República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1100575-0 A2

(22) Data de Depósito: 07/01/2011
(43) Data da Publicação: 21/05/2013
(RPI 2211)

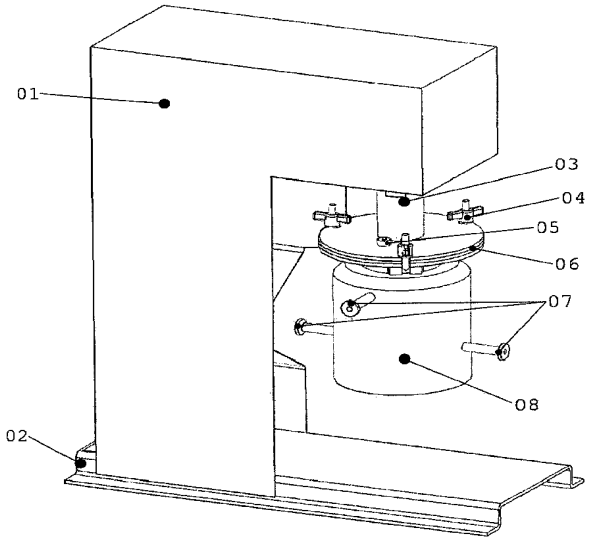
(51) Int.Cl.:
C12Q 1/00
G01N 33/483
G01N 33/00
G01N 3/34

(54) Título: EQUIPAMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE MICRORGANISMOS E COMPOSTOS SOB AÇÃO DE STRESS TÉRMICO E CISALHANTE, MÉTODO DE OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO E SEU USO

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

(72) Inventor(es): PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER, SALATIR RODRIGUES JÚNIOR

(57) Resumo: EQUIPAMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE MICRORGANISMOS E COMPOSTOS SOB AÇÃO DE STRESS TÉRMICO E CISALHANTE, MÉTODO DE OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO E SEU USO. A presente invenção se refere a um equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos e compostos sob ação de stress térmico e cisalhante onde o referido equipamento compreende: duas tampas; um copo cilíndrico de diâmetro interno Di; um rotor cilíndrico dediâmetro externo De, onde De é maior ou igual a O,9091*Di com extremidade inferior em forma de cunha circular; orifícios de entrada/saída de meio de aquecimento; uma câmara de cisalhamento formada pelo espaço entre o copo e o rotor; uma "Camisa", provida de uma manta de isolamento; e um motor controlado por variação de freqüência. A presente invenção também se refere ao método de operação do equipamento, bem como o uso do mesmo.



Relatório Descrito da Patente de Invenção Para: **"EQUIPAMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE MICRORGANISMOS E COMPOSTOS SOB AÇÃO DE STRESS TÉRMICO E CISALHANTE, MÉTODO DE OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO E SEU USO".**

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a um dispositivo desenvolvido para determinação de resistência térmica de microorganismos e componentes alimentícios sob ação de stress térmico e cisalhante. Mais preferencialmente, a presente invenção se refere a um dispositivo capaz de sofrer aquecimento ou resfriamento, enquanto aplica uma força cisalhante a um fluido contendo células vegetativas ou esporos de microorganismos cuja resistência se deseja determinar.

Antecedentes da Invenção

Os 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.

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.

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.

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 (e por tempos 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.

Atualmente, a determinação da resistência térmica de microrganismos é determinada de duas maneiras:

- pelo método dos tubos *thermal death time tube* (TDT) ou pelo método de tubos capilares, em que tubos de vidro são preenchidos com a suspensão do microrganismo a ser inoculado no alimento, e estes tubos são expostos a tratamentos térmicos com tempos crescentes;

- pela inoculação do microrganismo em grandes volumes

de produto e seu tratamento em plantas UHT/HTST;

O problema do primeiro método é que ele não permite a avaliação do efeito da taxa de cisalhamento, pois são tubos pequenos, dentro dos quais este efeito físico não se desenvolve em valores apreciáveis.

O problema do segundo método é que ele é dependente do equipamento usado, não permitindo grandes variações de Cisalhamento aplicado e tempo de aplicação, e estas duas variáveis ficam dependentes uma da outra - maior cisalhamento implica em menor tempo de aplicação e vice-versa

Segundo Stumbo, C.R. em seu livro intitulado: "*Thermobacteriology in Food Processing In Food Science and Technology - A series of monographs*", publicado pela Ed. Academic Press, Nova York e Londres, em 1965, descreve que as 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 alimentícios 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, aquecem-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, se limpa 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 de Bigelow e Esty, sendo possível interpolar os dados com razoável confiança.

Stumbo, em 1965, em seu livro intitulado: "*Thermobacteriology in Food Processing In Food Science and*

Technology - A series of monographs" cita o desenvolvimento de um aparelho chamado termoresistômetro, que consiste de 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

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, em seu livro intitulado *"Continuous Thermal Processing of Foods"*, publicado pela editora Aspen Publications, Maryland, EUA, em 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.

No artigo intitulado *"Thermal death kinetics of Bacillus stearothermophilus spores at ultra high temperatures"*, publicado no Journal of Food Technology, 12, p.149-161 em 1977, Burton e colaboradores, reportaram que usando uma planta de processamento contínuo de injeção direta, alcançaram um 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.

Além de Burton, Daudin e Cerf, no artigo "*The effect of thermal shock on the thermal death of spores*" publicado no Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 10, p.203, em 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. 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 e do controle rigoroso da temperatura, 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.

Conforme apresentado por Busta em seu artigo intituado "Thermal Inactivation Characteristics of Bacterial Spores at Ultrahigh Temperature", publicado na Applied Microbiology, 15(3), p.640-645 em 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.

O pedido de patente alemão intitulado "*Inactivation of microorganisms using cavitation generator, introduces high level of destructive ultrasonic energy into fluid containing them*", depositado 17 de dezembro de 2002,em nome de Inst. Energetik und Umwelt Ggmb descreve aplicação de cavitação para inativar os microorganismos, onde estes estão parcialmente destruídos e /ou inativados. Suas células são rompidas e as enzimas são desnaturadas. A invenção utiliza um gerador de cavitação que opera em um rotor-estator. A grande desvantagem da invenção é não

proporcionar as condições existentes.

A patente americana US 7,001,571 intitulada "*Systems and methods for disinfection*" depositada em 24 de outubro de 2003, em nome de Forney Larry ; Pierson John e Georgia Tech. Research Corporation descreve um sistema de eliminação de microorganismos utilizando agitação para criar uma película do líquido e aplica-se luz UV. A grande desvantagem deste tipo de sistema PE e que somente pode ser aplicado para líquidos transparentes ou translúcidos.

No artigo de David, J.R.D. e Merson, R.L., intitulado: "*Kinetics - parameters for inactivation of Bacillus stearothermophilus at high temperatures*", publicado no Journal of Food Science, 55, p.488-493, 515, 1990 e o artigo de Fairchild, T.M e colaboradores, intitulado "Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in skim milk in a continuous flow processing system" , publicado no Journal of Food Science, 59(5), p.690-963 em 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. stearothermophillus* 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, levaria a uma estimativa de $D_{155°C}$ com erro de 69%, em relação ao valor D real verificado.

No artigo de Bunning, V.K. e colaboradores, intitulado: "*Thermal inactivation of Listeria monocytogenes within bovine milk phagocytes*", publicado na Applied and Environmental Microbiology, 54, p.364-378 em 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.

Loss e Hotchkiss no artigo intitulado "Determination of Thermal Inactivation Kinetics of Microorganisms with a Continuous Microflow Apparatus", publicado no Journal of Food Protection, V.67(11), p.2560-2564 de 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.

Arnaud e colaboradores publicaram um artigo intitulado "Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*", no Journal of Biotechnology, V.29(1-2), p.157-175 em 1993, onde 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 o tempo de sua fase de adaptação(λ), e sua taxa específica de crescimento(μ), foram melhorados em relação às culturas realizadas a 0 e a 72 Pa.

No artigo de Lange e colaboradores intitulado "*Effect of high shear stress on microbial viability*", publicado no Journal of Chemical Technology and Biotechnology, V.76(5), p.501-505 em 2001 verificaram o efeito de altas tensões de cisalhamento sobre a viabilidade de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisae*. 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. cerevisae*, 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) era devido à sua parede celular mais frágil.

Sahoo e colaboradores, no artigo intitulado "*Macro-Level and Genetic-Level Responses of Bacillus subtilis to Shear Stress* ", publicado na revista Biotechnology Progress, V.19(6), p.1689-1696 em 2003, descrevem 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. Sahoo e colaboradores, no artigo intitulado "*Intracellular reactive oxygen species mediate*

suppression of sporulation in Bacillus subtilis under shear stress", publicado na revista Biotechnology and Bioengineering, V.87(1), p.81-89 em 2004, 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 H_2O_2).

Varios documentos de patentes descrevem aparelhos para determinar a tensão de cisalhamento de um fluido.

A patente americana US 5,094,100, depositada em 11 de julho de 1990 descreve um aparelho para medir a tensão de cisalhamento de um fluido em que o stress de cisalhamento é determinado pela medida do movimento de uma extreminada de uma alavanca substancialmente rigida com a outra extremidade tendo uma face ativa que forma uma superfície de medição das tensões de cisalhamento.

A patente americana US 4,352,287, depositada em 23 de junho de 1980 descreve um viscosímetro de rotação de cilindro controlado por microprocessador para a medição da tensão de cisalhamento em uma dada taxa de cisalhamento de um fluido. O fluido está contido entre um cilindro rotativo externo e um cilindro rotativo interno. O cilindro interno

gira em resposta ao torque produzido pela rotação do cilindro externo no fluido. A quantidade de rotação do cilindro interno está relacionada com a tensão de cisalhamento do fluido. O valor de estado estacionário da tensão de cisalhamento é obtido pela média de um número predeterminado de medidas tomadas ao longo de um intervalo de amostra para obter uma leitura de stress.

O pedido de patente americano US 2008/0173075, depositado em 16 de janeiro de 2008 descreve um aparelho para medição automática de reologia de fluidos, em que o referido aparelho inclui uma sonda, um tubo de torque acoplando um cilindro interno da sonda, um motor que aciona o cilindro interno, e uma placa de circuito programado para acionar o motor numa taxa de cisalhamento variável em uma maneira tempo-dependente. Um método automatizado de medição de reologia de fluido contínuo utiliza um viscosímetro automatizado para medição da reologia de fluidos em diferentes taxas de cisalhamento.

O pedido de patente americano US 2005/0032200, depositado em 16 de janeiro de 2008 descreve um aparelho de indução de tensão de cisalhamento. A invenção usa um disco cônico giratório no controle da velocidade angular dentro de um recipiente de cultura para induzir a tensão de cisalhamento uniforme e independente de posição em uma

solução salina contendo uma cultura de células.

A patente americana US 7,571,871, depositado em 04 de novembro de 2005 descreve um sistema de aplicação de cisalhamento para aplicar quantidades substancialmente uniforme de cisalhamento ao longo de uma amostra em pó. O sistema de aplicação de cisalhamento, de preferência inclui meios de acionamento mecanicamente conectados ao cilindro interno e meios de controle eletricamente conectados aos meios de acionamentos.

O pedido de patente internacional WO 2005/121310, depositado em 07 de junho de 2005 descreve um aparelho para realizar uma reação biológica ou bioquímica que, em certas modalidades, tem a capacidade de aplicar tensão de cisalhamento de um componente de uma amostra de líquido. O referido aparelho inclui um reator biológico ou bioquímico que compreende um recipiente com um volume inferior a cerca de 2ml, contendo uma amostra de líquido, e um elemento de geração de cisalhamento, o elemento de geração de cisalhamento está contido dentro do aparelho. O método de aplicação da tensão de cisalhamento ao componente da amostra de liquido inclui mover o elemento de geração de cisalhamento liquido ou gasoso dentro do aparelho ao longo de uma rota selecionada de movimento para criar um nível controlado e reproduzível de tensão de cisalhamento no

local selecionado dentro da amostra liquida.

Como pode ser observado nenhum documento do estado da técnica descreve ou sugere um dispositivo capaz de sofrer aquecimento ou refrigeração, enquanto se aplica uma força cisalhante a um fluido contendo células vegetativas ou esporos de microorganismos cuja resistência se deseja verificar.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Para solucionar os problemas acima mencionados, a presente invenção propiciará vantagens significativas em relação a um equipamento do tipo reator que simula o efeito da tensão de cisalhamento observada num sistema de aquecimento 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, possibilitando um aumento do seu desempenho e apresentando uma relação custo/benefício mais favorável

Este tipo de equipamento conhecido como Célula Mooney-Couette, nunca havia sido antes usado para determinação da taxa de destruição térmica de microrganismos sob cisalhamento. Com a presente invenção, foi possível provar que a aplicação de cisalhamento causa uma redução na resistência térmica de microrganismos; foi obtida uma

redução de 76% no valor do índice de redução decimal D de *Bacillus atropheus.*

Para causar o cisalhamento, foi concebido um equipamento a partir da idéia de um viscosímetro tipo "Mooney-Couette" (copo e bob), em que um fluido é contido entre dois cilindros concêntricos, e submetido a cisalhamento quando um destes cilindros é submetido à rotação constante.

O reator de cisalhamento da presente invenção é capaz de aplicar tensões de cisalhamento de até 9,82Pa em temperaturas de pasteurização (90,5 a 96,2°C ± 0,5°C).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A estrutura e operação da presente invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma poderão ser melhor entendidas mediante referência aos desenhos em anexo e às seguintes descrições:

A Figura 1 apresentada um desenho do equipamento montado. Nesta figura pode-se observar:

01 - Carenagem, recobrindo o motor;

02 - Base;

03 - Suporte de encaixe do sistema de aplicação de cisalhamento ao eixo do motor;

04 - Manoplas para fechamento do sistema;

05 - Orifícios para passagem de agulhas e termopares;

06 - Tampas;

07 - Orifícios para entrada e saída de meio de aquecimento;

08 - Parede externa do sistema;

A Figura 2 apresenta um corte transversal da vista lateral do copo e rotor do reator de cisalhamento construído. Nesta figura pode-se observar:

03 - Suporte de encaixe do sistema de aplicação de cisalhamento ao eixo do motor;

04 - Manoplas para fechamento do sistema;

06 - Tampas;

07 - Orifícios para entrada e saída de meio de aquecimento;

09 - Camisa para passagem de meio de aquecimento;

10 - Câmara de cisalhamento;

11 - Rotor, ou "*Bob*";

12 - Material de isolamento;

A Figura 3 apresenta um desenho esquemático em detalhe do copo e do rotor. Nesta figura, pode-se observar:

05 - Orifícios para passagem de agulhas e termopares;

10 - Câmara de cisalhamento;

11 - Rotor, ou "*Bob*";

13 - Gaxetas ("*O-rings*") para vedação;

14 - Parede do copo;

15 - Fundo do rotor em formato de cunha circular.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Embora a presente invenção possa ser suscetível a diferentes modalidades, é mostrada nos desenhos e na seguinte discussão detalhada, uma modalidade preferida com o entendimento de que a presente descrição deve ser considerada uma exemplificação dos princípios da invenção e não pretende limitar a presente invenção ao que foi ilustrado e descrito aqui.

A presente invenção refere-se a um método e equipamento que permite a determinação dos parâmetros de resistência térmica de microorganismos em fluidos, sob a ação de cisalhamento. Os resultados obtidos pela presente invenção indicam que os microorganismos têm menor resistência a tratamentos térmicos aplicados sob condições de cisalhamento. O uso do equipamento e método da presente invenção podem, portanto, levar a modelagem de novos tratamentos que causem redução na resistência de microrganismos ao calor, permitindo assim tratamentos térmicos mais brandos (temperaturas mais baixas, ou processos térmicos mais curtos), conservando as características de qualidade dos alimentos.

A presente invenção se refere de um equipamento desenvolvido para determinação de resistência térmica de

microorganismos e compostos sob ação de stress térmico e cisalhante. O equipamento da presente invenção foi construído baseado no viscosímetro de *Couette*, com dois cilíndricos concêntricos submetidos a cisalhamento á rotação constante.

A presente invenção é usada, principalmente, para a determinação de parâmetros cinéticos de inativação térmica de microrganismos em alimentos fluidos sob a ação de cisalhamento, tal qual verificado em produtos pasteurizados/esterilizados pelo método UHT/UAT.

A presente invenção também pode ser usada para a determinação de tais parâmetros cinéticos de vitaminas e outros compostos presentes em alimentos fluidos.

A presente invenção também serve para o desenho de novos processos térmicos sob a ação de forças de cisalhamento, as quais podem ser variadas para causar maior ou menor cisalhamento.

O equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos e compostos sob ação de stress térmico e cisalhante da presente invenção foi desenvolvido tendo as seguintes características:

- Copo de diâmetro interno Di, com profundidade P;
- Rotor de diâmetro De, de tal forma que a relação $Di/De \leq 1,1$, $De < Di$ e com extremidade inferior em forma de

cunha circular. O ângulo (θ) que a cunha circular faz com horizontal tem a finalidade de garantir que seja aplicado o mesmo cisalhamento, tanto na região inferior, como na região lateral do rotor. O cálculo de tal ângulo foi feito baseado no artigo de Steffe, J.F, intitulado "*Rheological Methods in Food Process Engineering*", 2ª edição, Ed. Freeman Press, 418p, 1996, incorporado aqui como referência em sua totalidade. Tal ângulo deve ser recalculado para diferentes dimensões de copo e rotor e deve obedecer à seguinte relação:

Equação 01 $$\tan(\theta) = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\alpha^2 - 1}{\alpha^2} \right)$$

Onde θ é o ângulo formado entre a cunha circular e a vertical, e α é a razão Di/De;

- "Camisa" através da qual o meio de aquecimento possa circular; ao redor da camisa, uma manta de isolamento, a fim de aumentar a segurança ao operador e estabilizar a temperatura;

- Construção em material resistente a oxidação e corrosão, preferencialmente, aço liso, de tal forma que as superfícies que entram em contato com o fluido a ser cisalhado possam ser esterilizadas por calor úmido, entre cada experimento.

O equipamento da presente invenção é equipado com um motor controlado por variação de freqüência, de modo que a velocidade de rotação possa ser variada, permitindo o controle sobre o cisalhamento aplicado.

A figura 01 apresenta um desenho esquemático do equipamento montado, onde pode-se visualizar (07) os pontos de conexão ao sistema de aquecimento (água quente) através de mangueiras flexíveis, (05) os orifícios para passagem das agulhas de inoculação/amostragem e termopares. Também pode-se visualizar, nesta figura, as (04) manoplas de fixação das (06) tampas ao copo. Protegidos pela (01) carenagem, estão o variador de freqüência e o motor, responsáveis por causar a rotação desejada ao rotor. Esses componentes são fixados à (02)base, que deve ser, preferencialmente, fixada a uma bancada por meio de parafusos.

Na Figura 02 pode-se visualizar novamente as (07) conexões para entrada e saída de água de aquecimento, que são do tipo conexão rápida, tipo "*tri-clamp*". O grande volume interno da (09) "camisa" tem por objetivo fornecer uma inércia térmica suficientemente grande para diminuir as variações na temperatura.

As duas (06) tampas do equipamento são fixadas ao mesmo usando três (04) manoplas para fechamento, em pontos

tais que formam ângulo de 120° entre si. A tampa superior possui em seu corpo um (03) encaixe de modo a conectar o sistema descrito no suporte e motor. Todo esse sistema, apresentado na Figura 01, foi construído em aço inox 316, à exceção do material isolante. Conforme mostrado na figura 02, este (12) isolamento encontrava-se entre a (08) superfície lateral externa e a (09) camisa.

Na especificação da presente invenção, 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 dá pelos orifícios inferiores, e a saída pelos orifícios superiores, a fim de aumentar a homogeneidade da temperatura do meio de aquecimento dentro da camisa.

Na Figura 3 é apresentado um desenho em detalhe do copo e do rotor, onde se pode observar:

(05) - Os orifícios equipados com adaptadores Ecklund C-5.2, guarnecidos com "O-rings", através dos quais foram passadas as agulhas de inoculação/coleta de amostras. Através desses mesmos orifícios passavam os termopares flexíveis tipo T, de espessura tal que não causavam vazamentos pelos orifícios, para coleta de dados de temperatura;

(13) - Os "O-rings" de vedação impedem que o líquido

interno saia de dentro da câmara através do espaço entre as tampas, quando o rotor estiver em funcionamento;

(14) - A parede do copo, que entra em contato diretamente com o meio de aquecimento, de modo a aquecer o fluido até a temperatura desejada. A parede do copo recebe tratamento de polimento para reduzir ao máximo a sua rugosidade superficial, a fim de reduzir efeitos de atrito devido a picos e vales da superfície. Durante o funcionamento do equipamento, o copo é mantido imóvel;

(11) - O rotor (ou "Bob"), responsável pela aplicação do cisalhamento propriamente dito. Tratava-se de um cilindro oco e polido, cuja extremidade superior possuía uma conexão para fixar-se ao eixo do motor e, na extremidade inferior, foi construído em forma de cone circular, cujo ângulo com a horizontal deve obedecer à Equação 01.

MODALIDADE PREFERENCIAL DA INVENÇÃO

O protótipo do invento foi construído e testado com as seguintes especificações:

- Copo com diâmetro interno de 100,0mm, e profundidade de 120,0mm;
- Rotor com diâmetro externo de 90mm e extremidade inferior em cunha circular, formando ângulo de 5,43° com a horizontal;

- Motor de 0,5CV para transmissão da rotação ao rotor;
- Com estas especificações, a capacidade interna total do reator era de 195mL; porém, testes preliminares indicaram que volumes maiores que 150mL causavam perda de fluido através do espaço entre o eixo do rotor e a tampa superior.

Foi usado um banho termostático (precisão ± 0,5°C), capaz de suportar um volume relativamente grande de água quente (60 litros), como fornecedor de meio de aquecimento para o Reator de Cisalhamento. Para bombear o meio de aquecimento, foi usada uma bomba centrífuga, 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 a temperatura obtida dentro da câmara de cisalhamento tinha estabilidade da ordem de 0,5°C.

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

O método de operação do equipamento se dá da seguinte maneira:

1) Esterilização, por calor úmido, das peças do sistema de aplicação de cisalhamento, embaladas separadamente. Estas peças são: Copo; Tampas; Rotor; "O-rings" de vedação (das tampas e dos orifícios); Agulhas de inoculação / coleta de amostra; Peça de vedação Ecklund C-5.2; Termopares flexíveis;

2) Montagem do sistema em capela de fluxo laminar, com vistas à manutenção da esterilidade. Enchimento do copo com 146,5ml de água estéril, assepticamente;

3) Flambagem, com bico de Bunsen, 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 aproximadamente 2000 RPM, e espera de cerca de 40 a 60 minutos para que o sistema atinga a temperatura de teste;

8) Inoculação de 1,5 ml de suspensão do microrganismo alvo através da agulha de inoculação, usando seringa descartável estéril e bico de Bunsen para flambagem dos utensílios e manutenção da esterilidade ambiente;

9) Imediatamente à inoculação, usando outra seringa descartável estéril, injetados 2ml de água destilada estéril através da agulha de inoculação, a fim de arrastar esporos que tenham sido retidos e completar o volume de 150 ml;

10) Com outra seringa descartável estéril, imediatamente após a injeção de água estéril, retira-se a primeira amostra, constituída de 1,5ml de suspensão de esporos, que é imediatamente resfriada em banho de gelo e levada para diluição e plaqueamento. Esta amostra compõe o tempo 0 (zero), e a partir de sua retirada marca-se o tempo de coleta de cada amostra. Imediatamente após a coleta desta amostra, injeta-se 1,5 ml de água destilada estéril, a fim de arrastar os esporos retidos na agulha;

11) Aos tempos programados, retira-se 1,5ml de amostra, a qual é resfriada, diluída e inoculada em placas com meio de cultura. No momento em que retira-se uma amostra, imediatamente injeta-se 1,5 ml de água destilada estéril;

12) A partir da 4ª amostra, elas são retiradas pela segunda agulha coletora;

13) Imediatamente após o resfriamento de cada amostra, as aliquotas são submetidas à diluição decimal apropriada, sendo transferidas para placas de Petri com

meio de cultura, e levadas à incubação à temperatura adequada ao crescimento do microrganismo alvo;

14) Após a incubação, os resultados estatisticamente significativos (entre 25 e 250) são usados para calcular a média. A partir das médias das contagens e dos tempos de tratamento térmico, é então calculado o valor do índice de redução decimal D, à temperatura de teste, mediante regressão linear do logaritmo dos dados de sobreviventes vs. tempo de aquecimento.

Após cada uso, o equipamento é esterilizado em autoclave (121°C/45min), para eliminar a população remanescente do microrganismo alvo.

A seguir, o copo e o rotor são lavados com uma esponja macia (a fim de evitar riscos na superfície de contato com o fluido), e enxaguados com água destilada a fim de evitar incrustações.

Assim, embora tenham sido mostradas apenas algumas modalidades da presente invenção, será entendido que várias omissões, substituições e alterações podem ser feitas por um técnico versado no assunto no equipamento e processo para determinação de resistência térmica de microrganismos e compostos sob ação de stress térmico e cisalhante, sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção.

É expressamente previsto que todas as combinações dos

elementos que desempenham a mesma função substancialmente da mesma forma para alcançar os mesmos resultados estão dentro do escopo da invenção. Substituições de elementos de uma modalidade descrita para outro são também totalmente pretendidos e contemplado.

Também é preciso entender que os desenhos não estão necessariamente em escala, mas que eles são apenas de natureza conceitual. A intenção é, portanto, ser limitada, tal como indicado pelo escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos e compostos sob ação de stress térmico e cisalhante **caracterizado pelo** fato de compreender:

- duas tampas;

- Copo com diâmetro interno De e profundidade Pe;

- Rotor com diâmetro externo Di, extremidade inferior em forma de cunha circular e comprimento Pi;

- orifícios de entrada/saída de meio de aquecimento;

- câmara de cisalhamento, formada pelo espaço entre Copo e Rotor

- Camisa;

- manta de isolamento;

- motor controlado por variação de freqüência.

2. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a razão entre o diâmetro maior e o diâmetro menor (De/Di) seja menor ou igual a 1,1.

3. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do referido rotor possuir diâmetro maior ou igual a 90,91% do diâmetro do copo.

4. Equipamento para determinação de resistência

térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o referido rotor possui extremidade inferior em forma de cunha circular formando um ângulo com a horizontal suficiente para que o cisalhamento entre o copo e o rotor, na região inferior, seja igual àquele na região lateral, o que é obtido se o mesmo obedecer à Equação 01.

5. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que ao redor da camisa encontra-se uma manta de isolamento.

6. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que a referida manta aumenta a segurança ao operador e estabiliza a temperatura.

7. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que sua construção é feita de material resistente a oxidação e corrosão.

8. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que o referido material resistente a oxidação e corrosão é preferencialmente aço inoxidável.

9. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as superfícies que entram em contato com o fluido a ser cisalhado são esterilizadas por calor úmido.

10. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o referido motor é controlado por variador de freqüência a uma velocidade de rotação variada.

11. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que o referido motor possui potência suficiente para que o rotor cause cisalhamento sobre o material em estudo.

12. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que o referido motor e o variador de freqüência são protegidos por carenagem.

13. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que o variador de freqüência e o motor transmitem a rotação desejada ao rotor.

14. Equipamento para determinação de resistência

térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o grande volume interno da camisa fornece uma inércia térmica suficientemente grande para diminuir as variações na temperatura.

15. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as duas tampas do sistema são fixadas ao equipamento usando três manoplas para fechamento, em pontos tais que formavam ângulo de 120° entre si.

16. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que a tampa superior possui em seu corpo um encaixe de modo a conectar o sistema no suporte e motor.

17. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que os quatro orifícios de entrada/saída de meio de aquecimento encontram-se diametralmente opostos, e em alturas diferentes do cilindro.

18. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a entrada de meio de

aquecimento é feita pelos orifícios inferiores, e a saída, pelos orifícios superiores.

19. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a parede do copo recebe tratamento de polimento.

20. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a durante o funcionamento do equipamento, o copo mantem-se imóvel.

21. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o rotor é um cilindro polido.

22. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que o rotor possui, na extremidade superior, uma conexão para fixar-se ao eixo do motor.

23. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que a extremidade inferior do referido rotor possui a forma de cone circular com um angulo de 5,43° com a horizontal.

24. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado pelo** fato de que a referida angulação garante que seja aplicado aproximadamente o mesmo cisalhamento na parte inferior e na lateral do rotor.

25. Equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a câmara de cisalhamento apresenta capacidade de processamento de, aproximadamente, 150 ml de fluido.

26. Método de operação do equipamento conforme definido pelas reivindicações 1 a 25 **caracterizado pelo** fato de que compreende as etapas:

a) Esterilização por calor por tempo programado das peças do equipamento de aplicação de cisalhamento, embaladas separadamente, em autoclave.

b) montagem do equipamento em capela de fluxo laminar com preenchimento do copo com água estéril, assepticamente;

c) esterilização do ponto de conexão do copo e do rotor com o resto do equipamento;

d) conexão do equipamento de aplicação de cisalhamento ao motor;

e) conexão das mangueiras de alimentação de meio de

aquecimento ao equipamento de aplicação de cisalhamento;

f) início do aquecimento do sistema de aplicação de cisalhamento;

g) ativação do equipamento de cisalhamento, a aproximadamente 2000 RPM

h) espera de cerca de 40 a 60 minutos para que o sistema atinja a temperatura de teste;

i) inoculação de 1,5 ml de suspensão do microrganismo alvo através da agulha de inoculação;

j) imediatamente à inoculação, com outra seringa descartável estéril, injeção de 2 ml de água destilada estéril, completando o volume de 150 ml;

k) retirada de amostra usando-se outra seringa descartável estéril, imediatamente após a injeção de água estéril;

l) injeção de água destilada, imediatamente após a coleta da amostra;

m) retiradas de amostras em tempos programado;

n) Imediatamente após o resfriamento de cada amostra, as aliquotas são submetidas à diluição decimal apropriada, sendo transferidas para placas de Petri em meio de cultura, e levadas à incubação à temperatura adequada para o crescimento dos sobreviventes do microrganismo alvo;

o) Após a incubação, os resultados estatisticamente

significativos, entre 25 e 250, são usados para calcular a média.

27. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que a referida esterilização da etapa (a) é por calor úmido.

28. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que a inoculação da suspensão do microrganismo da etapa (i) e a injeção de água destilada da etapa (j) é feita através de agulha de inoculação.

29. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que a injeção de água destilada na etapa (j) arrasta os esporos retidos.

30. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que as amostras mencionadas na etapa (k) são constituídas de suspensão de esporos.

31. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que as amostras mencionadas na etapa (k) são imediatamente resfriadas em banho de gelo e levadas para diluição e plaqueamento.

32. Método de operação do equipamento, de acordo com

a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que a primeira amostra da etapa (k) compõe o tempo 0 (zero), e a partir de sua retirada é marcado o tempo de coleta de cada amostra seguinte.

33. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que a injeção de água destilada na etapa (l) arrasta os esporos retidos na agulha.

34. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que as amostras retiradas nas etapas (k) e (m) são resfriadas, diluídas e plaqueadas.

35. Método de operação do equipamento, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que a partir das médias das contagens de microrganismos sobreviventes recuperados e dos tempos de aquecimento e cisalhamento, calcula-se o valor do índice de redução decimal D.

36. Uso do equipamento conforme definido nas reivindicações 1 a 26, **caracterizado pelo** fato de ser para a determinação de parâmetros cinéticos de inativação térmica de microrganismos em alimentos fluidos.

37. Uso do equipamento, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado pelo** fato de que os referidos alimentos fluidos são selecionados do grupo compreendido por produtos

pasteurizados/esterilizados.

38. Uso do equipamento, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado pelo** fato de que são para os produtos pasteurizados/esterilizados pelo método UHT/UAT.

39. Uso do equipamento conforme definido nas reivindicações 1 a 26, **caracterizado pelo** fato de ser para a determinação de parâmetros cinéticos de vitaminas e outros componentes alimentícios presentes em alimentos fluidos.

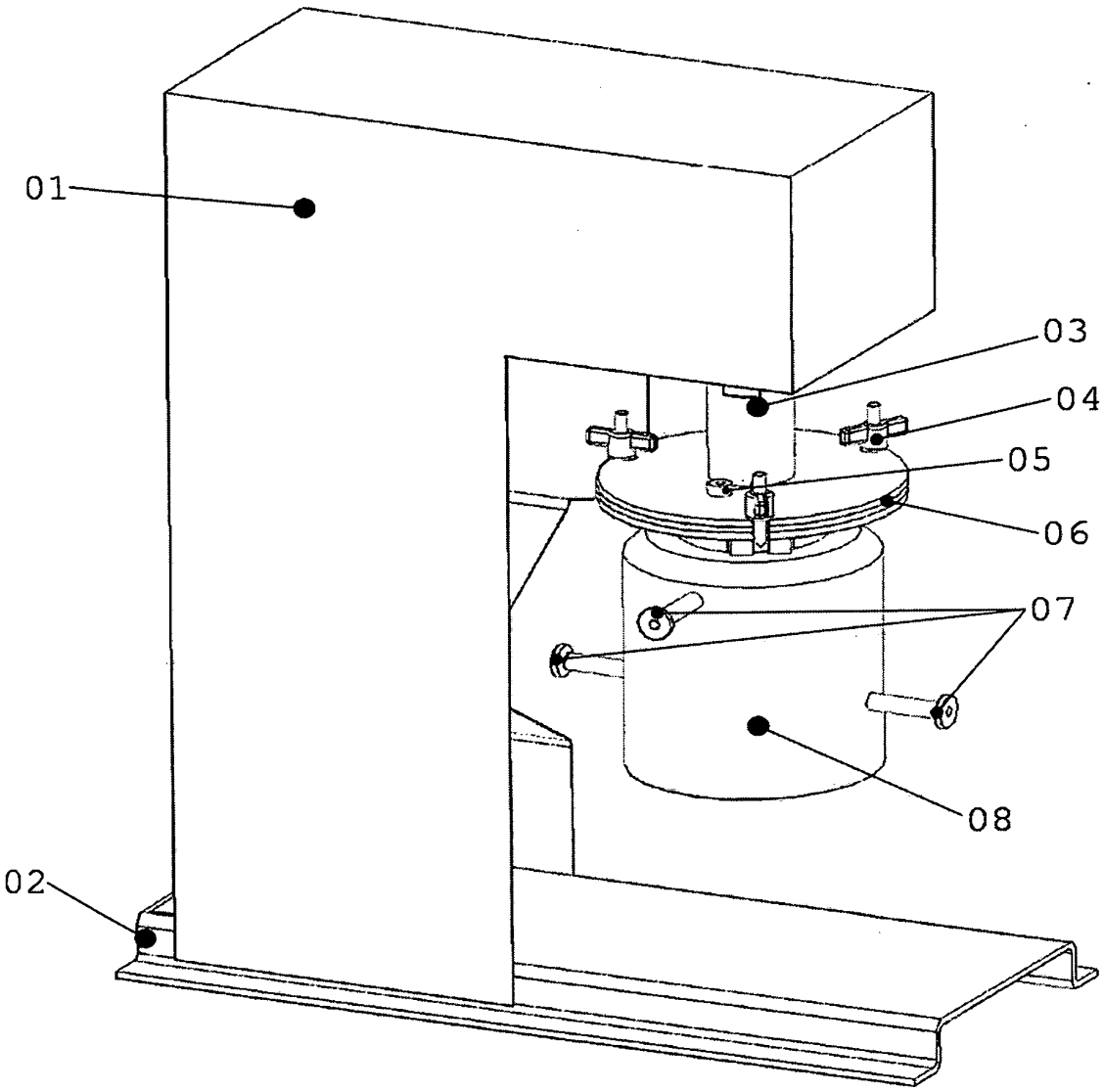


Figura 1

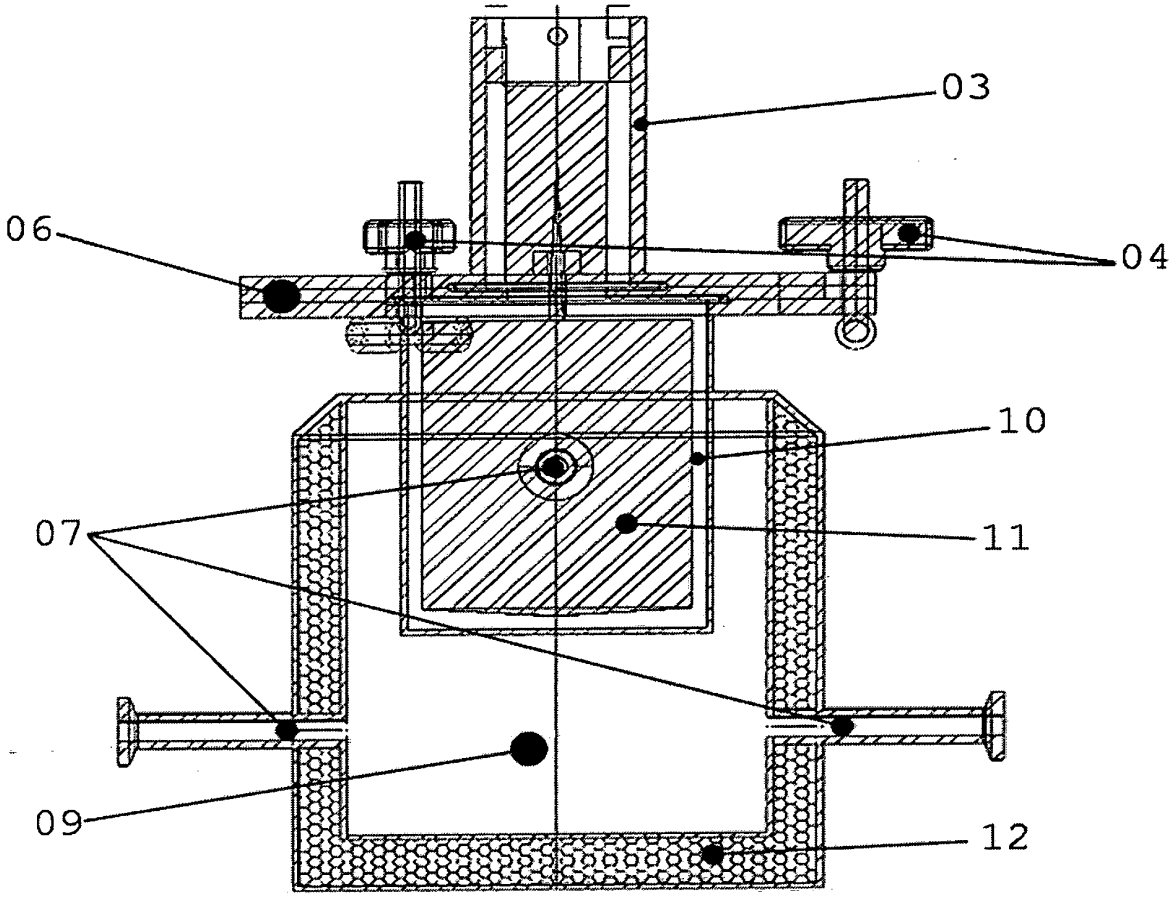


Figura 2

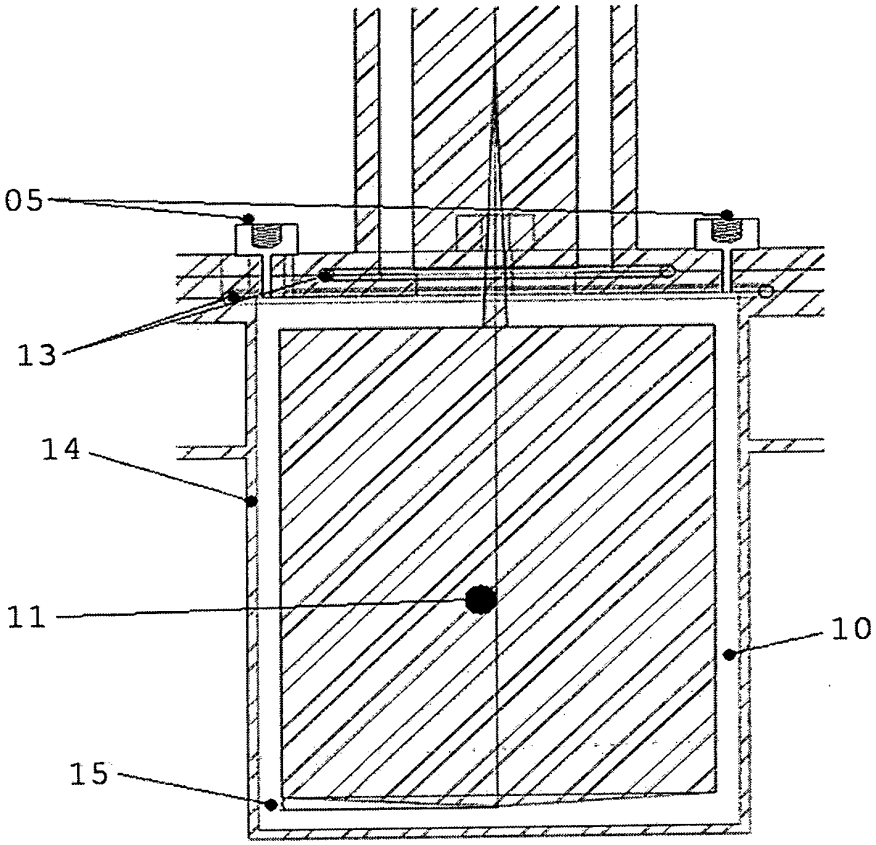


Figura 3

RESUMO

"EQUIPAMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE MICRORGANISMOS E COMPOSTOS SOB AÇÃO DE STRESS TÉRMICO E CISALHANTE, MÉTODO DE OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO E SEU USO"

A presente invenção se refere a um equipamento para determinação de resistência térmica de microrganismos e compostos sob ação de stress térmico e cisalhante onde o referido equipamento compreende: duas tampas; um copo cilíndrico de diâmetro interno Di; um rotor cilíndrico de diâmetro externo De, onde De é maior ou igual a 0,9091*Di , com extremidade inferior em forma de cunha circular; orifícios de entrada/saída de meio de aquecimento; uma câmara de cisalhamento formada pelo espaço entre o copo e o rotor; uma "Camisa", provida de uma manta de isolamento; e um motor controlado por variação de freqüência. A presente invenção também se refere ao método de operação do equipamento, bem como o uso do mesmo.