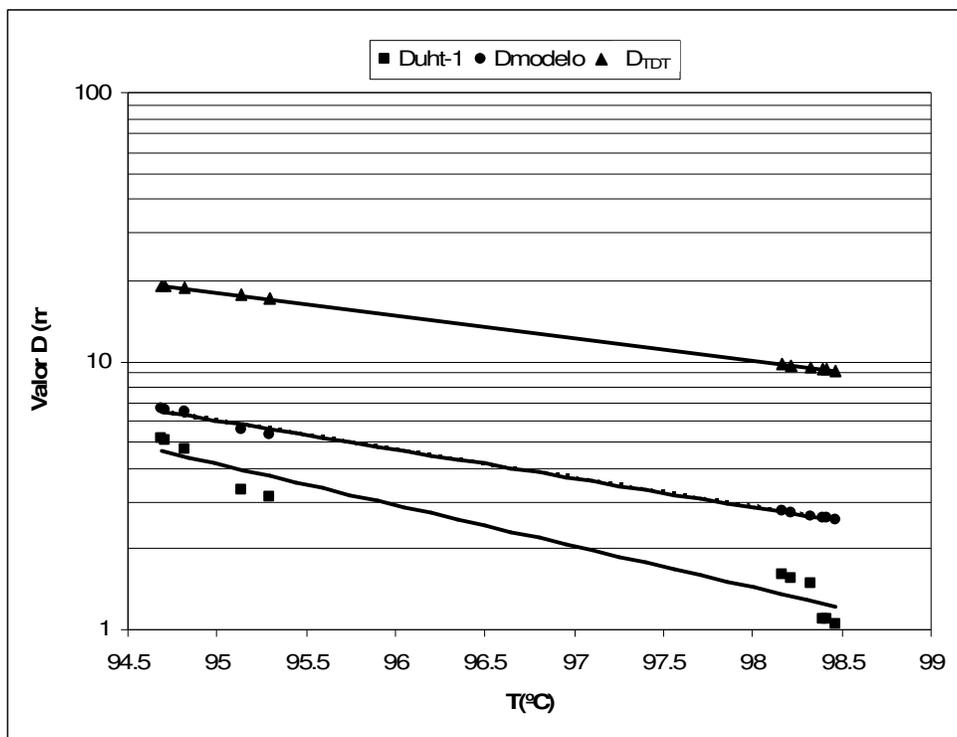


Figura 16: Comparação entre curvas fantasmas: (n) em unidade UHT (Retenção 1), (l) predita pelo modelo do Reator de Cisalhamento, e (▲) predita pelo modelo TDT, com as respectivas retas de regressão linear. Dados de $T_{eq} \times t_{eq}$ estimados por PEIE (Welt et al., 1997)

Diferenças tão significativas no valor D, como essas apresentadas na Figura 16, podem levar a tratamentos térmicos muito mais intensos que o efetivamente necessário para reduzir a população do microrganismo a níveis aceitáveis, como numa pasteurização, por exemplo.

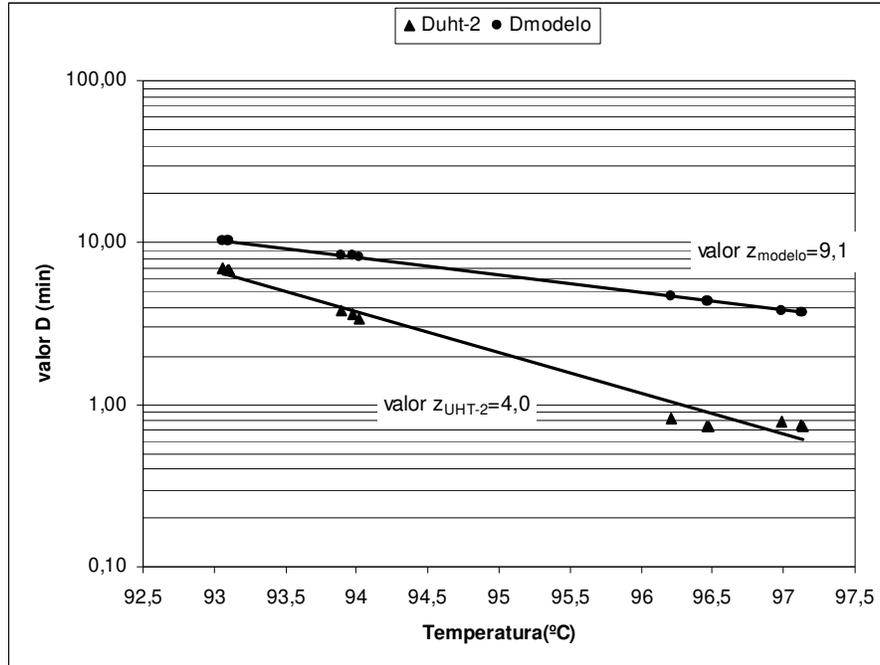


Figura 17: Comparação entre a curva fantasma em unidade UHT e a curva fantasma predita pelo modelo do Reator de Cisalhamento, na Retenção 2, com as respectivas retas de regressão linear. Dados de $T_{eq} \times t_{eq}$ estimados por *PEIE (Welt et al., 1997)*

Já na Figura 17 (Retenção 2), pode-se observar que há uma diferença significativa entre as inclinações das curvas fantasmas, o que é indicativo de que, com o aumento do tempo de residência, os valores do valor D_{UHT} distanciam-se apreciavelmente dos valores preditos pelo modelo. Possivelmente, existem outros fatores além da tensão de cisalhamento que reduzem a dependência da temperatura na unidade de sistema contínuo em tempo de residência maiores, como a magnitude da tensão de cisalhamento, o tempo de exposição e o histórico prévio de cisalhamento, como reportado por *Yeleswarapu et al. (1995)*.

5.5. Análise estatística: Comparação entre os parâmetros de resistência térmica obtidos pelos três métodos

Na Figura 18 estão apresentados todos os valores experimentais obtidos.

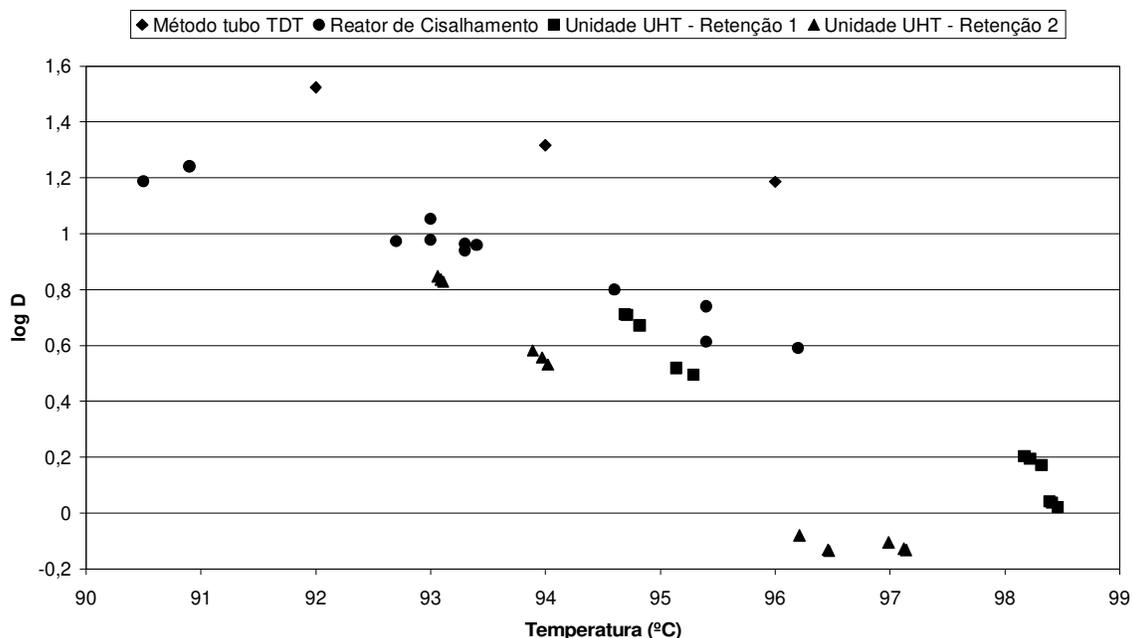


Figura 18: Dados experimentais de valores de D obtidos com *B. atrophaeus* - tubos TDT (◆), no Reator de Cisalhamento (●), na unidade UHT – Retenção 1 (■) e na unidade UHT – Retenção 2 (▲)

Ao realizar a regressão linear dos dados obtidos para os ensaios em tubos TDT, apresentados na Tabela 7 (Log (D) x T), obtém-se os seguintes parâmetros estatísticos:

Tabela 35: Parâmetros estatísticos da regressão linear com log de valores D de *B. atrophaeus* vs. temperatura em tubos TDT

<i>Estatística de regressão</i>		
<i>R-Quadrado</i>	0,983	
	Coeficientes	Erro padrão
Linear (b_{TDT})	9,285	1,0313
Angular (m_{TDT})	-0,085	0,0110
Valor z	11,8	1,56

Como apresentado no item 5.3.3, a análise dos resultados do Delineamento Composto Completo Rotacional no Reator de Cisalhamento indicou que a taxa de

cisalhamento tem influência sobre a resistência térmica do microrganismo. Por este motivo, não é válido realizar a regressão linear dos resultados obtidos no Reator de Cisalhamento a diferentes tensões de cisalhamento. Entretanto, é possível fazer tal análise se forem considerados somente os resultados obtidos a uma mesma tensão de cisalhamento. Foi então escolhida a tensão de cisalhamento igual a 4,91 Pa, na qual foram realizados 6 experimentos. Esses dados estão apresentados na Tabela 36, e os parâmetros estatísticos da regressão linear do Log do Valor D contra a temperatura são apresentados na Tabela 37.

Na Figura 19, os dados utilizados estão representados como (●), e os dados obtidos a outras tensões de cisalhamento estão apresentados como (○).

Tabela 36: Dados obtidos no Reator de Cisalhamento em ensaios de determinação de valor D de *B. atrophaeus*, usados para a regressão linear (cisalhamento: 4,91 Pa)

Temperatura (°C)	Valor D (min)	Log D
90,5	15,4	1,19
96,2	3,9	0,59
93,4	9,1	0,96
93,3	8,7	0,94
93,3	9,2	0,96
93,0	9,5	0,98

Tabela 37: Parâmetros estatísticos da regressão linear dos dados obtidos em ensaios de determinação de valor D de *B. atrophaeus*, no Reator de Cisalhamento (cisalhamento: 4,91 Pa)

<i>Estatística de regressão</i>		
$R^2 = 0,976$	Coeficientes	Erro padrão
Linear ($b_{\text{Reator de Cisalhamento}}$)	10,721	0,8512
Angular ($m_{\text{Reator de Cisalhamento}}$)	-0,105	0,0091
Valor z	9,5	0,84

Na Tabela 38 e na Tabela 39 estão apresentados os dados experimentais obtidos na unidade HTST-Retenção 1 e os parâmetros estatísticos da regressão linear, respectivamente. Os dados experimentais obtidos na unidade HTST-Retenção 2 e os parâmetros estatísticos de sua regressão são apresentados na Tabela 40 e na Tabela 41, respectivamente.

Tabela 38: Dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de *B. atrophaeus* - Retenção 1 (cisalhamento: 1,9 Pa). Dados de T_{eq} e D estimados por PEIE (Welt *et al.*, 1997).

Temperatura (°C)	Valor D (min)	Log D
98,32	1,5	0,17
98,22	1,6	0,19
98,17	1,6	0,20
98,46	1,1	0,02
98,41	1,1	0,04
98,39	1,1	0,04
94,69	5,1	0,71
94,71	5,1	0,71
94,82	4,7	0,67
95,14	3,3	0,52
95,29	3,1	0,49

Tabela 39: Parâmetros estatísticos da regressão linear dos dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de *B. atrophaeus* - Retenção 1 (cisalhamento: ~1,9 Pa)

<i>Estatística de regressão</i>		
$R^2 = 0,947$	Coefficientes	Erro padrão
Linear ($b_{retenção\ 1}$)	15,179	1,1699
Angular ($m_{retenção\ 1}$)	-0,153	0,0121
Valor z	6,5	0,52

Tabela 40: Dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de *B. atrophaeus* - Retenção 2 (cisalhamento: ~0,67 Pa). Dados de T_{eq} e D estimados por PEIE (Welt *et al.*, 1997)

Temperatura (°C)	Valor D (min)	Log D
96,2	0,8	-0,08
96,5	0,7	-0,13
96,5	0,7	-0,14
97,0	0,8	-0,11
97,1	0,7	-0,13
97,1	0,7	-0,13
94,0	3,6	0,56
93,9	3,8	0,58
94,0	3,4	0,53
93,1	6,9	0,84
93,1	7,0	0,85
93,1	6,7	0,83

Tabela 41: Parâmetros estatísticos da regressão linear dos dados obtidos na unidade UHT em ensaios de determinação de valor D de *B. atrophaeus* - Retenção 2 (cisalhamento: ~0,67 Pa)

<i>Estatística de regressão</i>		
$R^2 = 0,976$	Coeficientes	Erro padrão
Linear ($b_{retenção\ 2}$)	24,170	1,1720
Angular ($m_{retenção\ 2}$)	-0,251	0,0123
Valor z	4,0	0,20

A seguir, na Figura 19, são apresentadas as curvas obtidas por regressão linear dos pontos experimentais apresentados na Figura 18.

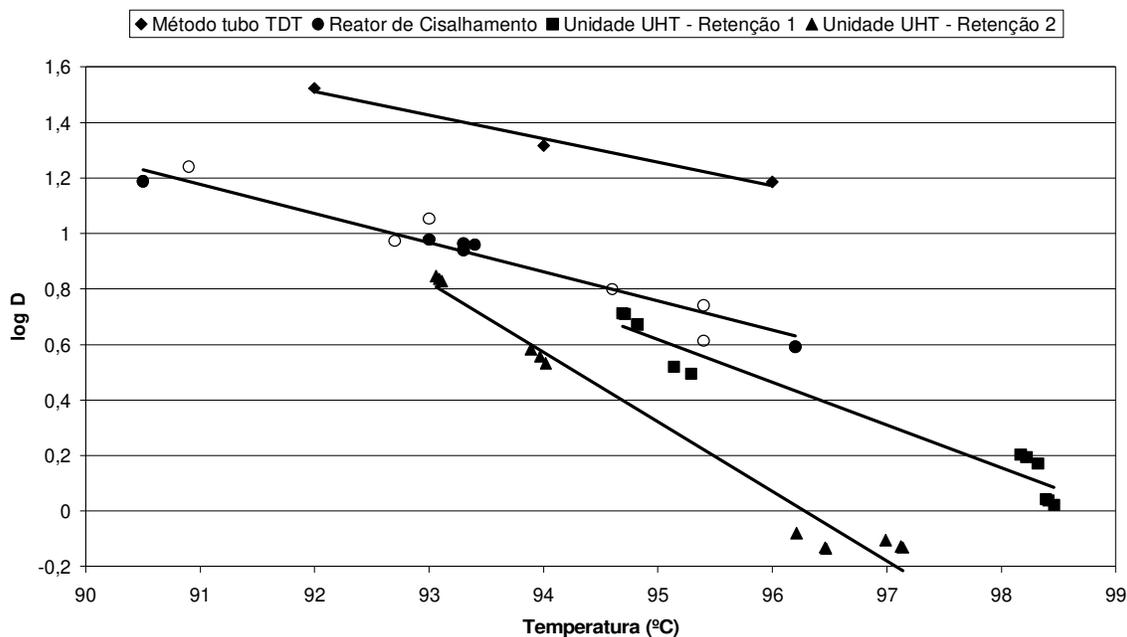


Figura 19: Dados experimentais de valores de D obtidos com *B. atrophaeus* - tubos TDT (◆); no Reator de Cisalhamento (●) a 4,91Pa; no Reator de Cisalhamento (○)-demais cisalhamentos; na unidade UHT – Retenção 1 (■) e na unidade UHT – Retenção 2 (▲), com as respectivas retas de regressão linear.

Aplicando o teste “t”, de Student, é possível verificar a diferença estatística entre cada um dos parâmetros obtidos (inclinação e interceptão) de cada uma das regressões lineares realizadas. As comparações foram realizadas entre cada par de coeficientes, e estão apresentadas nas próximas seções.

5.5.1. Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{TDT}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{reator}} \times \text{Temperatura}$

Nesta análise, foram usados os valores apresentados na Tabela 35 e na Tabela 37.

De acordo com o método apresentado por Zar (1999), o valor dos coeficientes angulares (m_{TDT} e $m_{\text{Reator de Cisalhamento}}$) não são significativamente diferentes ($p = 0,246$). Porém, a análise estatística indicou que os coeficientes lineares (b_{TDT} e $b_{\text{Reator de Cisalhamento}}$) são significativamente diferentes ($p =$

0,0000023). Isso significa que, embora não se possa afirmar que os valores z encontrados sejam diferentes, os valores D obtidos no experimento no Reator de Cisalhamento são significativamente mais baixos, indicando que a taxa de cisalhamento de 4,91Pa de fato reduziu a resistência térmica, mas não afetou a taxa de sua dependência da temperatura.

5.5.2. Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{TDT}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 1}} \times \text{Temperatura}$

Nesta análise, foram usados os valores apresentados na Tabela 35 e na Tabela 39.

O valor dos coeficientes angulares (m_{TDT} e $m_{\text{UHT Retenção-1}}$) são significativamente diferentes ($p = 0,00124$). Isso significa que os valores z são significativamente diferentes, e o processo dentro da unidade UHT causa uma redução tanto nos valores D como no valor z , isto é, a resistência térmica do microrganismo é mais baixa, e sua dependência da temperatura é afetada, tornando-se maior.

Isto confirma a teoria de que valores D e z obtidos pelo método TDT não devem ser usados para representar a cinética de destruição térmica em sistemas contínuos.

5.5.3. Comparação entre as regressões lineares feitas com $\text{Log } D_{\text{TDT}} \times \text{Temperatura}$ e $\text{Log } D_{\text{UHT Retenção 2}} \times \text{Temperatura}$

Nesta análise, foram usados os valores apresentados na Tabela 35 e na Tabela 41.

O valor dos coeficientes angulares (m_{TDT} e $m_{\text{UHT-Retenção 2}}$) são significativamente diferentes ($p = 0,0000003$). Isso significa que os valores z são

significativamente diferentes, e o processo dentro da unidade UHT causa redução tanto nos valores D como no valor z, isto é, a resistência térmica do microrganismo é mais baixa, e sua dependência da temperatura é afetada, tornando-se maior.

Novamente se confirma a teoria de que valores D e z obtidos pelo método TDT não devem ser usados para representar a cinética de destruição térmica em sistemas contínuos.

5.5.4. Comparação entre as regressões lineares feitas com Log D_{reator} x Temperatura e Log $D_{\text{UHT Retenção 2}}$ x Temperatura

Nesta análise, foram usados os valores apresentados na Tabela 37 e na Tabela 41.

O valor dos coeficientes angulares ($m_{\text{Reator de Cisalhamento}}$ e $m_{\text{UHT-Retenção 2}}$) são significativamente diferentes ($p = 0,000014$). Isso significa que os valores z são significativamente diferentes, e o processo dentro da unidade UHT causa redução tanto nos valores D como no valor z, isto é, a resistência térmica do microrganismo é mais baixa, e sua dependência da temperatura é afetada, tornando-se maior.

5.5.5. Comparação entre as regressões lineares feitas com Log $D_{\text{UHT Retenção 1}}$ x Temperatura e Log $D_{\text{UHT Retenção 2}}$ x Temperatura

Nesta análise, foram usados os valores apresentados na Tabela 39 e na Tabela 41.

Foi verificado que o valor dos coeficientes angulares ($m_{\text{Reator de Cisalhamento}}$ e $m_{\text{UHT-Retenção 2}}$) são significativamente diferentes ($p = 0,0000187$). Esse resultado em particular indica que os mesmos esporos apresentam resistências térmicas

diferentes; tal fato chama a atenção principalmente por que, ao longo destas duas etapas subseqüentes, a temperatura cai, sendo mais baixa na Retenção 2 do que na etapa Retenção 1. Isso, aliado ao fato de o cisalhamento na Retenção 2 (0,67Pa) ser menor que na Retenção 1 (1,94Pa), vai contra os resultados experimentais, segundo os quais na Retenção 2 a taxa de inativação do microrganismo foi maior que na Retenção 1.

Isso leva a crer que ocorre algum tipo de efeito cumulativo do tratamento térmico e do cisalhamento, tornando os esporos de *B. atrophaeus* mais frágeis a esses fatores na etapa final.

5.5.6. Regressão linear com dados Log D_{reator} x Temperatura e Log $D_{UHT\ Reten\ 1}$ x Temperatura

Aparentemente, de acordo com a Figura 19, as curvas representadas pelos dados obtidos no Reator de Cisalhamento (Tabela 36) e na Retenção 1 (Tabela 38) fazem parte de uma única curva, como pode ser visto na Figura 20.

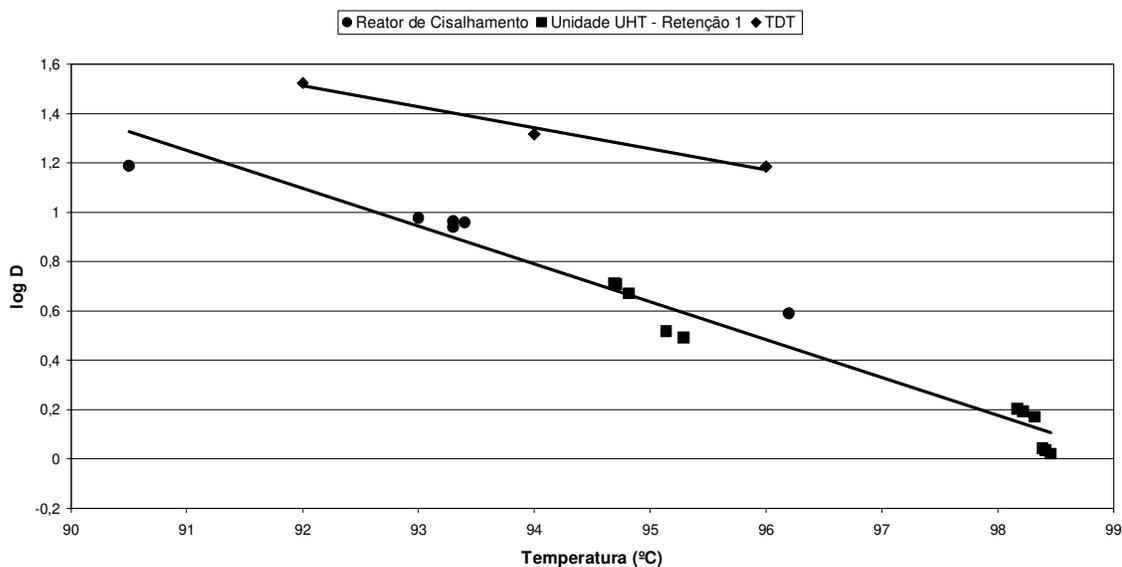


Figura 20: Curva fantasma construída com os dados experimentais (Log do valor D) obtidos com *B. atrophaeus* no Reator de Cisalhamento (●) a 4,91Pa, na unidade UHT – Retenção 1 (■) com curva de regressão linear obtida, e pelo método de tubos TDT (u)

O resultado da regressão linear feita com todos esses dados obtidos, como se fizessem parte de um único conjunto de dados, à semelhança do procedimento adotado por Vieira *et al.* (2002), é apresentado na Tabela 42 a seguir:

Tabela 42: Regressão linear realizada com os dados experimentais obtidos nos ensaios para obtenção do valor D, no reator de cisalhamento e na Unidade UHT piloto – Retenção 1

<i>Estatística de regressão</i>		
$R^2 = 0,958$	Coefficientes	Erro padrão
Linear ($D_{\text{retenção 1}}$)	15,179	0,7898
Angular ($m_{\text{retenção 1}}$)	-0,153	0,0083
Valor z	6,5	0,35

Como pode ser verificado na Tabela 42, a regressão desses dois conjuntos de dados resulta numa regressão com alto valor de R^2 , e baixos valores de erro padrão para os parâmetros obtidos. Também pode ser visto que a curva fantasma obtida é consistentemente diferente da curva para o método TDT, que resultou em valores D e z superiores, indicando maior resistência térmica.

Fairchild *et al.* (1994) reportaram que os valores D de *Listeria monocytogenes* eram menores em sistemas contínuos do que em sistemas batelada (tubos capilares). Porém, estes resultados discordam daqueles encontrados por Burton *et al.* (1977), que somente verificaram este efeito (valores D_{TDT} inferiores a D_{UHT}) em temperaturas acima de 145°C. É necessário chamar a atenção ao fato de Burton *et al.* (1977) terem trabalhado com *B. stearothermophilus*, um microrganismo termófilo, enquanto que, no presente

trabalho e no trabalho de Fairchild *et al.* (1994), foram usados microrganismos mesófilos.

Um resumo dos resultados está apresentado na Tabela 43, a seguir:

Tabela 43: Resumo da análise estatística

	Reator de Cisalhamento	UHT-Retenção 1	UHT- Retenção 2
TDT	Inclinação (m) não é significativamente diferente ($p > 0,05$) Intercepção (b) significativamente diferente: Retas paralelas; Valores D_{TDT} mais altos que valores $D_{\text{Reator de Cisalhamento}}$ - Z igual	Inclinação (m) significativamente diferente: valores D_{TDT} mais altos, valor Z_{TDT} maior	Inclinação (m) significativamente diferente: valores D_{TDT} mais altos, valor Z_{TDT} maior
Reator de Cisalhamento		Regressão linear conjunta resultou significativa, indicando que o modelo obtido no reator é capaz de descrever a inativação de esporos de <i>B. atrophaeus</i> na Retenção 1	Inclinação (m) significativamente diferente: valores D_{TDT} mais altos, valor Z_{TDT} maior
UHT- Retenção 1			Inclinação (m) significativamente diferente: valores D_{TDT} mais altos, valor Z_{TDT} maior (efeito de acumulação)

5.6. Considerações finais

Os dados apresentados na Tabela 28 indicam que o efeito de inativação prossegue atuando sobre os esporos em sua passagem pela Retenção 2, mesmo a temperaturas e taxas de cisalhamento mais baixas. Este fato indica que não pode ser considerado o efeito isolado de apenas uma etapa do processo térmico, pois aparentemente o esporo sofre efeito cumulativo de fatores físicos de estresse. Yeleswarapu *et al.* (1995) indicaram a mesma conclusão, ao pesquisar a taxa de hemólise devido a tensões de cisalhamento.

É importante indicar que os valores experimentais de D obtidos no reator de cisalhamento foram significativamente menores que os valores preditos às mesmas temperaturas, segundo o modelo TDT obtido a partir dos dados experimentais, como indicado na Tabela 44. Isso comprova que os resultados de determinação de resistência térmica por métodos em batelada (tubos TDT) não devem ser usados para o desenho de processos térmicos contínuos.

Tabela 44: Comparação entre os valores experimentais de D_{reator} e valores calculados de D_{TDT} (segundo o modelo TDT encontrado)

Tensão de cisalhamento (Pa)	Temperatura experimental (°C)	D_{reator} (min)	D_{TDT} calculado (min)	redução observada na resistência (%)
1,4	90.9	17.4	40.20	57.4%
8,4	94.6	6.3	19.53	68.6%
1,4	95.4	5.5	16.70	68.3%
8,4	95.4	4.1	16.70	76.3%
0	93.0	11.3	26.68	58.6%
9,82	92.7	9.4	28.29	67.7%
4,91	90.5	15.4	47.92	65.1%
4,91	96.2	3.9	14.86	73.5%
4,91	93.4	9.1	24.68	64.0%
4,91	93.3	8.7	25.17	66.4%
4,91	93.3	9.2	25.17	64.4%
4,91	93.0	9.5	26.68	65.1%

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Bulut *et al.* (1999), que também reportaram redução na resistência de microrganismo. Porém, até o momento, este efeito não havia sido sistematicamente pesquisado, como no presente trabalho.

6. Conclusões

A aplicação de tensão de cisalhamento causou redução na resistência térmica de *Bacillus atrophaeus*; valores de $\sigma = 4,91\text{Pa}$ foram suficientes para reduzir o valor D esperado em até 73,5%.

O uso de parâmetros de resistência térmica obtidos em tubos TDT não devem ser usados para o desenho de processos térmicos contínuos, pois levarão a erros e sobreprocessamento. Em seu lugar, devem ser usados métodos que levem em consideração as forças de cisalhamento atuantes nesse tipo de sistema, como o desenvolvido no presente trabalho.

Com o dispositivo relativamente simples desenvolvido no presente trabalho, é possível simular os efeitos das forças físicas de cisalhamento da tubulação de sistemas de processamento térmico de fluxo contínuo sobre microrganismos contaminantes.

Porém, como foi verificado, o modelo encontrado no reator não foi capaz de prever completamente a inativação ocorrida no interior da unidade piloto HTST – Microthermics em toda a sua extensão. Contudo, ficou claro que o modelo obtido predisse os valores de resistência térmica de *Bacillus atrophaeus*, com grau de precisão muito maior, nas condições verificadas na unidade HTST Piloto, do que o modelo TDT determinado experimentalmente para este mesmo microrganismo.

7. Sugestões

O próximo passo, a ser executado em pesquisas futuras, será desenhar e construir um sistema de cisalhamento que suporte a aplicação de temperaturas de esterilização, e desenhar processos térmicos (por ora, a T de pasteurização), a serem aplicados em sistemas industriais, baseados no resultado da avaliação da resistência térmica de um microrganismo que seja de interesse da indústria.

Com o equipamento ora construído, também apresenta-se a possibilidade de estudos da resistência de outros microrganismos, a fim de se verificar se o efeito observado na presente pesquisa se repete.

Por fim, como foram comprovados os efeitos do cisalhamento sobre a morte térmica do microrganismo, processos industriais completamente novos podem ser desenvolvidos, a fim de se tirar proveito de tais efeitos.

8. Bibliografia

- Arnaud, J.P.; Lacroix, C.; Fousereau, C.; Choplin, L. Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, **Journal of Biotechnology**, V.29(1-2), p.157-175. 1993.
- Ball, C.O. Mathematical solution of problems on thermal processing of canned food. Univ. California (Berkeley). **Publications in Public Health**, 1(12), p.15-245. 1928
- Bigelow, W.D.; Esty, J.R. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms, **Journal of Infectious Diseases**, 27, p.602-617. 1920.
- Bradshaw, J.G.; Peeler, J.T.; Corwin, J.J.; Hunt, J.M.; Tierney, J.T.; Larkin, E.P.; Twelds, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk, **Journal of Food Protection**, 48, p.743-745. 1985.
- Bulut, S.; Waites, W.M.; Mitchell, J.R. Effects of Combined Shear and Thermal Forces on Destruction of *Microbacterium lacticum*, **Applied and Environmental Microbiology**, V.65(10), p.4464-4469. 1999.
- Bunning, V.K.; Donnelly, C.W.; Peeler, J.T.; Briggs, E.H.; Bradshaw, J.G.; Crawford, R.G. Beliveau, C.M., Tierney, J.T. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes, **Applied and Environmental Microbiology**, 54, p.364-378. 1988.
- Burton, H.; Perkin, A.G.; Davies, F.L.; Underwood, H.M. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures, **Journal of Food Technology**, 12, p.149-161. 1977.
- Busta, F.F. Thermal Inactivation Characteristics of Bacterial Spores at Ultrahigh Temperature, **Applied Microbiology**, 15(3), p.640-645. 1967.
- Cheftel, H. e Thomas, G. Principles and Methods for Establishing Thermal Processes for Canned Foods. Bull. No.4, **J.J. Carnaud et Forges de Basse-Indre**, Paris, France. 1963.
- Cho, H-Y; Yousef, A.E.; Sastry, S.K. Kinetics of Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores by Continuous or Intermittent Ohmic and Conventional Heating, **Biotechnology and Bioengineering**, V. 62(3), p.368-372. 1999.

- Cohen, E.; Birk, Y.; Mannheim, C.H.; Saguy, I.S. Kinetic parameter estimation for quality change during continuous thermal processing of grapefruit juice, **Journal of Food Science**, 59(1), p.155-158. 1994.
- Daudin, J.D.; Cerf, O. The effect of thermal shock on the thermal death of spores, **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 10, p.203. 1977.
- David, J.R.D.; Merson, R.L. Kinetics parameters for inactivation of *Bacillus stearothermophilus* at high temperatures, **Journal of Food Science**, 55, p.488-493,515. 1990.
- Deindoerfer, F.H.; Humphrey, A.E. Microbiological Process Discussion – Analytical Method for Calculating Heat Sterilization Times, **Applied Microbiology**, 7, p.256-270. 1959.
- De Queiroz, G.A.; Day, D.F. Disinfection of *Bacillus subtilis* spore-contaminated surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer, **Letters in Applied Microbiology**, 46(2) , 176–180. 2008.
- Draper, N.R.; Smith, H. **Applied regression analysis**, 2nd ed., p.8-17, 169-174. Ed. por John Wiley & Sons, Inc., New York. 1981.
- Edwards Jr., J.L.; Busta, F.F.; Speck, M.L. Heat injury of *Bacillus subtilis* spores at ultrahigh temperatures. **Applied Microbiology**, 13, p.858-864. 1965a.
- Edwards Jr., J.L.; Busta, F.F.; Speck, M.L. Thermal inactivation characteristics of *Bacillus subtilis* spores at ultrahigh temperatures. **Applied Microbiology**, 13, p.851-857. 1965b.
- Esselen, W.B.; Pflug, I.J. Thermal resistance of putrefactive anaerobe no. 3679 spores in vegetables in the temperature range of 250-290°F, **Food Technology**, 10, p.557-560. 1956.
- Fairchild, T.M.; Swartzel, K.R.; Foegeding, P.M. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in skim milk in a continuous flow processing system, **Journal of Food Science**, 59(5), p.690-963. 1994.
- Fritze, D. e Pukall, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, p.35–37. 2001.
- Gava, A.J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**, 7^a edição, Ed. Nobel, São Paulo. 2002. 284p.

- Ge, L.; Dasi, L.P.; Sotiropoulos, F.; Yoganathan, A.P. Characterization of Hemodynamic Forces Induced by Mechanical Heart Valves: Reynolds vs. Viscous Stresses, *Annals of Biomedical Engineering*, 36(2), p.276–297. 2008.
- Heldman, D.R.; Lund, D.B. **Handbook of Food Engineering**, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong. 1992. 756p.
- Heldman, D.R.; Newsome, R.L. Kinetic Models for Microbial Survival During Processing, **Food Technology**, 57(8), p.40-46, 100. 2003.
- Heppel, N.J. Comparison of the residence time distributions of water and milk in an experimental UHT sterilizer, **Journal of Food Engineering**, V.4, p.71-84. 1985.
- Kelder, J.D.H.; Ptasiński, K.J.; Kerkhof, P.J.A.M. Power-law foods in continuous coiled sterilizers, **Chemical Engineering Science**, V.57, p.4605-4615. 2002.
- Kyereme, M.; Swartzel, K.R. e Farkas, B.E. New Line Intersection Procedure for the Equivalent Point Method of Thermal Evaluation, **Journal of Food Science**, 64(4), p.565-570. 1999
- Indeglia, R.A.; Shea, M.A.; Varco, R.L.; Bernstein, E.F. Mechanical and biologic considerations in erythrocyte damage, **Surgery**, V.62(1), p.47–55. 1967.
- Jung, A. e Fryer, P.J. Optimising the quality of safe food; Computational modelling of a continuous sterilisation process, **Chemical Engineering Science**, V.54(6), p.717-730. 1999.
- Lange, H.; Taillandier, P.; Riba, J.-P. Effect of high shear stress on microbial viability, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, V.76(5), p.501-505. 2001.
- Lenz, M.K.; Lund, D.B. The Lethality-Fourier Number Method: Experimental verification of a model for calculating temperature profiles and lethality in conduction-heating canned foods, **Journal of Food Science**, 42(4), p.989-996,1001. 1977.
- Leverett, L.B.; Hellums, J.D.; Alfrey, C.P.; Lynch, E.C. Red Blood Cell Damage by Shear Stress, **Biophysical Journal**, V.12, p.257-273. 1972.
- Lewis, M; Heppell, N. **Continuous Thermal Processing of Foods**, Ed. Aspen Publications, Maryland-EUA, 2000. 446p.
- Licciardello, J.J.; Nickerson, J.T.R. Some Observations on bacterial thermal death time curves, **Applied Environmental Microbiology**, V.11(6), p.476-480. 1963.

- Loss, C.R. e Hotchkiss, J.H. Determination of Thermal Inactivation Kinetics of Microorganisms with a Continuous Microflow Apparatus, **Journal of Food Protection**, V.67(11), p.2560-2564. 2004.
- Mackey, B.M.; Bratchel, N. A Review: The heat resistance of *Listeria monocytogenes*, **Letters in Applied Microbiology**, 9, p.89-94. 1989.
- Maesmans, G.; Hendrickx, M.; De Cordt, S. e Tobback, P. A critical evaluation of equivalent point method, **Journal of Food Engineering**, 24, p.225-248, 1995
- Marques, M. **Determinação dos parâmetros cinéticos de destruição térmica de *Bacillus subtilis* ATCC 9372 e *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 em soluções parenterais**, Dissertação de de Mestrado (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), 170p. 2002.
- Massaguer, P.R. **Segurança Microbiológica de Sucos e Drinks Envasados Asépticamente**, Projeto PRODETAB-EMBRAPA, Relatório Parcial Janeiro/2001 a Dezembro/2001, 2002.
- Massaguer, P.R. **Segurança Microbiológica de Sucos e Drinks Envasados Asépticamente**, Projeto PRODETAB-EMBRAPA, Relatório Parcial Janeiro/2002 a Dezembro/2002, 2003.
- Massaguer, P.R. e Pacheco, C.P. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. **Journal of Food Process Engineering**, 27(6), p.426-440. 2004.
- Mossel, D.A.A.; Corry, J.E.L.; Struijk, C.B.; Baird, R.M. **Essential of the Microbiology of Foods**, Editora John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra. 699p. 1995.
- Nunes, R.V. e Swartzel, K.R. Modeling thermal processes using the equivalent point method, **Journal of Food Engineering**, 11(2), p.103-117. 1990.
- Nunes, R.V., Swartzel, K.R. e Ollis, D.E. Thermal evaluation of food processes: the role of a reference temperature, **Journal of Food Engineering**, 20(1), p.1-15. 1993.
- Nunes, R.V. **Nonisothermal kinetic data generation and thermal evaluation and optimization**, Ph. D. dissertation, 1993 in Kyereme, M.; Swartzel, K.R. e Farkas, B.E. New Line Interserction Procedure for the Equivalent Point Method of Thermal Evaluation, **Journal of Food Science**, 64(4), p.565-570. 1999

- Odling, T.E.; Caputo, R.A.; Graham, G.S. Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* Spores. **Applied and Environmental Microbiology**, V.41(6), p.1374-1377. 1981.
- Pacheco, C.P. **Validação do Processo de Esterilização para Polpa de Tomate em Unidade UHT**, Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 154p. 2001.
- Peeler, J.T.; Reyes, A.L.; Crawford, R.G.; Wehby, A.J.; Campbell, J.E. Thermal resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* in a closed system. **Applied and Environmental Microbiology**. V.33(1), p.52-58. 1977.
- Pinto, T.J.A. **Aspectos Fundamentais na Validação do Monitor Biológico para a Esterilização por Óxido de Etileno**, Tese de Doutorado (Doutor em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), 203p. 1991.
- Pflug, I.J. Heat Sterilization. *In* **Selected Papers on the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**, 5^a ed., Editado por Pflug, I.J., p.143-159. 1988a
- Pflug, I.J. Analysis of Heating and Cooling data. *In* **Selected Papers on the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**, 5^a ed., Editado por Pflug, I.J., p.188. 1988b
- Pflug, I.J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**, 7^a ed. Editado por Environmental Sterilization Laboratory, Minneapolis, E.U.A. 1990. 480p.
- Pflug, I.J. e Esselen, W.B. Development and application of an apparatus for study of thermal resistance of bacterial spores and thiamine at temperatures above 250°F. **Food Technology**, 7, p.237–241. 1953.
- Rahn, O. Physical methods of sterilization of microorganisms, **Bacteriol. Rev.**, 9, 1. 1945.
- Ramaswamy, H. S.; Voort, F. R. Van de; Ghazala, S. An analysis of TDT and arrhenius methods for handling process and kinetic data. **Journal of Food Science**, v. 54 (5), p.1322-1326. 1989.
- Rodrigues, M.I. e Lemma, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Ed. Casa do pão, Campinas SP. 1^a edição. 2005

- Rogers, A.R. An accelerated storage test with programmed temperature rise, **J. Pharm. Pharmacol.**, 15, p.101, 1963 in Cohen, E.; Birk, Y.; Mannheim, C.H.; Saguy, I.S. Kinetic parameter estimation for quality change during continuous thermal processing of grapefruit juice, **Journal of Food Science**, 59(1), p.155-158. 1994.
- Ross, E.W. Relation of bacterial destruction to chemical marker formation during processing by thermal pulses, **Journal of Food Process Engineering**, 16, p.247-270. 1993.
- Sadegui, F.; Hamid-Samimi, M.H. e Swartzel, K.R. Micro-computer program for determining the unique time-temperature associated with the equivalent point of thermal evaluation, **Journal of Food Process and Preservation**, 10, p.331-335. 1986
- Sahoo, P.K.; Ansari, Md.I.A.; Datta, A.K. Computer-aided design and performance evaluation of an indirect type helical tube ultra-high temperature (UHT) milk sterilizer, **Journal of Food Engineering**, V.51(1), p.13-19. 2002.
- Sahoo, S.; Verma, R.K.; Suresh, A.K.; Rao, K.K.; Bellare, J.; Suraishkumar, G. K. Macro-Level and Genetic-Level Responses of *Bacillus subtilis* to Shear Stress, **Biotechnology Progress**, V.19(6), p.1689-1696. 2003.
- Sahoo, S.; Rao, K.K.; Suresh, A.K.; Suraishkumar, G. K. Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress, **Biotechnology and Bioengineering**, V87(1), p.81-89. 2004
- Steffe, J.F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2^a edição, Ed. Freeman Press, 418p.1996.
- Stumbo, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing In Food Science and Technology – A series of monographs**, Ed. Academic Press, New York and London. 236p.1965.
- Stumbo, C.R.; Murphy, J.R.; Cochran, J. Nature of thermal death time curves for P.A. 3679 and *Clostridium botulinum*, **Food Technology**, 4, p.321-326. 1950.
- Sutera, S.P. e Mehrjardi, M.H. Deformation and Fragmentation of Human Red Blood Cells in Turbulent Shear Flow, **Biophysical Journal**, V.15(1), p.1-10. 1975.
- Swartzel, K.R. A continuous flow procedure for kinetic data generation. **Journal of Food Science**, 49, p.803-806. 1984.

- Swartzel, K.R. Arrhenius Kinetics as Applied to Product Constituent Losses in Ultra High Temperature Processing, **Journal of Food Science**, 47, p.1886-1891. 1982.
- Tamega Jr., W.P. **Programa para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas de processamento térmicos contínuos de alimentos**, Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 196p. 2005.
- Tung, M.A. e Garland, T.D. Computer calculation on thermal process, **Journal of Food Science**, 43, p.365-369. 1978.
- Vieira, M.C.; Teixeira, A.A.; Silva, C.L.M. Kinetic Parameters Estimation for Ascorbic Acid Degradation in Fruit Nectar Using the Partial Equivalent Isothermal Exposures (PEIE) Method under Non-Isothermal Continuous Heating Conditions, **Biotechnol. Prog.**, 17, p.175-181. 2001.
- Vieira, M.C.; Teixeira, A.A.; Silva, F.M.; Gaspar, N.; Silva, C.L.M. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetics parameters and experimental methods, **International Journal of Food Microbiology**, 77, p.71-81. 2002.
- Yeleswapar, K.K.; Antaki, J.F.; Kameneva, M.V.; Rajagopal, K.R. A mathematical model for shear-induced hemolysis. **Artificial Organs**, V.19(7), p.576-582. 1995.
- Wang, D.I.; Scharer, J.; Humphrey, A.E. Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures, **Applied Microbiology**, 12, p.451-454. 1964.
- Welt, B.A.; Teixeira, A.A.; Balaban, M.O.; Smerage, G.H.; Sage, D.S. Iterative Method for Kinetic Parameter Estimation from Dynamic Thermal Treatments, **Journal of Food Science**, 62(1), p.8-14. 1997.
- Wescott, G.G.; Fairchild, T.M.; Foegeding, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spores inactivation in batch and continuous flow systems, **Journal of Food Science**, 60(3), p.446-450. 1995.
- Zar, J.H. **Biostatistical analysis**, 4ª edição, Ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, EUA. 930p. 1999.

9. Anexos

9.1. Anexo 01 – Resultados dos experimentos realizados para determinação do índice de redução decimal:

9.1.1. Método do tubo TDT

Tabela 45: Contagem de sobreviventes em tubo TDT - Ensaio a 92°C, com *B.atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
0' (lag)	-7	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-8	44	49	45	4,60E+09	2,65E+08
	-9	5	4	1	3,33E+09	2,08E+09
26'	-6	274	246	255	2,58E+08	1,43E+07
	-7	18	15	18	1,70E+08	1,73E+07
	-8	2	6	2	3,33E+08	2,31E+08
39'	-5	269	245	269	2,61E+07	1,39E+06
	-6	24	30	33	2,90E+07	4,58E+06
	-7	2	3	8	4,33E+07	3,21E+07
52'	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	30	47	42	3,97E+05	8,74E+04
	-5	2	1	8	3,67E+05	3,79E+05
65'	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	104	139	104	1,16E+07	2,02E+06
75'	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	293	317	278	2,96E+06	1,97E+05
88'	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	289	312	257	2,86E+06	2,76E+05

Tabela 46: Contagens de sobreviventes em tubo TDT usados para calcular o valor $D_{92^{\circ}\text{C}}$

tempo (min)	$D_{92^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
26	2,58E+08	8,41
39	2,61E+07	7,42
65	1,16E+07	7,06
75	2,96E+06	6,47
88	2,86E+06	6,46
$D_{92^{\circ}\text{C}} = 33,41 \text{ min}$		
$R^2 = 0,90$		

Tabela 47: Contagem de sobreviventes em tubo TDT - Ensaio a 94°C, com *B.atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
0' (lag)	-6	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-7	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-8	161	170	192	1,74E+10	1,59E+09
10'	-6	252	211	197	2,20E+08	2,86E+07
	-7	49	31	28	3,60E+08	1,14E+08
	-8	7	2	2	3,67E+08	2,89E+08
20'	-5	363	433	300	3,65E+07	6,65E+06
	-6	47	36	30	3,77E+07	8,62E+06
	-7	3	6	2	3,67E+07	2,08E+07
30'	-4	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	110	113	90	1,04E+07	1,25E+06
	-6	10	14	12	1,20E+07	2,00E+06
40'	-4	36	29	31	3,20E+05	3,61E+04
	-5	5	6	2	4,33E+05	2,08E+05
	-6	1	< 1	< 1	3,33E+05	-
50'	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	173	180	186	1,80E+06	6,51E+04
	-5	24	13	22	1,97E+06	5,86E+05
60'	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	101	116	95	1,04E+06	1,08E+05

Tabela 48: Contagens de sobreviventes em tubo TDT usados para calcular o valor $D_{94^{\circ}\text{C}}$

tempo (min)	$D_{94^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
10	3,60E+08	8,56
20	3,77E+07	7,58
30	1,04E+07	7,02
50	1,80E+06	6,25
60	1,04E+06	6,02
$D_{94^{\circ}\text{C}} = 20,73\text{min}$		
$R^2 = 0,94$		

Tabela 49: Contagem de sobreviventes em tubo TDT - Ensaio a 96°C, com *B.atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
0' (lag)	-7	TNTC	TNTC	TNTC	-	-
	-8	93	95	107	9,83E+09	7,57E+08
	-9	6	12	13	1,03E+10	3,79E+09
7'	-7	14	16	11	1,37E+08	2,52E+07
	-8	3	< 1	1	1,33E+08	1,41E+08
	-9	< 1	< 1	< 1	< 1	-
14'	-7	13	21	14	1,60E+08	4,36E+07
	-8	1	1	1	1,00E+08	0,00E+00
	-9	< 1	< 1	< 1	< 1	-
21'	-5	60	55	77	6,40E+06	1,15E+06
	-6	4	8	8	6,67E+06	2,31E+06
	-7	< 1	1	1	6,67E+06	5,77E+06
28'	-4	128	135	106	1,23E+06	1,51E+05
	-5	13	12	20	1,50E+06	4,36E+05
	-6	1	3	< 1	1,33E+06	1,41E+06
35'	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	136	80	116	1,11E+07	2,84E+06
42'	-6	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	71	81	89	8,03E+05	9,02E+04

Tabela 50: Contagens de sobreviventes em tubo TDT usados para calcular o valor $D_{96^{\circ}\text{C}}$

tempo (min)	$D_{96^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
7	1,37E+08	8,14
21	6,40E+06	6,81
28	1,23E+06	6,09
42	8,03E+05	5,90
D = 15,33min		
$R^2 = 0,882$		

9.1.2. Reator de cisalhamento

Tabela 51: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 27/08/2007, a 93°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	
		1	2	3	Média	Desvio padrão
0' (lag)	-5	TNTC	TNTC		TNTC	
	-6	49	46		4,75E+07	
	-7	4	6		5,00E+07	
12'	-4	25	30	28	2,77E+05	2,52E+04
	-5	1	3	3	2,33E+05	1,15E+05
	-6	1	< 1	< 1	3,33E+05	-
24'	-4	6	7	4	5,67E+04	1,53E+04
	-5	1	1	< 1	6,67E+04	0,00E+00
	-6	< 1	< 1	< 1	< 1	-
36'	-3	4	5	6	5,00E+03	1,00E+03
	-4	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-5	< 1	< 1	< 1	< 1	-
48'	-3	7	4	4	5,00E+03	1,73E+03
	-4	2	3	3	2,67E+04	5,77E+03
	-5	< 1	< 1	< 1	< 1	-
58'	-2	56	49	72	5,90E+03	1,18E+03
	-3	6	5	4	5,00E+03	1,00E+03

Tabela 52: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

$D_{93^{\circ}\text{C}}$		
tempo (min)	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	4,75E+07	7,68
12	2,77E+05	5,44
24	5,67E+04	4,75
36	5,00E+03	3,70
D = 9,51 min		
$R^2 = 0,94$		

Tabela 53: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 09/10/2007, a 93,4°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
0' (lag)	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-6	30	32	26	2,93E+07	3,06E+06
	-7	2	3	4	3,00E+07	1,00E+07
9'	-4	146	122	113	1,27E+06	1,71E+05
	-5	13	21	13	1,57E+06	4,62E+05
	-6	< 1	< 1	1	3,33E+05	5,77E+05
18'	-4	8	12	14	1,13E+05	3,06E+04
	-5	3	1	3	2,33E+05	1,15E+05
	-6	1	< 1	< 1	3,33E+05	5,77E+05
27'	-3	31	32	36	3,30E+04	2,65E+03
	-4	2	3	2	2,33E+04	5,77E+03
	-5	< 1	2	< 1	6,67E+04	1,15E+05
36'	-3	24	25	33	2,73E+04	4,93E+03
	-4	5	3	3	3,67E+04	1,15E+04
	-5	< 1	1	1	6,67E+04	5,77E+04
45'	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-3	38	36	35	3,63E+04	1,53E+03
	-4	4	4	1	3,00E+04	1,73E+04
54'	-1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-3	27	40	24	3,03E+04	8,50E+03

Tabela 54: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

$D_{93,4^{\circ}\text{C}}$		
tempo (min)	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	2,93E+07	7,47
9	1,27E+06	6,10
18	1,13E+05	5,05
27	3,30E+04	4,52
D =9,09min		
$R^2 =0,97$		

Tabela 55: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 26/10/2007, a 93,4°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
0' (lag)	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-6	39	37	38	3,80E+07	1,00E+06
	-7	6	4	5	5,00E+07	1,00E+07
18'	-3	58	79	61	6,60E+04	1,14E+04
	-4	5	9	8	7,33E+04	2,08E+04
	-5	< 1	1	< 1	3,33E+04	5,77E+04
27'	-2	76	98	97	9,03E+03	1,24E+03
	-3	19	14	8	1,37E+04	5,51E+03
	-4	1	1	< 1	6,67E+03	5,77E+03
36'	-1	48	64	56	5,60E+02	8,00E+01
	-2	8	6	14	9,33E+02	4,16E+02
	-3	1	1	< 1	6,67E+02	5,77E+02
45'	-1	21	14	23	1,93E+02	4,73E+01
	-2	2	1	< 1	1,00E+02	1,00E+02
	-3	< 1	< 1	1	3,33E+02	5,77E+02
54'	0	2	5	2	3,00E+00	1,73E+00
	-1	1	< 1	1	6,67E+00	5,77E+00
	-2	< 1	< 1	1	3,33E+01	5,77E+01
63'	0	2	3	3	2,67E+00	5,77E-01
	-1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-2	< 1	< 1	< 1	< 1	-

Tabela 56: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{93,3^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	3,80E+07	7,58
18	6,60E+04	4,82
27	9,03E+03	3,96
36	5,60E+02	2,75
45	1,93E+02	2,29
54	3,00E+00	0,48
D = 8,05min		
$R^2 = 0,98$		

Tabela 57: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 01/11/2007, a 93,4°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-6	68	96	77	8,03E+07	1,43E+07
	-7	5	7	8	6,67E+07	1,53E+07
9'	-4	199	212	214	2,08E+06	8,14E+04
	-5	16	26	20	2,07E+06	5,03E+05
	-6	4	3	4	3,67E+06	5,77E+05
18'	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-3	121	111	93	1,08E+05	1,42E+04
	-4	4	6	16	8,67E+04	6,43E+04
27'	-1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-3	38	32	44	3,80E+04	6,00E+03
36'	-1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-2	39	47	39	4,17E+03	4,62E+02
	-3	3	3	8	4,67E+03	2,89E+03
45'	0	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-1	54	71	45	5,67E+02	1,32E+02
	-2	9	5	8	7,33E+02	2,08E+02
54'	0	93	101		6,47E+01	5,66E+00
	-1	16	25	34	2,50E+02	9,00E+01
	-2	7	3	3	4,33E+02	2,31E+02

Tabela 58: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{93,4^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	8,03E+07	7,90
9	2,08E+06	6,32
18	1,08E+05	5,03
27	3,80E+04	4,58
36	4,17E+03	3,62
45	5,67E+02	2,75
D =9,18min		
$R^2 =0,97$		

Tabela 59: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 29/11/2007, a 90,5°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-6	97	103	81	9,37E+07	1,14E+07
	-7	7	12	11	1,00E+08	2,65E+07
15'	-4	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	39	44	45	4,27E+06	3,21E+05
	-6	4	4	9	5,67E+06	2,89E+06
30'	-4	51	49	47	4,90E+05	2,00E+04
	-5	6	2	3	3,67E+05	2,08E+05
	-6	1	< 1	2	1,00E+06	1,00E+06
45'	-3	33	36	50	3,97E+04	9,07E+03
	-4	7	2	7	5,33E+04	2,89E+04
	-5	1	1	1	1,00E+05	0,00E+00
60'	-2	131	120	118	1,23E+04	7,00E+02
	-3	10	11	7	9,33E+03	2,08E+03
	-4	2	1	3	2,00E+04	1,00E+04
75'	-1	61	90	86	7,90E+02	1,57E+02
	-2	8	8	11	9,00E+02	1,73E+02
	-3	3	4	< 1	2,33E+03	2,08E+03

Tabela 60: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{90,5^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4.91\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{90,5^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	9,37E+07	7,97
15	4,27E+06	6,63
30	4,90E+05	5,69
45	3,97E+04	4,60
60	1,23E+04	4,09
75	7,90E+02	2,90
D = 15,40min		
$R^2 = 0,99$		

Tabela 61: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 18/12/2007, a 90,9°C e tensão de cisalhamento de 1,43Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-7	3	5	3	3,67E+07	1,15E+07
	-6	31	22	25	2,60E+07	4,58E+06
	-5	233	223	244	2,33E+07	1,05E+06
15'	-7	2	< 1	< 1	6,67E+06	1,15E+07
	-6	1	2	2	1,67E+06	5,77E+05
	-5	44	45	spread	4,45E+06	7,07E+04
30'	-6	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-5	< 1	2	1	1,00E+05	1,00E+05
	-4	13	10	14	1,23E+05	2,08E+04
45'	-5	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-4	4	3	5	4,00E+04	1,00E+04
	-3	35	38	37	3,67E+04	1,53E+03
60'	-4	< 1	< 1	3	1,00E+04	1,73E+04
	-3	19	16	12	1,57E+04	3,51E+03
	-2	95	103	114	1,04E+04	9,54E+02
75'	-3	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-2	8	19	34	2,03E+03	1,31E+03
	-1	103	99	116	1,06E+03	8,89E+01

Tabela 62: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{90,9^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 1,43\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{90,9^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	2,33E+07	7,37
15	4,45E+06	6,65
30	1,23E+05	5,09
45	3,67E+04	4,56
60	1,57E+04	4,19
75	2,03E+03	3,31
D = 18,63min		
$R^2 = 0,96$		

Tabela 63: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 15/01/2008, a 95,4°C e tensão de cisalhamento de 1,43Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-7	4	1	6	3,67E+07	2,52E+07
	-6	34	20	24	2,60E+07	7,21E+06
	-5	217	232	252	2,34E+07	1,76E+06
4'	-5	6	8	9	7,67E+05	1,53E+05
	-4	71	56	80	6,90E+05	1,21E+05
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
8'	-5	4	2	3	3,00E+05	1,00E+05
	-4	22	17	14	1,77E+05	4,04E+04
	-3	125	111	135	1,24E+05	1,21E+04
12'	-4	7	2	4	4,33E+04	2,52E+04
	-3	66	68	53	6,23E+04	8,14E+03
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
16'	-3	5	6	2	4,33E+03	2,08E+03
	-2	35	46	47	4,27E+03	6,66E+02
	-1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
20'	-3	2	< 1	< 1	6,67E+02	1,15E+03
	-2	18	27	22	2,23E+03	4,51E+02
	-1	125	150	155	1,43E+03	1,61E+02
24'	-2	7	7	15	9,67E+02	4,62E+02
	-1	63	64	66	6,43E+02	1,53E+01
	0	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-

Tabela 64: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{95,4^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 1,43\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{95,4^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	2,34E+07	7,37
4	6,90E+05	5,84
8	1,24E+05	5,09
12	6,23E+04	4,79
16	4,27E+03	3,63
20	1,43E+03	3,16
24	6,43E+02	2,81
D = 5,46min		
$R^2 = 0,96$		

Tabela 65: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 16/01/2008, a 96,2°C e tensão de cisalhamento de 4,91Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão
	Diluições	1	2		
0' (lag)	-7	< 1	< 1	< 1	-
	-6	9	2	8	6,33E+06
	-5	87	84	89	8,67E+06
4'	-5	< 1	< 1	< 1	-
	-4	11	11	7	9,67E+04
	-3	126	135	144	1,35E+05
8'	-4	5	8	11	8,00E+04
	-3	113	94	79	9,53E+04
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
12'	-4	7	5	2	4,67E+04
	-3	38	42	32	3,73E+04
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
17'	-3	< 1	< 1	< 1	-
	-2	2	1	1	1,33E+02
	-1	8	5	17	1,00E+02
20'	-3	< 1	< 1	< 1	-
	-2	1	< 1	2	1,00E+02
	-1	3	4	1	2,67E+01
24'	-2	< 1	< 1	< 1	-
	-1	2	1	< 1	1,00E+01
	0	3	7	2	4,00E+00

Tabela 66: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{96,2^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 4,91\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{96,2^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	8,67E+06	6,94
4	1,35E+05	5,13
8	9,53E+04	4,98
12	3,73E+04	4,57
20	2,67E+01	1,43
24	4,00E+00	0,60
D = 3,91min		
$R^2 = 0,96$		

Tabela 67: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 14/02/2008, a 94,6°C e tensão de cisalhamento de 8,35Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-7	36	48	38	4,07E+08	6,43E+07
	-6	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
10'	-6	3	2	2	2,33E+06	5,77E+05
	-5	14	18	16	1,60E+06	2,00E+05
	-4	154	148	135	1,46E+06	9,71E+04
20'	-5	2	< 1	< 1	6,67E+04	1,15E+05
	-4	12	18	29	1,97E+05	8,62E+04
	-3	149	187	195	1,77E+05	2,46E+04
30'	-4	1	< 1	< 1	3,33E+03	5,77E+03
	-3	1	6	< 1	2,33E+03	3,21E+03
	-2	8	9	8	8,33E+02	5,77E+01
40'	-4	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-3	1	< 1	< 1	3,33E+02	5,77E+02
	-2	2	2	1	1,67E+02	5,77E+01

Tabela 68: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{94,6^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 8,35\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{94,6^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	4,07E+08	8,61
10	1,46E+06	6,16
20	1,77E+05	5,25
30	8,33E+02	2,92
40	1,67E+02	2,22
D = 6,24min		
$R^2 = 0,97$		

Tabela 69: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 19/02/2008, a 95,1°C e tensão de cisalhamento de 8,35Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-7	6	2	1	3,00E+07	2,65E+07
	-6	38	49	31	3,93E+07	9,07E+06
	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
4'	-5	28	21	24	2,43E+06	3,51E+05
	-4	278	374	348	3,33E+06	4,97E+05
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
8'	-4	101	46	45	6,40E+05	3,20E+05
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
13,5'	-4	< 1	2	< 1	6,67E+03	1,15E+04
	-3	9	3	16	9,33E+03	6,51E+03
	-2	81	74	156	1,04E+04	4,55E+03
16'	-3	1	< 1	2	1,00E+03	1,00E+03
	-2	23	30	17	2,33E+03	6,51E+02
	-1	160	147	128	1,45E+03	1,61E+02
20'	-2	5	3	5	4,33E+02	1,15E+02
	-1	39	36	31	3,53E+02	4,04E+01
24'	-2	1	2	2	1,67E+02	5,77E+01
	-1	2	16	6	8,00E+01	7,21E+01
	0	98	100	-	9,90E+01	1,41E+00

Tabela 70: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{95,1^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 8,35\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

$D_{95,1^{\circ}\text{C}}$		
tempo (min)	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	3,93E+07	7,59
4	3,33E+06	6,52
8	6,40E+05	5,81
13,5	1,04E+04	4,02
16	1,45E+03	3,16
20	3,53E+02	2,55
24	9,90E+01	2,00
D = 4,08min		
$R^2 = 0,98$		

Tabela 71: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 19/02/2008, a 92,7°C e tensão de cisalhamento de 9,82Pa, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Repetições			Média	Desvio Padrão	
	Diluições	1	2			3
0' (lag)	-7	6	3	3	4,00E+07	1,73E+07
	-6	57	42	39	4,60E+07	9,64E+06
	-5	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
6'	-6	11	10	10	1,03E+07	5,77E+05
	-5	99	131	98	1,09E+07	1,88E+06
	-4	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
12'	-6	4	2	2	2,67E+06	1,15E+06
	-5	24	22	38	2,80E+06	8,72E+05
	-4	285	434	TNTC	3,60E+06	1,05E+06
18'	-5	4	7	7	6,00E+05	1,73E+05
	-4	52	30	74	5,20E+05	2,20E+05
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
24'	-5	1	< 1	1	6,67E+04	5,77E+04
	-4	19	12	13	1,47E+05	3,79E+04
	-3	22	29	30	2,70E+04	4,36E+03
30'	-4	6	3	6	5,00E+04	1,73E+04
	-3	20	41	28	2,97E+04	1,06E+04
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
36'	-4	5	4	8	5,67E+04	2,08E+04
	-3	66	92	63	7,37E+04	1,59E+04
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-

Tabela 72: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{92,7^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 9,82\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{92,7^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	4,60E+07	7,66
6	1,09E+07	7,04
12	2,80E+06	6,45
18	5,20E+05	5,72
30	2,97E+04	4,47
D = 9,35min		
$R^2 = 0,999$		

Tabela 73: Contagem de sobreviventes em reator de cisalhamento – Ensaio realizado em 26/02/2008, a 93°C e sem tensão de cisalhamento, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Instante de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
0' (lag)	-7	2	3	2	2,33E+07	5,77E+06
	-6	21	22	22	2,17E+07	5,77E+05
	-5	231	232	238	2,34E+07	3,79E+05
11'	-6	< 1	1	< 1	3,33E+05	5,77E+05
	-5	8	19	17	1,47E+06	5,86E+05
	-4	91	106	100	9,90E+05	7,55E+04
30'	-5	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-4	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-3	9	9	6	8,00E+03	1,73E+03
45'	-4	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-3	1	1	1	1,00E+03	0,00E+00
	-2	13	6	14	1,10E+03	4,36E+02
60'	-3	1	< 1	< 1	3,33E+02	5,77E+02
	-2	1	< 1	< 1	3,33E+01	5,77E+01
	-1	2	3	6	3,67E+01	2,08E+01
75'	-2	< 1	< 1	1	3,33E+01	5,77E+01
	-1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	0	2	3	6	3,67E+00	2,08E+00
90'	-2	< 1	< 1	< 1	< 1	-
	-1	1	< 1	< 1	3,33E+00	5,77E+00
	0	4	2	< 1	2,00E+00	2,00E+00

Tabela 74: Contagens de sobreviventes em reator de cisalhamento usados para calcular o valor $D_{93^{\circ}\text{C}}$ ($\sigma = 0\text{Pa}$) de *B. atrophaeus* em água pH 6.87

tempo (min)	$D_{96^{\circ}\text{C}}$	
	sobreviv. (UFC/mL)	log(sobreviv.) (log(UFC/mL))
0	2,34E+07	7,37
11	9,90E+05	6,00
30	8,00E+03	3,90
45	1,10E+03	3,04
75	3,67E+00	0,56
D = 11,25min		
$R^2 = 0,99$		

9.1.3. Unidade Piloto HTST Microthermics

Tabela 75: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 16/04/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Diluições	Repetições		Média	Desvio Padrão
		1	2		
N ₀	-3	2	2	2,00E+03	0,00E+00
	-4	< 1	< 1	< 1	-
	-5	< 1	< 1	< 1	-
Aquecedor	-2	46	32	3,90E+03	9,90E+02
	-3	4	5	4,50E+03	7,07E+02
	-4	< 1	< 1	< 1	-
Retenção 1	-2	9	16	1,25E+03	4,95E+02
	-3	1	2	1,50E+03	7,07E+02
	-4	< 1	< 1	< 1	-
Retenção 2	-2	2	1	1,50E+02	7,07E+01
	-3	< 1	< 1	< 1	-
	-4	< 1	< 1	< 1	-

Tabela 76: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 16/04/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Sobreviventes (UFC/mL)	log (sobrev.)	Tempo de residência parcial durante as coletas*		Temperaturas médias durante as coletas		
Aquecedor	3,90E+03	3,59	0,00	0,00	99,52	99,16	99,14
Retenção 1	1,25E+03	3,10	48,31	48,31		97,07	97,21
Retenção 2	1,50E+02	2,18		46,03			95,26

*calculado a partir da medida da tubulação (Tabela 2) e vazão ajustada (1L/min)

Tabela 77: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 07/05/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Diluições	Repetições		Média	Desvio Padrão
		1	2		
N ₀	-2	75	81	7,80E+03	4,24E+02
	-3	2	5	3,50E+03	2,12E+03
	-4	< 1	< 1	< 1	-
Aquecedor	-1	340	508	4,24E+03	1,19E+03
	-2	36	32	3,40E+03	2,83E+02
	-3	5	4	4,50E+03	7,07E+02
Retenção 1	-1	82	92	8,70E+02	7,07E+01
	-2	10	12	1,10E+03	1,41E+02
	-3	1	3	2,00E+03	1,41E+03
Retenção 2	-1	9	11	1,00E+02	1,41E+01
	-2	< 1	1	5,00E+01	-
	-3	< 1	< 1	< 1	-

Tabela 78: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 07/05/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Sobreviventes (UFC/mL)	log (sobrev.)	Tempo de residência parcial durante as coletas*		Temperaturas médias durante as coletas		
Aquecedor	4,24E+03	3,63	0,00	0,00	99,63	99,09	99,55
Retenção 1	8,70E+02	2,94	46,42	46,45		97,58	97,81
Retenção 2	1,00E+02	2,00		44,27			96,21

*calculado a partir da medida da tubulação (Tabela 2) e vazão ajustada (1L/min)

Tabela 79: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 09/05/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2			
N ₀	-2	58	43		5,05E+03	1,06E+03
	-3	6	2		4,00E+03	2,83E+03
	-4	1	1		1,00E+04	0,00E+00
Aquecedor	-1	435	523	516	4,91E+03	4,89E+02
	-2	52	59	67	5,93E+03	7,51E+02
	-3	8	4	3	5,00E+03	2,65E+03
Retenção 1	-1	339	374	382	3,65E+03	2,29E+02
	-2	39	48	46	4,43E+03	4,73E+02
	-3	3	7	7	5,67E+03	2,31E+03
Retenção 2	-1	293	296		2,95E+03	2,12E+01
	-2	36	37		3,65E+03	7,07E+01
	-3	3	1		2,00E+03	1,41E+03

Tabela 80: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 09/05/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Sobreviventes (UFC/mL)	log (sobrev.)	Tempo de residência parcial durante as coletas*		Temperaturas médias durante as coletas	
Aquecedor	5,93E+03	3,77	0,00	0,00	95,91	96,31 96,42
Retenção 1	4,43E+03	3,65	48,06	48,00		94,67 94,81
Retenção 2	2,95E+03	3,47		45,74		92,46

*calculado a partir da medida da tubulação (Tabela 2) e vazão ajustada (1L/min)

Tabela 81: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 14/05/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
N ₀	-3	323	266	293	2,94E+05	2,85E+04
	-4	28	25	32	2,83E+05	3,51E+04
	-5	6	2	7	5,00E+05	2,65E+05
Aquecedor	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	50	55	56	5,37E+05	3,21E+04
	-5	7	5	7	6,33E+05	1,15E+05
Retenção 1	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	44	41	29	3,80E+05	7,94E+04
	-5	3	3	4	3,33E+05	5,77E+04
Retenção 2	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-4	49	60	75	6,13E+05	1,31E+05
	-5	5	6	12	7,67E+05	3,79E+05

Tabela 82: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 14/05/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Sobreviventes (UFC/mL)	log (sobrev.)	Tempo de residência parcial durante as coletas*		Temperaturas médias durante as coletas		
Aquecedor	5,37E+05	5,73	0,00	0,00	95,40	95,39	95,53
Retenção 1	3,80E+05	5,58	47,75	48,31		93,87	93,91
Retenção 2	6,13E+05	5,79		46,03			92,10

Tabela 83: Contagem de sobreviventes em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 04/06/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
N ₀	-5	9	4	5	6,00E+05	2,65E+05
	-4	65	54	61	6,00E+05	5,57E+04
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
<hr/>						
Aquecedor	Diluições	Repetições			Média	Desvio Padrão
		1	2	3		
Aquecedor	-4	41	42	62	4,83E+05	1,18E+05
	-3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
<hr/>						
Retenção 1	-4	27	28	33	2,93E+05	3,21E+04
	-3	284	272	270	2,75E+05	7,57E+03
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-
<hr/>						
Retenção 2	-4	24	26	28	2,60E+05	2,00E+04
	-3	219	210	276	2,35E+05	3,58E+04
	-2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	-

Tabela 84: Resumo dos dados obtidos em unidade HTST piloto Microthermics – Ensaio realizado em 04/06/2008, com *B. atrophaeus* em água pH 6.87

Ponto de coleta	Sobreviventes (UFC/mL)	log (sobrev.)	Tempo de residência parcial durante as coletas*		Temperaturas durante as coletas		
Aquecedor	4,83E+05	5,68	36,69	36,73	96,76	97,07	97,24
Retenção 1	2,75E+05	5,44	51,25	51,31	93,76	93,70	
Retenção 2	2,35E+05	5,37		30,775			92,18

*calculado a partir da medida da tubulação (Tabela 2) e vazão ajustada (1,5L/min)

9.2. Anexo 02 – Meios de cultura usados – formulações e preparações

Meio de esporulação

Agar Nutriente DIFCO (L⁻¹):

Extrato de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Agar	15g

Pesar 23g de reagente em 1 litro de água destilada, sob aquecimento. Autoclavar por 15 minutos. Quando armazenado refrigerado, dissolver em banho-maria.

Meio de contagem de sobreviventes

Caldo Nutriente DIFCO(L⁻¹):

Extrato de carne	3.0g
Peptona	5.0g

Agar-Agar MERCK (L⁻¹)

Agar	15g
------	-----

Dissolver completamente 8g de Caldo Nutriente DIFCO e 15g de Agar-Agar em 1 litro de água destilada, sob aquecimento. Autoclavar por 15 minutos. Quando armazenado refrigerado, dissolver em banho-maria.

9.3. Anexo 03 – Metodologia de determinação de ponto equivalente

Calculando os parâmetros cinéticos, de acordo com Welt *et al.*(1997), e apresentado na página 66:

1. Realiza-se alguns processos térmicos, em que ocorra alguma reação catalisada pelo calor;

Neste exemplo, serão usados os dados dos dias 07/05/2008 e 09/05/2008, etapa Retenção 1

2. Registra-se as temperaturas em cada etapa do processo;

As temperaturas registradas foram:

	07/05/2008	09/05/2008
Início processo	99,09°C	96,31°C
Fim processo	97,58°C	94,67°C
Tempo processo	48,06s	46,42s

3. Determina-se as concentrações iniciais e finais do composto de interesse em cada processo, neste caso, a população de *B. atrophaeus*.

	07/05/2008	09/05/2008
Início processo	5,93E+03	4,24E+03
Fim processo	4,43E+03	8,70E+02

4. Estima-se a história térmica ao longo de cada um dos processos, através do método proposto por Deindoerfer e Humphrey (1959), usando a equação

$$T(t) = T_{(H,C)} + (T_0 - T_{(H,C)}) \cdot e^{-Jt}$$

Para estimar as temperaturas usando esta equação, foi criada uma planilha, usando o *software* Microsoft Excel, cujos resultados são apresentados, resumidamente, na tabela a seguir, para o processo de 09/05/2008. O valor J foi estimado usando o tempo final de

processo (48,06s) e a temperatura no final do deste (94,67°C). T_0 foi 96,31°C, e a temperatura do meio era de 90,67°C. As temperaturas devem ser convertidas para Kelvin, a fim de serem usadas na determinação da Energia de Ativação.

Processo de 09/05/2008			
		Retenção 1	
tempo de residência (s):		48.06	
Temperatura de entrada (°C):		369.3111	
Temperatura de saída (°C):		367.67	
Temperatura do meio de troca térmica (°C):		363.67	
J da etapa (1/s):		0.0072	
Retenção 1	Δt (s)	tempo de residência(s)	Temperatura (°C)
		0.00	369.31114
	0.048057	0.05	369.30920
	0.048057	0.10	369.30725
	0.048057	0.14	369.30531
	0.048057	0.19	369.30337
	0.048057	0.24	369.30143
	0.048057	0.29	369.29949
	0.048057	0.34	369.29755
	0.048057	0.38	369.29561
	0.048057	0.43	369.29367
	0.048057	0.48	369.29173
	0.048057	0.53	369.28979
	0.048057	0.58	369.28786
	0.048057	0.62	369.28592
	0.048057	0.67	369.28398
	0.048057	0.72	369.28205
	0.048057	0.77	369.28012
	.	.	.
	.	.	.
	.	.	.
	0.048057	47.67	367.67730
	0.048057	47.72	367.67592
	0.048057	47.77	367.67454
0.048057	47.82	367.67316	
0.048057	47.87	367.67178	
0.048057	47.91	367.67040	
0.048057	47.96	367.66902	
0.048057	48.01	367.66764	
0.048057	48.06	367.66626	

5. Estabelece-se um valor para a primeira Energia de Ativação (E_{a1}) da reação (por exemplo 300kJ/mol), e um critério para o cálculo da segunda Energia de Ativação, como por exemplo, o dobro da primeira ($E_{a2} = 2 * E_{a1}$).
6. Calcula-se o valor de G, para cada um dos processos, para cada Energia de Ativação, resolvendo-se a Equação 43.

O cálculo de G foi feito pelo método numérico de Simpson, conforme apresentado na seguinte tabela:

Integração por Simpson			
Ea1	300.000	Ea2	600000
tempo de residência(s)	Temperatura (°C)	Termos da somatória	
0	369.31	1.77E-44	6.54E-87
0.05	369.31	7.09E-44	2.62E-86
0.10	369.31	3.54E-44	1.31E-86
0.14	369.31	7.08E-44	2.61E-86
0.19	369.30	3.54E-44	1.3E-86
0.24	369.30	7.08E-44	2.6E-86
0.29	369.30	3.54E-44	1.3E-86
0.34	369.30	7.07E-44	2.6E-86
0.38	369.30	3.53E-44	1.3E-86
0.43	369.29	7.06E-44	2.59E-86
0.48	369.29	3.53E-44	1.3E-86
0.53	369.29	7.05E-44	2.59E-86
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
47.53	367.68	4.6E-44	1.1E-86
47.58	367.68	2.3E-44	5.5E-87
47.62	367.68	4.6E-44	1.1E-86
47.67	367.68	2.3E-44	5.49E-87
47.72	367.68	4.59E-44	1.1E-86
47.77	367.67	2.3E-44	5.48E-87
47.82	367.67	4.59E-44	1.1E-86
47.87	367.67	2.29E-44	5.48E-87
47.91	367.67	4.59E-44	1.09E-86
47.96	367.67	2.29E-44	5.47E-87
48.01	367.67	4.58E-44	1.09E-86
48.06	367.67	1.15E-44	2.73E-87
	Soma (G)	G1 = 1.49E-41	G2 = 4.26E-84

7. Conhecido o valor de G_1 e G_2 , determina-se o Ponto Equivalente para cada processo pela intersecção entre as duas retas encontradas (E_a), encontrando-se uma temperatura equivalente, e um tempo equivalente, aplicando a relação $T_{eq}=(E_{a1}-E_{a2})/(R \cdot \ln(G_2/G_1))$ e $t_{eq}=G_1/\exp(E_{a1}/(R \cdot T_{eq}))$. De acordo com os dados já obtidos, obtém-se que, para o processo de 09/05/2008, a temperatura equivalente é 368,5K e o tempo equivalente é 47,30s, e para o processo de 07/05/2008, a temperatura equivalente é 371,37K e o tempo equivalente é 45,82s.
8. A partir da variação na concentração do composto de interesse, verificada experimentalmente, determina-se o valor da Constante de reação, $k = \ln(C/C_0) \cdot t_{eq}^{-1}$. Assim, para o processo de 09/05/2008, o valor de k encontrado foi de $6,16 \times 10^{-3} s^{-1}$ e para o processo de 07/05/2008, o valor de k encontrado foi de $3,46 \times 10^{-2} s^{-1}$.
9. De posse da Constante de reação e da Temperatura equivalente (T_{eq}) para dois processos diferentes, obtém-se o valor da Energia de Ativação, através da relação

$$E_a = \frac{R \cdot \ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{\left(\frac{T_{eq,1} - T_{eq,2}}{T_{eq,1} \cdot T_{eq,2}}\right)}$$

Onde E_a é a energia de ativação; R é a constante universal dos gases, k_1 é a constante de reação da primeira reação, k_2 é a constante de reação da segunda reação, T_{eq1} é a temperatura equivalente encontrada para a primeira

reação e T_{eq2} é a temperatura equivalente encontrada para a segunda reação.

Para esta primeira aproximação, o valor de E_a encontrado foi 691.480 J/mol.

10. De posse da energia de ativação, repete-se o processo a partir do passo 5.

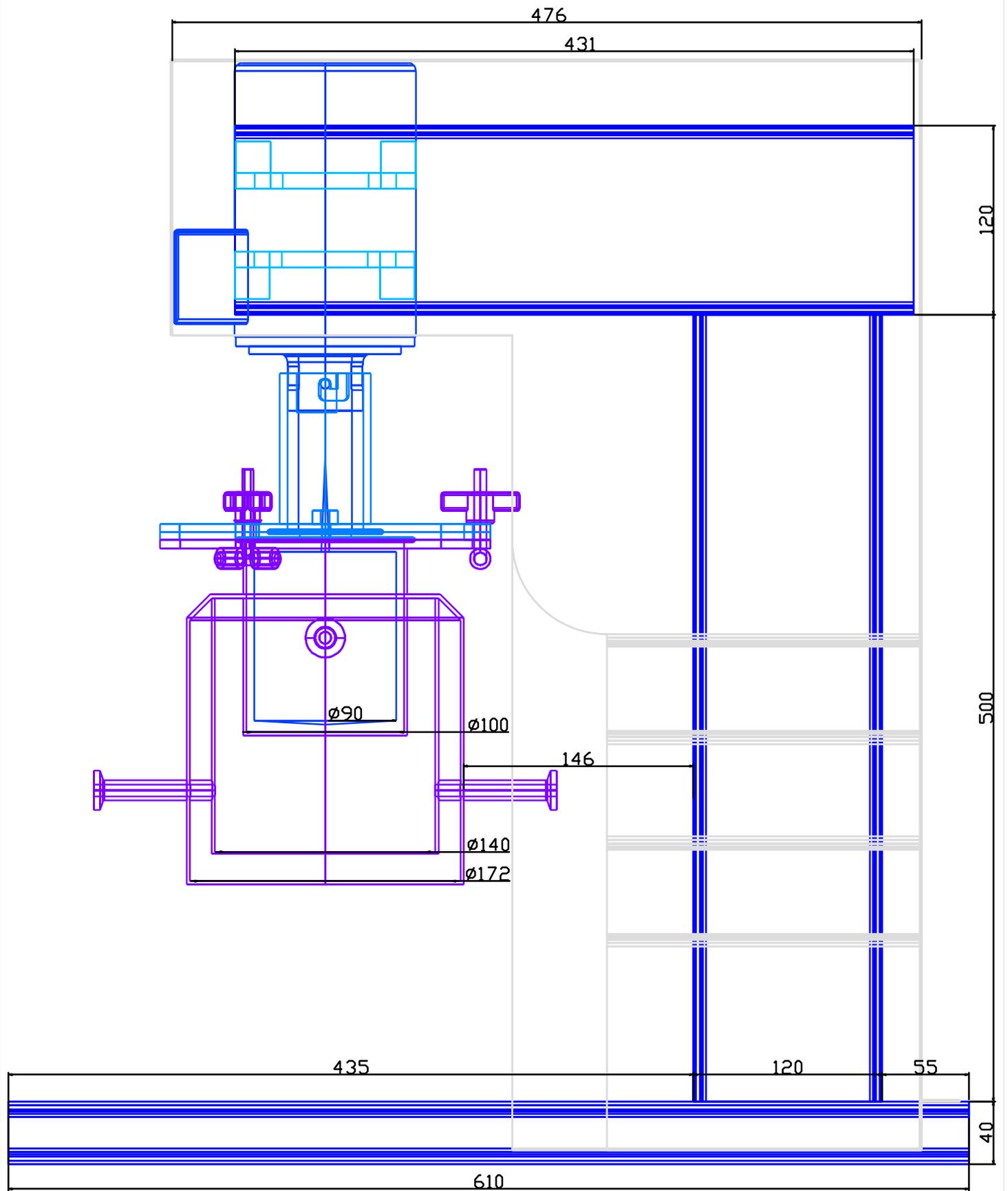
Esse processo foi resumido na seguinte tabela:

Iteração 1							
Processo	E_a (J/mol)	G	T_{eq} (K)	T_{eq} (s)	C/Co	k (s ⁻¹)	Novo E_a (J/mol)
09/05/08	300000	$1,49 \times 10^{-41}$	368,531	47,297	0,747	$6,16 \times 10^{-3}$	691.480,2
	600000	$4,26 \times 10^{-84}$					
07/05/08	300000	$2,91 \times 10^{-41}$	371,369	45,820	0,205	$3,46 \times 10^{-2}$	
	600000	$1,84 \times 10^{-83}$					
Iteração 2							
Processo	E_a (J/mol)	G	T_{eq} (K)	T_{eq} (s)	C/Co	k (s ⁻¹)	Novo E_a (J/mol)
09/05/08	691.480,2	$4,61 \times 10^{-97}$	368,645	44,257	0,747	$6,59 \times 10^{-3}$	691.718,0
	1.382.960,4	$4,81 \times 10^{-195}$					
07/05/08	691.480,2	$2,51 \times 10^{-96}$	371,463	43,399	0,205	$3,65 \times 10^{-2}$	
	1.382.960,4	$1,45 \times 10^{-193}$					
Iteração 3							
Processo	E_a (J/mol)	G	T_{eq} (K)	T_{eq} (s)	C/Co	k (s ⁻¹)	Novo E_a (J/mol)
09/05/08	691.718,0	$4,27 \times 10^{-97}$	368,645	44,255	0,747	$6,59 \times 10^{-3}$	691.717,0
	1.383.436,0	$4,12 \times 10^{-195}$					
07/05/08	691.718,0	$2,32 \times 10^{-96}$	371,463	43,397	0,205	$3,65 \times 10^{-2}$	
	1.383.436,0	$1,24 \times 10^{-193}$					
Iteração 4							
Processo	E_a (J/mol)	G	T_{eq} (K)	T_{eq} (s)	C/Co	k (s ⁻¹)	Novo E_a (J/mol)
09/05/08	691.717,0	$4,27 \times 10^{-97}$	368,645	44,255	0,747	$6,59 \times 10^{-3}$	691.717,0
	1.383.433,9	$4,12 \times 10^{-195}$					
07/05/08	691.717,0	$2,32 \times 10^{-96}$	371,463	43,397	0,205	$3,65 \times 10^{-2}$	
	1.383.433,9	$1,24 \times 10^{-193}$					

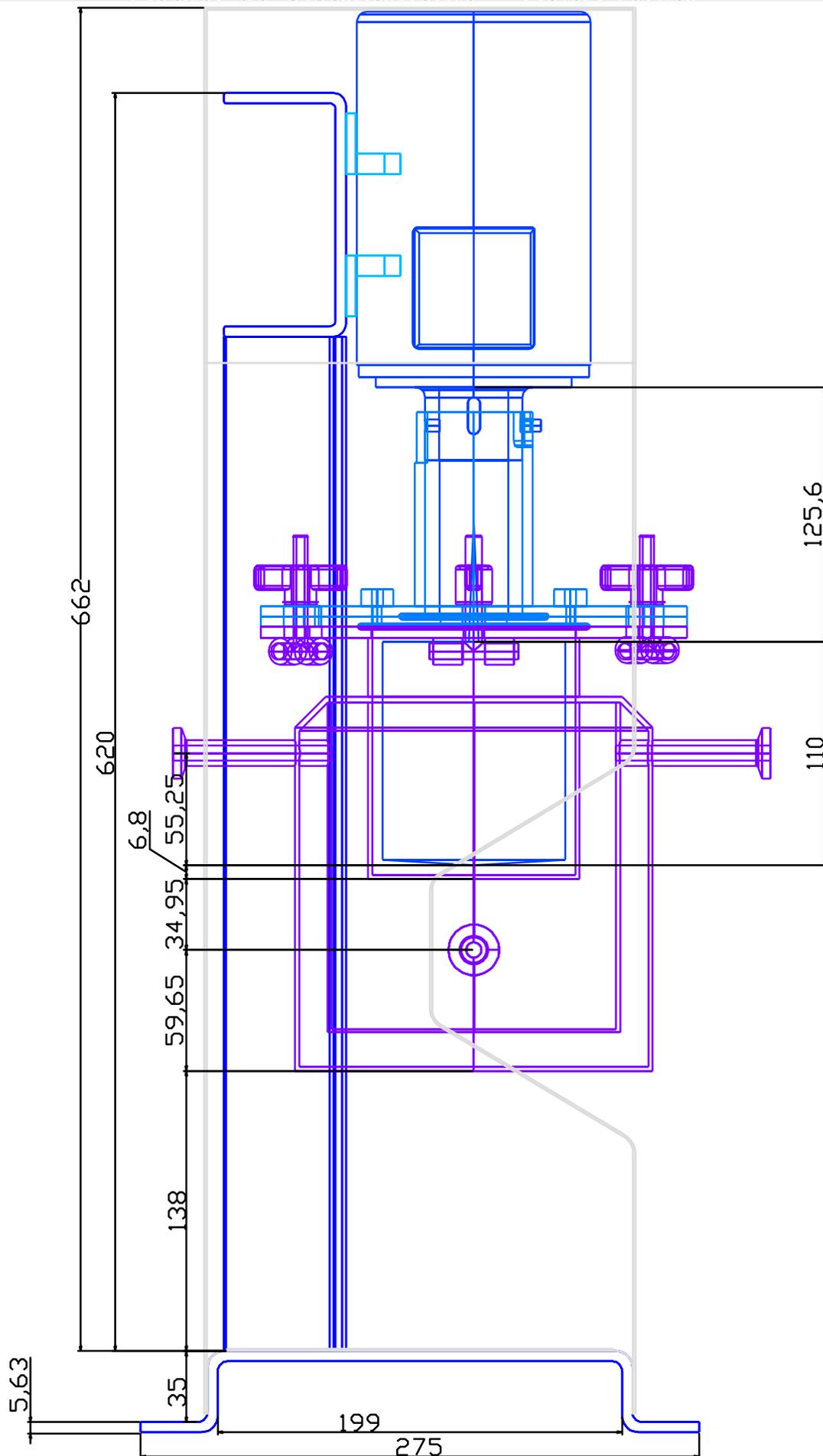
Portanto, para estes processos, a Energia de Ativação foi 691.717 J/mol, para o processo de 09/05/08, o ponto equivalente foi 95,645°C x 44,255s, e para o processo de 07/05/08, o ponto equivalente foi 98,463°C x 43,397s.

9.4. Anexo 04 – Planta do equipamento construído

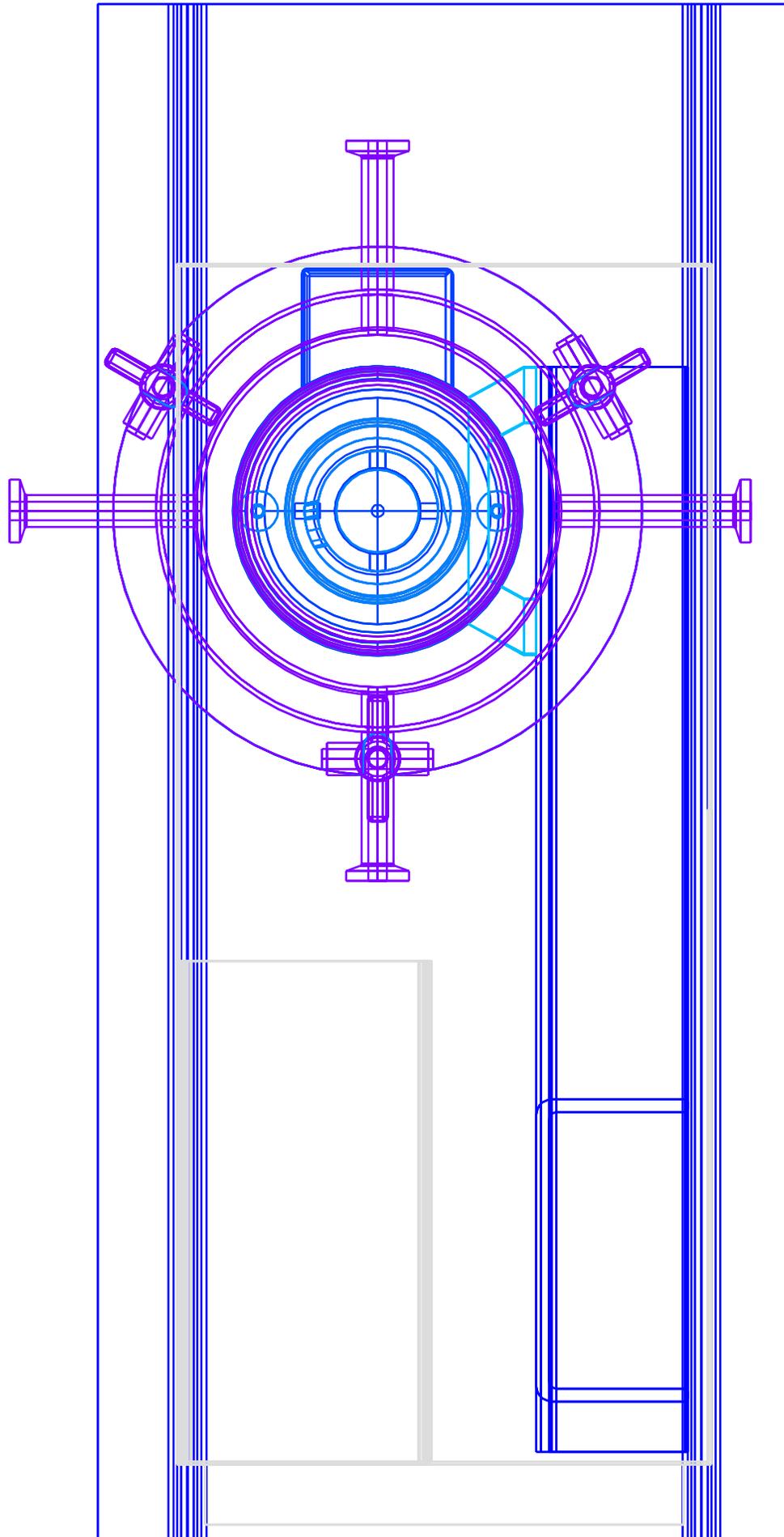
Reator de Cisalhamento – Vista Lateral



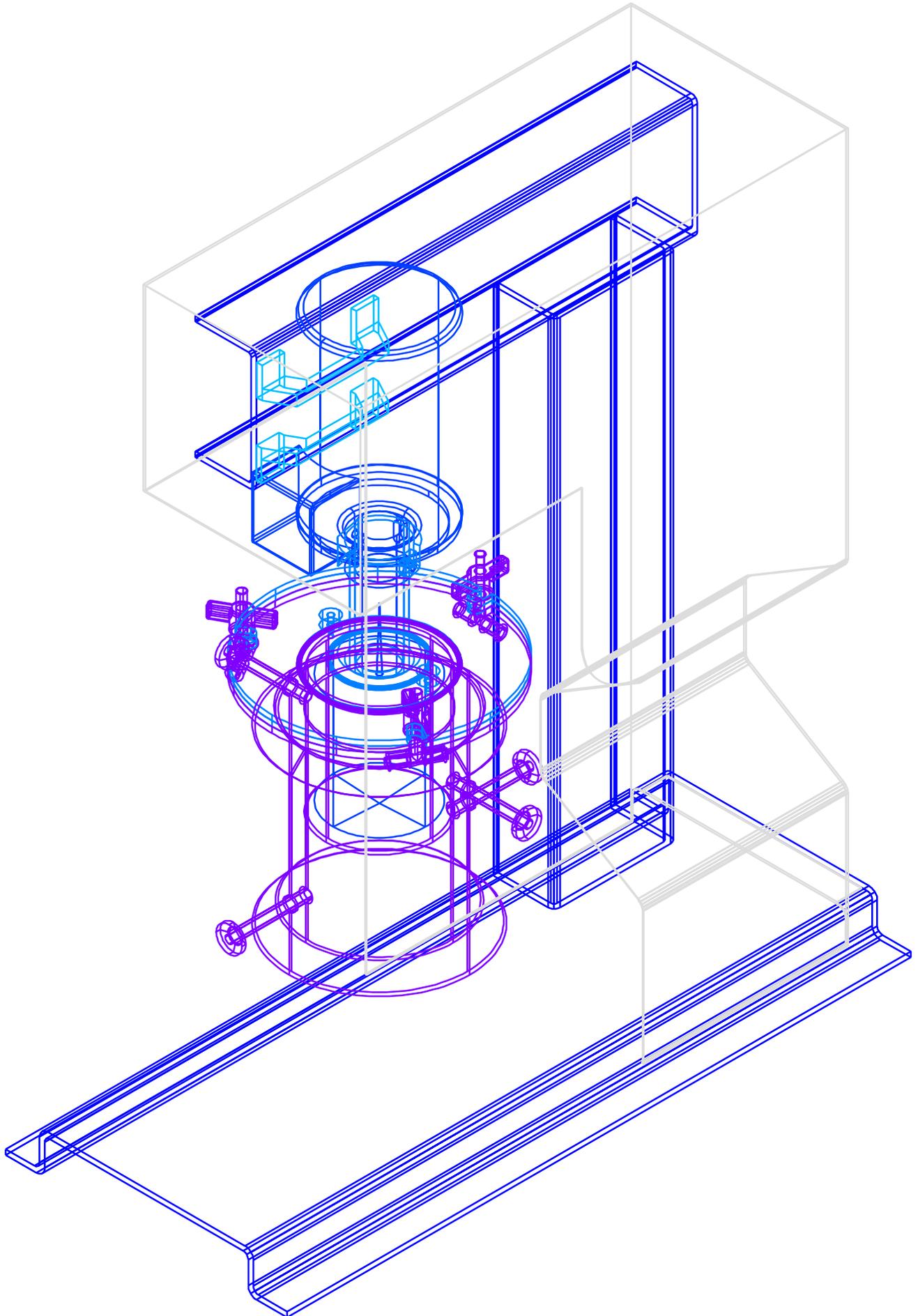
Reator de Cisalhamento – Vista Frontal



Reator de Cisalhamento – Vista em Planta



Reator de Cisalhamento – Vista Isométrica



Reator de Cisalhamento – Vista Isométrica com Superfícies

