

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE CURAU DE MILHO

CAMILA PONTELI TADDEI¹; JORGE MINORU HASHIMOTO²; VALÉRIA CHRISTINA
AMSTALDEN JUNQUEIRA³

Nº 11242

RESUMO

Foi determinada a resistência térmica de *Clostridium sporogenes* (PA3679) em curau de milho (pH 6,32), aplicando-se a metodologia do tubo para determinação do tempo de destruição térmica (TDT) selado e recuperação de sobreviventes em caldo Differential Reinforced Clostrida Media (DRCM), em subcultura no próprio tubo TDT por número mais provável. Foram obtidos valores de $D_{110^{\circ}\text{C}} = 14,48$ minutos, $D_{118^{\circ}\text{C}} = 2,08$ minutos, $D_{121^{\circ}\text{C}} = 0,6$ minutos e $z = 7,67^{\circ}\text{C}$, que podem ser utilizados na determinação do processo teórico de esterilização.

ABSTRACT

The heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA3679 in curaua corn (pH6,32) was determined by the TDT sealed tube method, recovering the survivor spores in Differential Reinforced Clostridia Media (DRCM). The results show values for de PA3679 heat resistance in accordance to most of about this topic: $D_{110^{\circ}\text{C}} = 14,48$ minutes, $D_{118^{\circ}\text{C}} = 2,08$ minutes, and $D_{121^{\circ}\text{C}} = 0,60$ minutes, and $z = 7,67^{\circ}\text{C}$, wich may be considered useful and believable in the theoretical heat process calculation.

INTRODUÇÃO

A resistência térmica dos microrganismos depende das suas características e do tipo de alimento no qual estão contidos. As condições nutricionais podem aumentar ou diminuir a resistência térmica, mas o efeito vai depender da composição de cada meio usado. Este efeito não pode ser generalizado, cada caso deverá ser estudado particularmente.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas-SP, camilapontelitaddei@hotmail.com.

² Orientador: Pesquisador, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

Existem diferentes métodos de determinação da resistência térmica de microrganismos, como o dos tubos de destruição térmica (TDT), utilizados para substâncias líquidas; latas TDT, usadas para purês viscosos; método do frasco de três bocas, utilizado para produtos aquecidos a temperaturas menores que a da água em ebulição. A escolha do método depende do tipo de alimento e sistema de aquecimento (BLOCHER & BUSTA, 1983).

A suscetibilidade dos microrganismos ao calor úmido pode ser expressa em termos da relação entre o tempo e temperatura. Duas expressões são comumente utilizadas pelos microbiologistas: Tempo de morte térmica (TMT) e tempo de redução decimal (valor D). O TMT é o mais curto espaço de tempo requerido para destruir todos os microrganismos de uma amostra, quando exposta a uma temperatura específica sob condições padrões. Neste teste, em vários intervalos de tempo do tratamento pelo calor, amostras da população microbiana são retiradas e cultivadas. O método determina o tempo mínimo de exposição capaz de destruir todos os microrganismos. O valor D é o tempo requerido para diminuir uma população microbiana de uma amostra em 90% a uma temperatura pré-determinada. Uma amostragem da população é realizada em vários intervalos. Difere da medida pelo TMT que resulta em 0% de sobreviventes. O tempo de redução decimal que resulta em 10% de sobreviventes é mais bem determinado (PERKINS, 1983).

Na determinação do TMT ou do valor D, os fatores que podem afetar a resistência térmica de microrganismos são os intrínsecos e os extrínsecos (REYNOLDS *et al.*, 1952; CAMERON *et al.*, 1980; BLOCHER & BUSTA, 1983).

Além do valor D, outro parâmetro determinado através da avaliação da resistência térmica é o valor z (STUMBO, 1973, RUSSEL, 1982, PFLUG, 1982). O valor z corresponde ao intervalo da temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes no valor D, ou seja, 1 ciclo logarítmico. Estes parâmetros são extremamente importantes na indústria de alimentos, em que o tempo de processamento ótimo e a temperatura devem ser estabelecidos para vários alimentos enlatados. A excessiva exposição ao calor prejudica a qualidade dos alimentos e, assim, é imperativo conhecer a menor temperatura e o mais curto espaço de tempo que efetivamente tratará o produto.

As bactérias esporuladas anaeróbicas estão entre os microrganismos a serem destruídos pelo tratamento térmico, neste grupo encontra-se o *Clostridium botulinum*, bactéria mesófila, produtor da toxina de maior letalidade entre as de origem biológica,

merecendo, portanto, medidas extremas de controle no sentido de se evitar sua presença nos alimentos enlatados de baixa acidez (LEITÃO & JUNQUEIRA, 1995).

Para evitar a contaminação da planta de processo por *C. botulinum*, é recomendado a utilização dos esporos de *C. sporogenes* (PA3679) nas usinas de processamento, a fim de evitar a contaminação; não ser toxigênica, ser ligeiramente mais resistente, ter as mesmas necessidades fisiológicas e ter a habilidade de repetidamente produzir grandes quantidades ($>10^6$) de esporos com resistência térmica comparável (NCA, 1968; TOWNSEND *et al.*, 1956).

Com o objetivo de validar o processamento térmico desenvolvido para formulações de curau de milho modificado, que combina um tratamento térmico brando de pasteurização, redução do pH e da atividade de água do produto através do “Sistema de Embalagens Inoculadas”, foi determinada a resistência térmica de *C. sporogenes* PA3679, empregando-se o método do tubo TDT selado e recuperação de sobreviventes em meio DRCM (Differential Reinforced Clostridia Media).

METODOLOGIA

Extração da polpa ou creme de milho verde: Foram utilizadas espigas comerciais de milho (*Zea mays* L.) verde sadias com palha adquiridas na região de Campinas. No laboratório do GEPC/ITAL as palhas e estilos-estigma foram removidos manualmente e descartados. Os grãos de milhos foram removidos do sabugo com auxílio de uma faca. A extração da polpa dos grãos foi realizada em um minidespulpador (Food Processing Equipment, Série N° 186, S.O. N°3782) que possui um filtro em inox para separar e remover partículas de diâmetro superior a 0,5 mm da polpa.

Para a determinação da resistência térmica dos esporos de *C. sporogenes*: seguiu-se a metodologia descrita por STUMBO (1973), substituindo-se os tubos TDT pelas ampolas de vidro com capacidade para 5,9 mL (14,3 mm de diâmetro externo, 43,5 mm de altura externa e 0,5 mm de espessura de parede), dos quais 2,5 mL foram ocupados pelos ingredientes do curau de milho: 67,25% de leite integral, 15,08% de creme de milho e 17,67% de sacarose. As ampolas contendo os ingredientes do curau de milho verde foram transferidas para potes de vidro e este foi fechado com uma tampa de polipropileno (Figura 1) para serem esterilizados a 121°C / 15 minutos em autoclave elétrica vertical (Phoenix modelo AV 75). O curau de milho esterilizado foi mantido sob refrigeração a 2,5±1°C.

Produção de esporos de *C.sporogenes* (PA3679): Foi utilizada uma cepa de PA3679, estocada na Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do ITAL e os esporos produzidos segundo DOWNES & ITO (2001).

Uma concentração de 2×10^4 NMP esporos/ml foram inoculadas em cada ampola contendo 2,5ml de curau de milho estéril e foram hermeticamente seladas com auxílio de um maçarico para fechar a parte superior (Figura 2). Os tratamentos térmicos foram realizados imergindo as ampolas em banho de óleo modelo UH4 (VEB MLW), nas temperaturas e tempos apresentados na Tabela 1.



Figura 1. Ampola de vidro contendo curau de milho e pote com tampa de polipropileno utilizado na esterilização.



Figura 2. Fechamento hermético das ampolas com chama de maçarico.

Imediatamente depois de decorrido o tempo pré determinado ao tratamento térmico, as ampolas foram resfriadas em banho de gelo, limpas e abertas com assepsia. A recuperação dos sobreviventes foi realizada nas próprias ampolas, adicionando-se 1,0mL de caldo DRCM (Differential Reinforced Clostridial Media) e posterior selagem com 2,0mL de vaspar (vaselina com parafina). A seguir, foram incubadas a 35°C até se obter leitura constante. O crescimento pôde ser observado pela produção de gás (por deslocamento do váspar) e turvação do meio pelos microrganismos (Figura 3).

Tabela 1. Temperaturas e tempos de exposição dos curais de milho verde contendo inóculos de *Clostridium sporogenes* PA3679.

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min.)
110	20
	40
	60
	80
	100
118	4
	8
	12
	16
	20
121	1
	2
	3
	4
	5

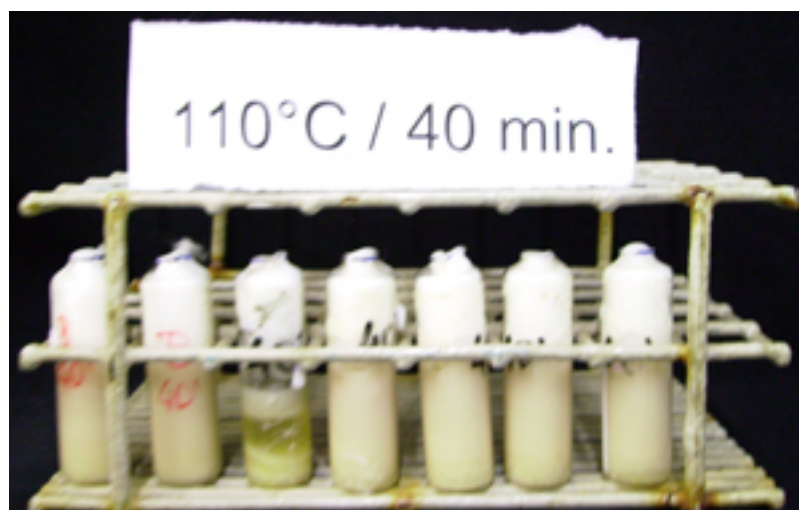


Figura 3. Ampolas contendo curau de milho, meio DRCM e váspar. A terceira ampola da esquerda para a direita apresenta turvação do meio.

Os valores D para cada temperatura do ensaio e o valor *z*, foram calculados empregando-se o procedimento de STUMBO *et al.* (1950). Os parâmetros D e *z* são importantes no projeto de um processo térmico, pois indicam, respectivamente, o

tempo para diminuição de 90% da população de esporos e a variação de temperatura necessária para diminuição em 90% do valor D.

$$D(\text{min}) = \frac{t}{\log(N_0) - \log(X)}$$

Onde,

t = tempo de tratamento térmico corrigido em minutos.

N₀ = número inicial de esporos.

X = Número Mais Provável de esporos sobrevivente (UFC / tratamento), calculado pela equação:

$$X = \frac{2,303}{a} \left[\frac{n}{q} \right]$$

Onde,

n = número de ampolas utilizadas em cada tempo de aquecimento.

q = número de ampolas estéreis após o período de incubação.

a = mL do substrato com inóculo submetido ao tratamento térmico.

O valor z pode ser determinado através da equação a seguir:

$$z = \frac{(T_1 - T_2)}{\log D_2 - \log D_1}$$

Onde,

T = temperatura (°C).

D = tempo de redução decimal (min.).

Os valores de D para cada temperatura do ensaio e o valor de z, foram calculados empregando-se o procedimento de STUMBO et al. (1950). Os parâmetros D e z foram obtidos por regressão linear dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de resistência térmica observados foram D_{110°C} = 14,48 minutos; D_{118°C} = 2,08 minutos e D_{121°C} = 0,60 minutos (Tabela 2). O valor médio de z obtido foi 7,67°C (os valores reais para intervalos de temperatura de 121 a 118°C, 121 a 110°C e, 118 a 110°C foram, respectivamente, 5,56, 7,95 e, 9,49). Estes valores são concordantes com alguns dos trabalhos sobre o assunto. O valor z observado está na faixa que STUMBO (1973) reportou para esporos de *C.sporogenes* PA3679, entre 7,8 e 10,0°C e valores de D_{121°C} entre 0,1 e 1,5 minutos. Esse valor de z observado é um pouco inferior em relação aos citados em outros trabalhos revisados, com destaque

para as publicações de GOLDONI et al. (1980), STUMBO (1973) e CAMERON et al. (1980). Nesse último, os autores, estudando a resistência térmica de *C.sporogenes* (PA3679) em solução tampão de fosfato e purê de ervilha tamponado, com valores de pH na faixa de 5,0 a 7,0 verificaram que o aumento da acidez, em geral, é acompanhado de um decréscimo da resistência térmica dos esporos, embora o efeito do pH seja mais pronunciado nas temperaturas de processamento mais elevadas do que nas baixas. GOLDONI et al. (2001) determinaram a resistência térmica de *C. sporogenes* (PA3679) em purê de cenoura, empregando-se o método do tubo TDT selado e recuperação de sobreviventes em meio de infusão de fígado e encontraram valores de $D_{115^{\circ}\text{C}} = 4,44$ minutos, $D_{118^{\circ}\text{C}} = 2,46$ minutos, $D_{121^{\circ}\text{C}} = 1,11$ minutos, e $z = 9,97^{\circ}\text{C}$. CAMERON et al. (1980) obtiveram para o *C. sporogenes* PA3679 em purê de cenoura valores de z que variaram de 9,2 (pH 5,0) a 12,2°C (pH 7,0). BLOCHER & BUSTA (1983) discutiram os resultados de vários autores com relação à resistência térmica de linhagens de *C. botulinum* 62A. Os valores de z encontrados ficaram na faixa de 8,61 a 9,93°C.

Tabela 1. Resultados da determinação da termorresistência dos esporos de *Clostridium sporogenes* PA3679.

Temperatura (°C)	Tempo de aquecimento (minutos)	Número de ampolas (tubos TDT selados)			Valores de $D_{110^{\circ}\text{C}}$ (minutos)
		Aquecidas	Positivas	Estéreis	
110	20	5	5	0	-
	40	5	2	3	9,96
	60	5	1	4	14,48
	80	5	1	4	19,31
	100	5	0	5	-
118	4	5	2	3	1,00
	8	5	3	2	2,08
	12	5	0	5	-
	16	5	0	5	-
	20	5	1	4	4,83
121	1	5	1	4	0,24
	2	5	0	5	-
	3	5	0	5	-
	4	5	1	4	0,97
	5	5	0	5	-

População de esporos na suspensão teste = 2×10^4 .

Média do valor $D_{110^{\circ}\text{C}} = 14,48$, desvio padrão = 4,68.

Média do valor $D_{118^{\circ}\text{C}} = 2,08$, desvio padrão = 1,97.

Média do valor $D_{121^{\circ}\text{C}} = 0,60$, desvio padrão = 0,51.

CONCLUSÕES

Os resultados de resistência térmica devem ser confiáveis, tanto para a determinação do processo teórico de esterilização, como para o estudo com embalagens inoculadas. Neste sentido, para a definição do ponto final de um processo térmico de preservação de alimentos, deve-se levar em conta uma especificação numérica bastante objetiva. Baseado nos resultados obtidos seria necessário um processo a 121°C durante 7,2 minutos para completar 12 ciclos logarítmicos de redução da população de esporos do PA3679, em curau de milho, nas condições do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOCHER, J. C., BUSTA, F. F. Bacterial spore resistance to acid. **Food Technology**, (11):87 – 99, 1983.
- CAMERON, M. S., LEONARD, S. J., BARRET, E. L. Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphat buffer and in buffered pea purée. **Appl. Environ. Microbiol.**, 39(5):943-949, 1980.
- DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4. ed. Washington: Americam Public Health Association - APHA, c. 24, p. 239-243, 2001, 676p.
- GOLDONI, J. S., KOJIMA, S., LEONARD, S., HEIL, J. R. Growing spores of PA3679 in formulation of beef heart infusion broth. **Journal of Food Science**, 45: 467-470, 1980.
- GOLDONI, J. S., TOSELLO, R., SCHMIDT, F. L. Determinação da resistência Térmica de *Clostridium sporogenes* (PA3679) em Purê de Cenoura. **Brazilian Journal**, 55, 2001.
- LEITÃO, M. F. F.; JUNQUEIRA, V. C. A. Microbiologia aplicada à esterilização de alimentos. In: **Princípios de esterilização de alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos**. 1995. p. 1-24.
- NATIONAL CANNER ASSOCIATION. Laboratory manual for food processors 3. ed. Westport, AVI, v. 1, 336, 1968.
- PERKINS, J. J. Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences, 2ª ed., Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1983.
- PFLUG, I. J. Textbook for and introductory course in the microbiology engineering of sterilization processes. 5 ed. Minneapolis: Enviromental Sterilization Lab., 1982.
- REYNOLDS, H.; KAPLAN, A. M.; SPENCER, F. B.; LICHTENSTEIN, H. Thremal destruction of cameron's putrefactive anaerobe 3679 in food substracts. **Food Reasearch**, v. 17, n. 2, p. 153-167, 1952.
- RUSSEL, A. D. The destruction of bacterial spores. London: Academic Press, 1982.
- STUMBO, C. R. Thermobacteriology in food processing. 2. ed. New York, Academic Press, 329p., 1973.
- STUMBO, C. R., MURPHY, J. R., CONCHRAN, J. Nature of thermal death time curves for PA3679 and *Clostridium botulinum*. **Food Technol.**, 4(8):321-326, 1950.
- TOWNSEND, C. T., SOMERS, I. I., LAMB, F. C., OLSON, N. A. A laboratory manual for the canning industry. 2nd. Ed. NCA, Research Laboratories. Washington, D. C., 1956.



5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011
9 a 11 de agosto de 2011 – Campinas, SP
