

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BELQUIS PALÁCIO GUIZELINI

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ESPOROS
DE *Geobacillus stearothermophilus* E SUA UTILIZAÇÃO EM INDICADOR
BIOLÓGICO PARA ESTERILIZAÇÃO A VAPOR.**

CURITIBA

2010

BELQUIS PALÁCIO GUIZELINI

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ESPOROS
DE *Geobacillus stearothermophilus* E SUA UTILIZAÇÃO EM INDICADOR
BIOLÓGICO PARA ESTERILIZAÇÃO A VAPOR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Socol.

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor e carinho dedicados durante toda a minha vida.
Ao Gustavo, pelos ensinamentos, paciência e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos e ao seu Diretor Geral Sr. Rubens Gusso, por permitir a realização deste trabalho nas dependências deste centro, em conjunto com a Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos e seu coordenador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, por acreditar na importância da biotecnologia para o desenvolvimento de novos produtos para a saúde pública, e permitir a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof. Luciana Vandenberghe pela orientação, paciência e apoio durante toda a realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à Sandra Sella, que me conquistou com seu entusiasmo e otimismo à adentrar ao mundo da pesquisa científica, pelos valiosos ensinamentos, carinho e paciência, e por sempre me incentivar a seguir em frente.

À Regina, Neuza, Elza e Elisete por toda a ajuda, pelo carinho e amizade que conquistamos em nosso convívio diário.

À Eva, Gisele e Júlia pela ajuda e realização de alguns testes em conjunto.

À Dirce pelas análises físico-químicas, e à todos os funcionários do CPPI que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha irmã Adhara e minha amiga Camila pelas importantes dicas, contribuições e pelo apoio.

À todos os colegas que passaram pelo laboratório, Kátia, Hindy, Pedro e Luiz Felipe pela ajuda, convívio e amizade.

À todos os meus amigos pela paciência, compreensão da importância da realização desta etapa da minha vida, e pelo apoio nas horas mais difíceis.

RESUMO

No Brasil a utilização de indicadores biológicos para processos de esterilização nos serviços de saúde é recomendada no mínimo semanalmente para monitorar a eficácia dos processos de esterilização. Indicadores biológicos consistem em esporos que apresentam uma resistência definida ao processo e um meio de cultura que proporcione o desenvolvimento destes esporos após submetidos ao processo de esterilização, se os mesmos ainda apresentarem viabilidade. Para processos de esterilização a vapor são utilizados esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, devido sua resistência ao calor úmido. Este trabalho objetivou desenvolver um novo processo de produção de esporos termorresistentes de *G. stearothermophilus* para a utilização em indicadores biológicos para esterilização a vapor, assim como realizar estudos para melhoria do processo de produção do indicador biológico. No processo de produção de esporos a primeira etapa estudada foi a produção do inóculo. Através de planejamentos experimentais formulou-se um novo meio de cultura contendo 0,6% de melaço de soja e 2% de extrato de carne, que apresentou um crescimento médio de $4,5 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹ e se mostrou viável na substituição do meio industrializado comumente utilizado (TSB). Na etapa de esporulação foi reduzido o tempo de incubação preconizado de 12 dias para 1 dia. Visando a utilização de fontes nutricionais não industrializadas, também foi desenvolvido um novo meio de esporulação com formulação de vinhaça de soja, 1,5%; extrato de levedura, 0,8%; ágar, 2%. A produção de esporos foi de 10^7 UFC.ml⁻¹, e quando utilizados no preparo de um indicador biológico com meio de recuperação a base de vinhaça de soja, apresentou valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 2,3 min e U_{sk} de 11 min, o que está dentro dos parâmetros preconizados pela legislação ($D_{121}^{\circ C}$ acima de 1,5 minutos e de U_{sk} entre 9 e 15 minutos). Com isso desenvolveu-se um novo IB formulado com subprodutos da soja que atende os pré-requisitos de produção. A partir do estudo comparativo entre os diluentes usados na recuperação e armazenamento da suspensão de esporos foi proposto a utilização de solução de acetato de cálcio 0,02 M pH 9,7, que proporciona uma maior resistência térmica aos esporos obtidos. Estudos realizados com o meio de recuperação do indicador biológico permitiram a determinação da concentração ideal do indicador de pH púrpura de bromocresol (entre 0,031 g.l⁻¹ e 0,016 g.l⁻¹) e a demonstração que meios de recuperação com baixas concentrações de carboidratos apresentam maior estabilidade da coloração após o teste. Também foi realizado um estudo das variáveis que interferem na resistência térmica dos esporos durante a esporulação, através de uma sequência de planejamentos experimentais. Concluiu-se que meios de cultura com menores concentrações de nutrientes fornecem esporos mais resistentes ao calor úmido. A variável que apresentou maior influência no processo foi o pH, sendo que valores de pH alcalinos, em torno de 8,5, contribuem para uma maior resistência dos esporos formados. Importantes contribuições foram feitas para a implementação no processo de produção de indicador biológico, e foi demonstrado que resíduos e subprodutos da indústria da soja podem ser utilizados como matéria prima no cultivo e esporulação de *G. stearothermophilus*, diminuindo os custos da produção de indicadores biológicos e reduzindo o impacto ambiental gerado pelos resíduos.

Palavras-chave: Esterilização. Esporos. *Geobacillus stearothermophilus*. Indicador Biológico. Melaço de soja. Vinhaça de soja.

ABSTRACT

Together with physical and chemical control, biological control is essential to ensure the effectiveness of sterilization processes. Utilization of biological indicators is recommended in Brazil at least once a week. Biological indicators consist in spores with a defined resistance to the process and a culture medium that allow its germination and outgrowth if it is still viable after the process. For steam sterilization process *Geobacillus stearothermophilus*'s spores are used, due to its resistance to wet heat. This work aimed at developing a new process for the production of heat resistant *G. stearothermophilus*'s spores for the utilization in biological indicator for steam sterilization. In the inoculum production stage, experimental designs were used to develop a new culture media. The developed media formulation was soybean molasses 0,5% and beef extract 2%, and presented a result of $4,5 \cdot 10^7$ CFU.ml⁻¹, been suitable for substitute the industrialized media TSB. In the sporulation process, studies allowed the reduction of incubation time of the media utilized by CPPI in the production of Esteriteste, from 7-12 days to 1 day. Aiming at use non industrialized nutritional sources, a new sporulation media was developed: soybean vinasses 1,5%, yeast extract 0,8% and agar 2%. The spore suspension concentration obtained was 10^7 CFU.ml⁻¹, and when used in biological indicator with a culture media based in soybean vinasses, presented a $D_{121}^{\circ C}$ of 2,3 min and U_{sk} of 11 min. A BI formulated with soybean residues was developed, that is in agreement with USP 29 ($D_{121}^{\circ C}$ above 1,5 minutes and U_{sk} between 9 and 15 minutes). A comparative study was made with liquid utilized in the recuperation and storage of spores suspension, and the utilization of calcium acetate 0,02 M pH 9,7 was suggested, due to the higher heat resistance presented by the spores. From the studies made with the biological indicator's recuperation media, the best concentration of bromocresol purple was determined (between 0,031 g.l⁻¹ e 0,016 g.l⁻¹), and was showed the recuperation media with low carbohydrate content presented better color stability after the test. Through a sequence of experimental designs, the variables which influence the heat resistance of spores during its sporulation were studied. The results showed that culture media with low nutrient concentration produce spores with higher wet heat resistance. The variable which presented higher influence was the pH, and alkaline pHs (around 8,5) contributes to a higher heat resistance of spores produced. Significant contributions were made to the biological indicator production processes, and it was showed that by-products and residues from soybean industry can be utilized as raw material in the cultivation and sporulation of *G. stearothermophilus*, diminishing costs in the production of biological indicators and reducing environmental impact caused by residues.

Keywords: Biological Indicator. *Geobacillus stearothermophilus*. Spores. Sterilization. Soybean molasses. Soybean vinasses.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

2 REVISÃO DA LITERATURA

3 MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 1 -	CURVAS DE SOBREVIVENTES DE <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8798 A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	24
FIGURA 2 -	INTEGRADOR QUÍMICO CLASSE 5 INDICANDO, DE CIMA PARA BAIXO, PROCESSO BEM SUCEDIDO, PROCESSO APRESENTANDO FALHA, E INDICADOR NÃO EXPOSTO....	27
FIGURA 3 -	FORMAS DE APRESENTAÇÃO COMERCIAL DE ESPOROS DE <i>G. stearothermophilus</i> . A) SUSPENSÃO DE ESPOROS B) EM SUPORTE DE PAPEL.....	30
FIGURA 4 -	IBS AUTOCONTIDOS COMERCIAIS.....	31
FIGURA 5 -	INDICADORES BIOLÓGICOS COMERCIAIS DEMONSTRANDO A COLORAÇÃO DO RESULTADO NEGATIVO (VIOLETA), POSITIVO (AMARELO), E APÓS LONGA EXPOSIÇÃO AO CALOR (CAMELO).....	31
FIGURA 6	ESPOROS DE <i>G. stearothermophilus</i> . MICROGRAFIA ELETRÔNICA COM AUMENTO DE 11.000X.....	33
FIGURA 7 -	CORTE DE CÉLULA DE <i>G. stearothermophilus</i> EM PROCESSO DE ESPORULAÇÃO. C- NÚCLEO. IC- CAPA INTERNA. OC- CAPA EXTERNA. MICROGRAFIA ELETRÔNICA COM AUMENTO DE 88.000X.....	33
FIGURA 8 -	ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE ESPORO DE <i>B. subtilis</i> DORMENTE (A) E GERMINADO (B).	35
FIGURA 9 -	ESQUEMA DO PROCESSO DE ESPORULAÇÃO DE <i>B. subtilis</i>	37
FIGURA 10 -	FLUXOGRAMA DO BENEFICIAMENTO DOS GRÃOS DE SOJA, OBTENDO COMO SUBPRODUTO O MELAÇO E COMO RESÍDUO A VINHAÇA.....	42
FIGURA 11 -	COMPOSIÇÃO MÉDIA DA FRAÇÃO DE CARBOIDRATOS DA VINHAÇA DE SOJA.....	44
FIGURA 12 -	ESTRUTURA DA ESTAQUIOSE E RAFINOSE E ENZIMAS QUE CATALIZAM SUA HIDRÓLISE.....	45
FIGURA 13 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO INDICADOR BIOLÓGICO.....	49
FIGURA 14 -	CURVA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	51
FIGURA 15 -	GARRAFA DE 200 ML UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS COM ÁGAR INCLINADO.....	52
FIGURA 16 -	ENVASE E SELAGEM DOS INDICADORES BIOLÓGICOS.....	54
FIGURA 17 -	INDICADORES BIOLÓGICOS AUTOCONTIDOS NEGATIVO (VIOLETA) E POSITIVO (AMARELO).....	54

FIGURA 18 - SEIS LOTES DE IBS PREPARADOS PARA O TESTE DE RESISTÊNCIA TÉRMICA.....	55
FIGURA 19 - EXEMPLO DE RESULTADO DO TESTE DE RESISTÊNCIA TÉRMICA PELO MÉTODO DA FRAÇÃO NEGATIVA.....	57

4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

FIGURA 1 - PLOTAGEM DAS MÉDIAS DOS MEIOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO DO INÓCULO. (1) MELAÇO E PEPTONA (2) MELAÇO E EXTRATO DE CARNE (3) MELAÇO E TRIPTONA	77
FIGURA 2 - MÉDIAS DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COMPLETO.....	78
FIGURA 3 - GRÁFICO DE PARETO PARA OS EFEITOS ESTIMADOS DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO SOBRE O CULTIVO DE <i>G. stearothermophilus</i> A UM INTERVALO DE 90% DE CONFIANÇA.....	79
FIGURA 4 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INOCULO, EM UM INTERVALO DE 90% DE CONFIANÇA.....	81
FIGURA 5 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE CONTOURNO PARA O DELINEAMENTO DO TIPO DCCR.....	81

5 PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

FIGURA 1- PLOTAGEM DAS MÉDIAS DA PRODUTIVIDADE DOS MEIOS PARA ESPORULAÇÃO CONTENDO MATÉRIAS PRIMAS INDUSTRIALIZADAS. MEIOS: (1) SELLA, 1995. (2)KIM E NAYLOR, 1966. (3)TSB E ÁGAR. (4)TSB, SAIS E AGAR. (5) CARMELO <i>et al</i> , 2002 MODIFICADO.....	94
FIGURA 2 - CURVA DE ESPORULAÇÃO DO MEIO 1 DURANTE 12 DIAS	96
FIGURA 3 - COLORAÇÃO DE GRAM DO ESFREGAÇO DO CRESCIMENTO DO MEIO 1 APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO. AUMENTO DE 100X.....	97
FIGURA 4 - COLORAÇÃO DE GRAM DO ESFREGAÇO DO CRESCIMENTO DO MEIO 1 APÓS 2 DIAS DE INCUBAÇÃO. AUMENTO DE 100X.....	97
FIGURA 5- COLORAÇÃO DE GRAM DO ESFREGAÇO DO CRESCIMENTO DO MEIO 1 APÓS 3 DIAS DE INCUBAÇÃO. AUMENTO DE 100X.....	97
FIGURA 6- PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>G. stearothermophilus</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. (1) MELAÇO E TRIPTONA (2) MELAÇO, TRIPTONA E SAIS (3) MELAÇO E EXTRATO DE CARNE (4) MELAÇO, EXTRATO DE CARNE E	

	SAIS (5) MELAÇO E PEPTONA (6) MELAÇO , PEPTONA E SAIS (7) MELAÇO 0,8% (8) MELAÇO 0,45% (9) VINHAÇA E EXTRATO DE LEVEDURA (10) VINHAÇA, EXTRATO DE LEVEDURA E SAIS (11) FARINHA (12) FARELO (13) FARINHA E MELAÇO (14) FARELO E MELAÇO (15) EXTRATO E MELAÇO (16) CONTROLE.....	104
FIGURA 7 -	RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS EM DIVERSOS MEIOS DE CULTURA. (1) MELAÇO E TRIPTONA (2) MELAÇO, TRIPTONA E SAIS (9) VINHAÇA E EXTRATO DE LEVEDURA (10) VINHAÇA, EXTRATO DE LEVEDURA E SAIS (16) CONTROLE.....	105

6 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE ESPORULAÇÃO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus*

FIGURA 1 -	GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DO PRIMEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A 90% DE CONFIANÇA.....	120
FIGURA 2 -	DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A 90% DE CONFIANÇA.....	123
FIGURA 3 -	DIAGRAMA DE PARETO PARA O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN.....	125
FIGURA 4 -	DIAGRAMA DE PARETO PARA A RESISTÊNCIA TÉRMICA DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN.....	127
FIGURA 5 -	GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS PARA A OTIMIZAÇÃO A 90% DE CONFIANÇA.....	128
FIGURA 6 -	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA – OTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A RESISTÊNCIA TÉRMICA.	129

7 ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

FIGURA 1 -	PLOTAGEM <i>BOX-AND-WISKER</i> DOS VALORES DE $D_{121}^{\circ C}$ DE ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA DEIONIZADA E ACETATO DE CÁLCIO.....	142
------------	--	-----

8 MEIO DE RECUPERAÇÃO

FIGURA 1 -	ESQUEMA DAS DILUIÇÕES DO PBC PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO.....	150
------------	--	-----

FIGURA 2 -	FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE PBC.....	151
FIGURA 3 -	FIGURA 3 – IBS PREPARADOS COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE PBC.....	154
FIGURA 4 -	IBS PREPARADOS COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE PBC APÓS 24H DE INCUBAÇÃO (RESULTADO DO EXPERIMENTO 1).....	154
FIGURA 5 -	IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS O PREPARO.....	156
FIGURA 6 -	IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS ESTERILIZAÇÃO DE 20 MIN A 121 ⁰ C.....	156
FIGURA 7 -	IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS ESTERILIZAÇÃO DE 60 MIN A 121 ⁰ C.....	156
FIGURA 8 -	IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS ESTERILIZAÇÃO DE 60 MIN A 127 ⁰ C.....	156

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

FIGURA 1 -	FLUXOGRAMA COM AS PRINCIPAIS ETAPAS DE PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO E AS CONTRIBUIÇÕES DESTE TRABALHO PARA O PROCESSO.	162
------------	---	-----

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

2 REVISÃO DA LITERATURA

3 MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE SOJA.....	43
TABELA 2 -	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA VINHAÇA DE SOJA.....	44

4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO DOS MEIOS PARA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO DO INÓCULO UTILIZANDO MELAÇO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO.....	74
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTURA.....	74
TABELA 3 -	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2^2 COMPLETO PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>G. stearothermophilus</i>	75
TABELA 4 -	MATRIZ DE EXPERIMENTOS DO DELINEAMENTO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.....	75
TABELA 5 -	NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.....	76
TABELA 6 -	RESULTADOS DAS CONTAGENS DE BACIOS VIÁVEIS DA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO PARA O MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.....	76
TABELA 7 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>G. stearothermophilus</i> EM MEIOS DE CULTURA COM MELAÇO DE SOJA E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.....	77
TABELA 8 -	RESULTADOS DAS CONTAGENS DE BACIOS VIÁVEIS DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 COMPLETO.....	78
TABELA 9 -	EFEITOS ESTIMADOS DO MELAÇO DE SOJA E EXTRATO DE CARNE NA PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>G. stearothermophilus</i> A UM INTERVALO DE 90% DE CONFIANÇA.....	78
TABELA 10 -	RESULTADO DAS DUPLICATAS DOS ENSAIOS DO DELINEAMENTO DO TIPO DCCR.....	80
TABELA 11 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O DELINEAMENTO DO TIPO DCCR.....	80
TABELA 12 -	VALIDAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.....	82

5 PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

TABELA 1 -	FORMULAÇÕES DOS MEIOS LIQUIDOS ADICIONADOS AO SUPORTE DA FES ESCOLHIDO.....	92
TABELA 2 -	FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE ESPORULAÇÃO CONTENDO FONTES NUTRICIONAIS ALTERNATIVAS.....	93
TABELA 3 -	CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DAS SUSPENSÕES OBTIDAS NOS MEIOS DE CULTURA INDUSTRIALIZADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO. MÉDIAS DAS DUPLICATAS EM UFC.ML ⁻¹	93
TABELA 4 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PRODUTIVIDADE DOS MEIOS DE CULTURA INDUSTRIALIZADOS PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS.....	94
TABELA 5 -	RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS EM DIVERSOS MEIOS COM MATÉRIAS PRIMAS INDUSTRIALIZADAS. RESULTADOS EM MINUTOS.....	95
TABELA 6 -	PRODUÇÃO DE ESPOROS NO MEIO 1 DURANTE 12 DIAS.....	96
TABELA 7 -	CONCENTRAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS PREPARADAS NO MEIO 1 NOS TRÊS PRIMEIROS DIAS DE CULTIVO.....	98
TABELA 8 -	RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS NO MEIO 1 (SELLA, 1995).	98
TABELA 9 -	RESULTADOS DA FES UTILIZANDO POLPA CÍTRICA COMO SUPORTE.....	100
TABELA 10 -	RESULTADOS DA FES UTILIZANDO CASCA DE SOJA COMO SUPORTE.....	100
TABELA 11 -	RESULTADOS DA FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA COMO SUPORTE.....	100
TABELA 12 -	RESULTADOS DA FES UTILIZANDO TAMPÃO DE ALUMINIO OU DE ALGODÃO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA COMO SUPORTES.....	102
TABELA 13-	RESULTADOS DA FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA COMO SUPORTE E DIFERENTES FONTES DE CARBONO ALTERNATIVAS.....	102

6 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE ESPORULAÇÃO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus*

TABELA 1 -	VARIÁVEIS E SEUS NÍVEIS ESTUDADOS NO PRIMEIRO PLANEJAMENTO DO TIPO PLACKETT-BURMAN.....	115
TABELA 2 -	MATRIZ DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN DE 16 ENSAIOS PARA O ESTUDO DE DEZ VARIÁVEIS (MATRIZ NÃO SATURADA).....	115

TABELA 3 -	VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT- BURMAN.....	116
TABELA 4 -	MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN DE 12 ENSAIOS PARA SEIS VARIÁVEIS (MATRIZ NÃO SATURADA).....	116
TABELA 5-	VARIÁVEIS E VALORES DOS NÍVEIS ESTUDADOS NO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	117
TABELA 6 -	MATRIZ DE EXPERIMENTOS DO DELINEAMENTO DCCR....	117
TABELA 7 -	NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR.....	118
TABELA 8 -	MATRIZ DOS EXPERIMENTOS DO PRIMEIRO DELINEAMENTO COM VALORES REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	119
TABELA 9 -	RESULTADOS DO PRIMEIRO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN E PONTOS CENTRAIS.....	119
TABELA 10 -	PRIMEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PB DE 16 ENSAIOS: EFEITOS ESTIMADOS A 90% DE CONFIANÇA.....	120
TABELA 11 -	RESULTADOS DO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	122
TABELA 12 -	EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A 90% DE CONFIANÇA.....	123
TABELA 13 -	RESULTADOS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	124
TABELA 14 -	EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT-BURMAN A 90% DE CONFIANÇA PARA O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS.....	125
TABELA 15 -	EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT-BURMAN A 90% DE CONFIANÇA PARA A RESISTÊNCIA TÉRMICA.....	126
TABELA 16 -	RESULTADO DOS ENSAIOS DO DELINEAMENTO DCCR.....	127

7 ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

TABELA 1 -	RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS IBS PRODUZIDOS COM ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA DEIONIZADA E SOLUÇÃO DE ACETATO DE CÁLCIO.....	141
TABELA 2 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TERMORRESISTÊNCIA DOS ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA E ACETATO DE CÁLCIO.....	142
TABELA 3-	VIABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS ARMAZENADAS EM ÁGUA DEIONIZADA E ACETATO DE CÁLCIO.....	143
TABELA 4 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VIABILIDADE DOS ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA E ACETATO DE CÁLCIO.....	143

8 MEIO DE RECUPERAÇÃO

TABELA 1 -	FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE RECUPERAÇÃO PARA TESTE DE ADIÇÃO DE GLICEROL NO MEIO DE CULTURA.....	152
TABELA 2 -	TESTE DE VIABILIDADE DOS IB PREPARADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO CONTENDO GLICEROL.....	154
TABELA 3 -	TESTE DE INTERVALO DE SOBREVIVÊNCIA/MORTE DOS IB PREPARADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL.....	155

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

TABELA 1 -	CUSTO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE UM LOTE DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>G. stearothermophilus</i>	163
------------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

Ca-DPA - Dipicolinato de cálcio

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*

CPPI- Centro de produção e Pesquisas de Imunobiológicos

D - Tempo de redução decimal

$D_{121^{\circ}\text{C}}$ - Tempo de redução decimal à temperatura constante de 121°C.

DBO - Demanda biológica de oxigênio

DCCR - Delineamento experimental do tipo Composto Central Rotacional

DPA - Ácido dipicolínico

DQO - Demanda química de oxigênio

FES - Fermentação em estado sólido

IB - Indicador biológico

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

N_0 - Número inicial de microrganismos no indicador biológico após preparado

PBC - Púrpura de bromocresol

POP - Procedimento operacional padrão

SAL - *Sterility Assurance Level*

SASP - *Small Acid Soluble Spore Proteins*

TSA - *Tryptone Soy Agar*, Ágar de Soja Trypticaseína

TSB - *Tryptone Soy Broth*, Caldo de Soja Trypticaseína

U_{sk} - Tempo médio de morte

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1 OBJETIVOS.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 ESTERILIZAÇÃO POR CALOR ÚMIDO.....	22
2.2 DESTRUIÇÃO TÉRMICA DOS MICRORGANISMOS.....	23
2.3 MONITORAMENTO DOS PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO.....	25
2.3.1 Indicador biológico para esterilização a vapor.....	29
2.4 O MICRORGANISMO.....	32
2.5 Ciclo de vida: Germinação e Esporulação.....	33
2.6 Resistência dos esporos.....	37
2.7 PRODUÇÃO DE ESPOROS PARA USO EM INDICADOR BIOLÓGICO.....	39
2.8 SUB-PRODUTOS E RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA NO CULTIVO DE MICRORGANISMOS.....	41
2.8.1 Sub-produtos e resíduos da soja.....	41
2.8.2 Fermentação em estado sólido.....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 FASES DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	49
3.2 MÉTODOS UTILIZADOS.....	50
3.2.1 Cepa padrão.....	50
3.2.2 Preparo do inóculo.....	50
3.2.3 Preparo da suspensão de esporos.....	51
3.2.6 Resistência térmica.....	55
3.2.7 Viabilidade.....	57
3.2.8 Fermentação em estado sólido.....	57
3.2.8.1 Atividade de água, pH e umidade.....	58
3.2.9 Planejamento de experimentos e análise estatística.....	58
REFERÊNCIAS.....	61
4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO INÓCULO.....	72
4.1 INTRODUÇÃO.....	72
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.2.1 Seleção da fonte de nitrogênio.....	74
4.2.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção do inóculo.....	75
4.2.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.....	72
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.3.1 Seleção da fonte de nitrogênio.....	76
4.3.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção do inóculo.....	77
4.3.3 Otimização do meio de cultura do inóculo.....	79
4.4 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	83
5 PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	87
5.1 INTRODUÇÃO.....	87
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
5.2.1 Comparação entre meios de cultura industrializados.....	89

5.2.2 Fermentação em estado sólido.....	90
5.2.3 Esporulação com fontes nutricionais alternativa em ágar.....	91
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5.3.1 Produção de esporos em meios de cultura industrializados.....	93
5.3.2 Produção de esporos utilizando sub-produtos da agroindústria.....	99
5.4 CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
6 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE ESPORULAÇÃO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i>.....	112
6.1 INTRODUÇÃO.....	112
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	114
6.2.1 Estudo do efeito da composição do meio de produção sobre a resistência térmica dos esporos – Primeiro planejamento experimental Plackett-Burman.....	114
6.2.2 Estudo da influência do nível variáveis significativas sobre a resistência térmica dos esporos durante sua produção– Segundo planejamento experimental Plackett-Burman.....	115
6.2.3 Estudo do efeito da composição do meio de produção sobre a esporulação e resistência térmica dos esporos - Terceiro planejamento experimental Plackett-Burman.....	116
6.2.4 Etapa de otimização das variáveis significativas – Planejamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR).....	117
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
6.4 CONCLUSÃO.....	133
REFERÊNCIAS.....	136
7 ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	139
7.1 INTRODUÇÃO.....	139
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	140
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	141
7.4 CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS.....	145
8 MEIO DE RECUPERAÇÃO.....	147
8.1 INTRODUÇÃO.....	147
8.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	149
8.2.1 Determinação da concentração ideal de púrpura de bromocresol.....	149
8.2.2 Adição de glicerol ao meio de recuperação.....	151
8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	153
8.4 CONCLUSÃO.....	157
REFERÊNCIAS.....	158
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	160
10 CONCLUSÕES.....	164
11 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	166

1 INTRODUÇÃO GERAL

Por definição, esterilização é o processo pelo qual organismos vivos são removidos ou mortos até que não sejam mais detectados nos meios de cultura em que podiam se proliferar anteriormente. Como a esterilidade é um conceito absoluto e difícil de ser assegurada na prática, torna-se uma questão de probabilidade se ela foi alcançada ou não, portanto, um produto é considerado estéril quando a probabilidade de sobrevivência de um microrganismo viável esteja na ordem de 10^{-6} , ou seja, a probabilidade de se encontrar um microrganismo viável é de uma unidade em um milhão. Este nível de esterilidade é conhecido como nível de esterilidade assegurada, ou *Sterility Assurance Level* (SAL) (BLOCK, 2001).

Assegurar a eficácia do processo de esterilização é imprescindível em serviços de saúde assim como em laboratórios, indústrias farmacêuticas e de alimentos. A esterilização eficaz em autoclaves é garantida por um bom treinamento dos operadores, revisões periódicas do equipamento, controle dos parâmetros físicos do processo a cada ciclo e monitoramento periódico com indicadores químicos e biológicos.

Além dos controles mecânicos dos esterilizadores, indicadores químicos e biológicos são utilizados para monitorar a eficácia dos processos de esterilização. Os indicadores químicos comercialmente disponíveis servem para avaliar um ciclo de esterilização por meio de mudança de cor ou por mudança de estado sólido para líquido. Com estes indicadores o resultado é visualizado ao término da esterilização, entretanto eles apenas indicam a presença ou não do agente esterilizante e se uma determinada temperatura foi atingida, não avaliando outros parâmetros importantes em um processo de esterilização (relação entre tempo de exposição, concentração do agente esterilizante e biocarga), fornecendo assim um resultado subjetivo e podendo superestimar a eficácia de um processo de esterilização (LEE *et al.*, 1979; SCHNEIDER *et al.*, 2005).

Devido à natureza logarítmica da cinética de morte microbiana o indicador biológico (IB) se tornou o parâmetro escolhido para se garantir a SAL (U.S.P. 29, 2006c). Ele é uma ferramenta importante na prevenção de infecções hospitalares em serviços da saúde, fornecendo ao usuário do equipamento de esterilização informações sobre a eficácia do processo como um todo (FDA, 2007). Além da determinação da eficácia de um ciclo de esterilização, são usados também na

certificação de métodos seguros de descontaminação, no desenvolvimento e validação de um processo de esterilização adequado para um artigo em particular, e no monitoramento periódico de processos de esterilização e descontaminação estabelecidos.

Sua utilização na rotina de serviços de saúde é recomendada por órgãos nacionais e internacionais (AAMI, 2006a) e é uma exigência legal no Brasil (BRASIL, 2001). É recomendado o monitoramento biológico em equipamentos de esterilização no mínimo uma vez por semana, sendo que o ideal seria todos os dias em que o equipamento esteja em uso. Além disso, é indispensável o uso em toda a carga que contenha implantes, após a instalação, concerto, sinal de mau funcionamento do equipamento e falha na esterilização. (BRASIL, 1994; NBR ISO 11134, 2001)

O indicador biológico consiste em um número conhecido de microrganismos que possui resistência definida ao agente esterilizante, suspenso em um meio de cultura adequado (AAMI, 2006b; FDA, 2007). O meio de cultura (também chamado meio de recuperação ou caldo de revelação) deve possibilitar o desenvolvimento do microrganismo em questão depois de submetido ao processo de esterilização se este ainda estiver viável. Depois de efetuado o teste, deve ser incubado na temperatura e tempo recomendados para verificar a eficácia do processo. Se o microrganismo ainda apresentar viabilidade, significa que a esterilização não foi eficiente.

O sistema de teste biológico possui uma resistência definida a um processo específico de esterilização (AAMI, 2006a). Esta resistência depende da embalagem primária do produto, do microrganismo, do suporte em que ele está contido e o meio de cultura. A resistência do microrganismo é uma característica intrínseca da cepa, mas também é influenciada por fatores ambientais durante seu cultivo e armazenamento (PENNA *et al.*, 2000). É conhecido que a resistência térmica do microrganismo é influenciada por características ambientais como a temperatura e o pH durante o processo de esporulação, e o pH durante o processo de esterilização. A capacidade de germinação de esporos injuriados pelo processo de esterilização também pode ser afetada pela formulação do meio de cultura e pela temperatura de incubação (YOKOYA e YORK, 1965; LÓPEZ *et al.*, 1997, PENNA *et al.*, 2000).

A resposta deste microrganismo a fatores ambientais pode comprometer a qualidade do indicador biológico e acarretar em discrepâncias em sua especificação

e desempenho, justificando o estudo da produção do microrganismo e das variáveis críticas deste processo no contexto de sua utilização no produto em questão.

O Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos (CPPI), órgão da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, desde 1992 vem produzindo indicadores biológicos para controle de esterilização a vapor (Esteriteste) e distribuindo à rede pública de saúde, o que viabilizou a implantação deste controle em serviços públicos (SELLA, 2008b). Um levantamento realizado junto às Regionais da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná indicou que a produção mínima para suprir toda a demanda do Estado seria de aproximadamente 250 mil IBs por ano. Sendo o custo médio do IB comercial de R\$ 9,00 a unidade, o Estado necessitaria desembolsar em torno de R\$ 2.250.000,00 por ano para realizar o controle da esterilização de suas unidades (DLUGOKENSKI, 2008).

O custo de produção do Esteriteste é cerca de 20% menor do que os IBs comerciais, e pesquisas tem sido desenvolvidas na instituição com a finalidade de se reduzir ainda mais o seu custo e viabilizar uma maior produção. Visando sempre atender a legislação vigente e a melhoria contínua da qualidade de produto e eficácia do processo de produção é imprescindível à continuação de pesquisas na área.

A presente pesquisa objetivou realizar estudos em algumas etapas de produção do indicador biológico para esterilização a vapor, visando a melhoria do processo e o desenvolvimento de novos métodos de produção de esporos termorresistentes.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um novo processo de produção de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* para a utilização em indicador biológico para esterilização a vapor. Os objetivos específicos foram:

- Estudar diferentes meios de produção de inóculo de *G. stearothermophilus* visando otimizar sua produção;
- Desenvolver diferentes técnicas de produção de esporos de *G. stearothermophilus*;

- Avaliar a resistência ao calor úmido dos esporos produzidos para a sua utilização em indicador biológico para esterilização a vapor;
- Estudar os fatores que influenciam a termorresistência do esporo durante a sua produção;
- Verificar a estabilidade das suspensões de esporos armazenadas em diferentes soluções.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTERILIZAÇÃO POR CALOR ÚMIDO

O calor é o método mais confiável para o controle de microrganismos. Esterilização e descontaminação podem ser feitos por calor úmido ou calor seco. No primeiro método o material é aquecido na presença de vapor saturado, ou seja, com umidade relativa de 100%. O calor úmido pode ser considerado mais eficiente do que o calor seco pois, para eliminar um mesmo número de esporos, a 121°C são necessários 15 minutos a 20 minutos de exposição ao calor úmido, e mais de seis horas de exposição ao calor seco nas mesmas condições. O método de ação dos dois tipos de calor é o mesmo, a desnaturação de macromoléculas essenciais à célula, mas a diferença da eficiência se dá pela maior habilidade do vapor de transferir energia térmica letal às células, pois seu coeficiente de transferência de calor é quase três vezes maior que a do ar na mesma temperatura (CALBERG, 2005). Além disso, é bem conhecido que as proteínas são mais estáveis na ausência de água.

Hansen e Riemann (1963) descreveram o efeito da água sobre a resistência das proteínas ao calor em termos de atividade de água. O aumento da vibração causado pelo aumento da temperatura rompe as pontes dissulfeto (S-S) formando grupos SH livres. A água livre interage com os peptídeos livres formados, levando-os a estabelecer novas ligações entre eles. Se não há água livre suficiente a interação entre os dipolos dos peptídeos causa certa estabilização nas proteínas, e mais energia é requerida para mudar sua conformação.

A esterilização por calor úmido foi popularizada pelo uso das autoclaves, pois sua manipulação é simples, o método é relativamente barato e não poluente. É importante salientar que na utilização de autoclaves não é apenas o calor que mata os microrganismos, mas sim sua combinação com a umidade, portanto é importante o acesso do vapor saturado a todos os pontos da autoclave e a toda a carga (CALBERG, 2005).

O sucesso da esterilização a vapor depende de vários fatores como: a limpeza prévia do material a ser esterilizado, a qualidade do vapor, a distribuição da carga dentro da autoclave, embalagem adequada, boa instalação do equipamento e

sua manutenção regular (BRASIL, 1994). Os parâmetros de tempo, temperatura e pressão podem ser aferidos durante o processo por medidores do próprio equipamento. Para um monitoramento seguro e eficaz do processo como um todo (condições do equipamento, grau de saturação do vapor, calibração dos medidores de temperatura e pressão, manipulação do equipamento), a utilização de indicador biológico é essencial, pois ele pode fornecer resultados baseados na ação conjunta de todos os parâmetros dos quais depende o processo. O indicador biológico fornece evidência de eficácia desafiando o equipamento utilizado para esterilização com um grande número de esporos bacterianos altamente resistentes ao processo (AMI, 2006a).

2.2 DESTRUIÇÃO TÉRMICA DOS MICRORGANISMOS

A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos a uma determinada temperatura é considerada logarítmica, pois pode ser representada pelo modelo da curva linearizada semilogarítmica de sobreviventes. A plotagem gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes em relação ao tempo de exposição ao calor, à temperatura constante, resulta em curva linearizada decrescente (Figura 1).

A variação do número de sobreviventes em relação ao tempo de exposição é função do número de microrganismos inicialmente presentes, e é representada pela equação:

$$\log N_f = \log N_0 - \left(\frac{k}{2,303}\right) \cdot t$$

Onde:

N_f = número de microrganismos sobreviventes após determinado tempo de exposição;

N_0 = número de microrganismos no tempo inicial ($t= 0$);

k = Constante de velocidade específica de destruição por unidade de tempo (t);

t = tempo de exposição

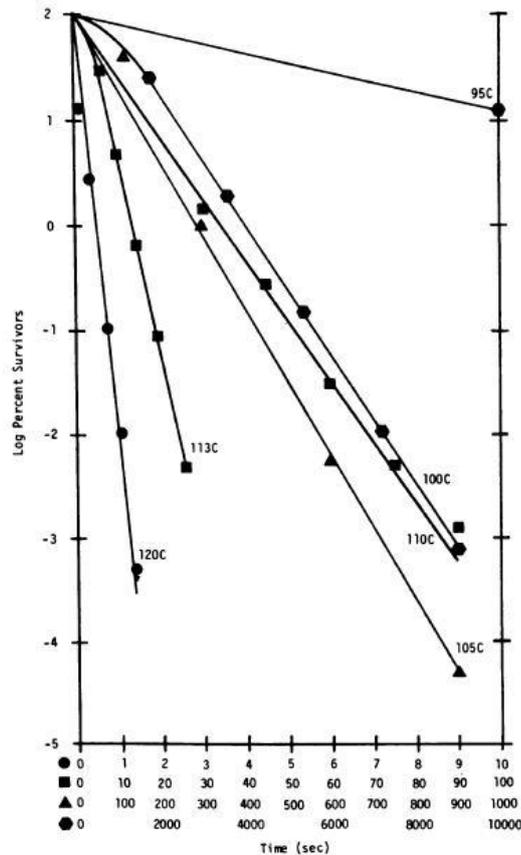


FIGURA 1 – CURVAS DE SOBREVIVENTES DE *Clostridium perfringens* NCTC 8798 A DIFERENTES TEMPERATURAS. FONTE: ADAMS, 1973.

A resistência específica a um certo agente esterilizante é dada pelo tempo de redução decimal (D) a uma temperatura constante de referência, que é o tempo necessário para atingir a inativação de 90% da população do microrganismo teste sob as condições de exposição determinadas (AAMI, 2006b). Ele pode ser determinado pelo inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta obtida da plotagem descrita anteriormente. Seu valor também pode ser determinado pela seguinte equação:

$$D_t = \frac{t}{\log N_0 - \log N_f}$$

Onde:

D_t = tempo de redução decimal a uma temperatura constante

O tempo total do processo de esterilização (também chamado de F) é em função do valor de D e da redução logarítmica dos esporos, e pode ser expressa da seguinte maneira:

$$F = D \cdot n$$

Onde:

$n = \log N_0 - \log N_f$, ou redução logarítmica da população.

Este é um parâmetro fundamental para estabelecer a letalidade de um processo de esterilização. Para indicadores biológicos, D seria o tempo de redução decimal do mesmo, N_0 a população inicial no indicador biológico e N_f o nível de esterilidade assegurada, logo n seria o número de ciclos logarítmicos necessários para reduzir a população do bioindicador até o nível de esterilidade assegurada (SAL). De acordo com a Farmacopéia Britânica um processo de esterilização por calor úmido deve fornecer um valor mínimo de F de 8 minutos (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 1992; citado por PENNA *et al.*, 2002). Considerando um nível de esterilidade assegurada de 10^{-6} , um indicador biológico com uma população inicial de microrganismos de 10^3 e um tempo de redução decimal de 2,2 minutos é capaz de garantir a SAL para um ciclo de esterilização de 20 minutos.

O tempo de redução decimal é a característica mais importante do indicador biológico usado para monitorar os processos de esterilização, e é dependente não apenas pela cepa do microrganismo contido nele, mas também pelas condições de sua esporulação e das características do produto como um todo, como seu meio de recuperação e embalagem (PENNA *et al.*, 2003). A Farmacopéia Americana USP 29 (2006a) recomenda que o valor de $D_{121^\circ\text{C}}$ do indicador biológico esteja entre 1,5 minutos e 3 minutos, e FDA (2007) faz referência apenas ao valor mínimo de 1,5 minutos.

2.3 MONITORAMENTO DOS PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO

Juntamente aos processos de esterilização, surgiu a necessidade de se atestar a esterilidade dos artigos processados, que incitou o estudo e desenvolvimento de dispositivos capazes de monitorar a eficácia dos processos.

Dentre as medidas de prevenção de infecção hospitalar, a mais crítica é assegurar a esterilidade dos artigos utilizados durante o procedimento cirúrgico. A

esterilidade dos artigos deve ser assegurada e deve possuir rastreabilidade, por meio do controle de qualidade e monitoramento dos processos de esterilização.

Atualmente, os artigos médico-hospitalares são classificados segundo o risco potencial de transmissão de infecções que representam. Os artigos críticos são aqueles que entram em contato com o tecido conjuntivo e ainda os instrumentos que tocam em pele e mucosa não íntegras. Estes artigos críticos devem estar obrigatoriamente esterilizados ao serem utilizados, pois apresentam um maior risco de infecção cruzada. Os artigos semicríticos entram em contato apenas com mucosa íntegra, devendo estar esterilizados e apenas aqueles que não podem ser esterilizados por procedimentos físicos ou químicos aceita-se a desinfecção. Os artigos não-críticos são os que entram em contato com pele íntegra e ainda os que não entram em contato direto com o paciente, para estes se utiliza desinfecção (APECIH, 2010).

Para assegurar a eficácia dos processos de esterilização, o monitoramento mecânico, físico, químico e biológico deve ser realizado (RUTALA *et al.*, 2008).

O monitoramento mecânico abrange os registros de validação, manutenção preventiva e corretiva, assim como os registros dos problemas observados durante a prática diária.

O monitoramento físico abrange o controle e registro dos parâmetros físicos do processos (tempo, temperatura e pressão) durante o transcorrer dos ciclos. Estes registros podem ser realizados manualmente pelo operador do esterilizador, ou pelo próprio equipamento de esterilização e fornecido por meio de uma impressora acoplada.

O monitoramento químico é realizado por meio de indicadores e integradores químicos que resultam em mudança de cor quando submetidos ao ciclo de esterilização. Segundo a norma ANSI/AAMI/ISO (2006), os indicadores químicos podem ser classificados da seguinte maneira (APECIH, 2010) :

- Classe 1- indicadores de processo: indicam a exposição ao agente esterilizante; consistem em tiras de papel impregnadas com tinta termocrômica; podem estar fixados na própria embalagem, e também estão disponíveis na forma de fita (fita zebra) adesiva e etiquetas.
- Classe 2 – teste de Bowie-Dick : testa a eficiência do sistema de remoção de ar em autoclaves com sistema pré-vácuo, o teste consiste em uma pilha de 25 cm a 28 cm de altura composto de oito campos de tecido contendo uma folha

com um indicador químico em seu interior. Sua recomendação de uso é diária, antes da primeira carga processada.

- Classe 3 – indicadores de parâmetro único: reagem a apenas um parâmetro do processo de esterilização, normalmente à temperatura.
- Classe 4 – indicadores multiparamétricos: reagem a dois ou mais parâmetros do processo;
- Classe 5 – indicadores integradores: reagem a todos os parâmetros críticos do ciclo (Figura 2);
- Classe 6 – indicadores de simulação: reagem a todos os parâmetros críticos de um ciclo específico de esterilização. Também é conhecido como “verificação de ciclo”, pois só irá reagir se aproximadamente 95% do ciclo estiver concluído.



FIGURA 2 – INTEGRADOR QUÍMICO CLASSE 5 INDICANDO, DE CIMA PARA BAIXO, PROCESSO BEM SUCEDIDO, PROCESSO APRESENTANDO FALHA, E INDICADOR NÃO EXPOSTO. FONTE: WWW.SUMMERLIFE.COM

O monitoramento biológico é realizado por meio de dispositivos contendo uma população conhecida de microrganismos que oferecem resistência comprovada ao agente esterilizante do processo a ser monitorado. Os microrganismos utilizados são de acordo com o processo de esterilização avaliado (APECIH, 2010):

- vapor: *Geobacillus stearothermophilus*;
- calor seco: *Bacillus atrophaeus*;
- óxido de etileno: *Bacillus atrophaeus*;
- plasma de peróxido de hidrogênio: *Bacillus atrophaeus*;
- radiação gama: *Bacillus pumilus*.

Após o teste, eles devem ser incubados para se verificar se as cepas ainda são viáveis. O fabricante do indicador biológico deve indicar as condições de incubação e o meio em que os indicadores devem ser cultivados. A realização de testes biológicos deve ser, no mínimo, semanalmente, após cada manutenção ou suspeita de mau funcionamento do equipamento (APECIH, 2010).

O órgão americano *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda o monitoramento físico e químico de todos os ciclos, e recomenda também a não utilização dos itens processados se um dos mesmos indicar falha no processo (RUTALA *et al.*, 2008).

O CDC também recomenda o uso de indicadores biológicos em toda a carga que contenha itens implantáveis, e que os mesmos devem permanecer em quarentena até o resultado do indicador biológico. Em processos de esterilização a vapor, após um único resultado positivo de indicador biológico, itens que não sejam implantáveis não necessitam ser declarados não estéreis e não necessitam ser reprocessados, a não ser que outro tipo de monitoramento tenha apontado falha no processo. Se testes biológicos subseqüentes apresentarem resultados positivos, então os itens devem ser considerados não estéreis e devem ser reprocessados (RUTALA *et al.*, 2008).

A razão de utilização do integrador químico é a imediata comprovação dos parâmetros corretos durante o ciclo de esterilização, porém, sua utilização somente não resulta em um monitoramento completo do processo e não deve substituir o uso periódico do indicador biológico, visto que o integrador químico monitora as condições físicas do processo, enquanto o indicador biológico reproduz a resistência microbiana ao ciclo como um todo. A demonstração de que um microrganismo comprovadamente resistente ao processo foi inativado, implica na comprovação da inativação dos possíveis contaminantes da carga processada (RUTALA *et al.*, 1996).

Os instrumentos de medida de temperatura e pressão das autoclaves são insuficientes para assegurar as condições corretas de esterilização, visto que estes não são capazes de detectar vazamentos ou bolsões de ar dentro do equipamento, que resultam em postos de baixa temperatura (LEE *et al.*, 1979).

McErlane *et al.* (1992), em um estudo realizado em consultórios de operação odontológica na Inglaterra, indicou a través de monitoramento biológico falhas nos processos de esterilização nos seguintes esterilizadores: 4,9% de falha em

autoclaves químicas, 2,3 % de falha em autoclaves a vapor e 7,9% de falha em estufas.

Um estudo realizado por Naressi *et al.* (2004) entre cirurgiões-dentista em São José dos Campos-SP, verificou que 58% dos entrevistados relataram não utilizar nenhum tipo de indicador de esterilização, e nenhum dos profissionais participantes relatou o uso de indicadores biológicos.

Um estudo realizado por Corrêa *et al.* (2009), visando avaliar a eficácia da esterilização em estufas e autoclaves em consultórios odontológicos em duas cidades de São Paulo, demonstrou que, em 60,28% das estufas estudadas não era realizado monitoramento químico ou biológico, e dentre as autoclaves, 26,95% também não sofriam monitoramento. Quando as autoclaves foram submetidas ao monitoramento completo, o controle dos parâmetros físicos demonstrou 100% de eficácia do processo (tempo, temperatura e pressão corretos durante o ciclo), porém, o monitoramento químico e biológico apresentaram 5,5% e 2,8% de falha no processo, respectivamente.

É imprescindível que o treinamento do pessoal da saúde para a prevenção e controle de infecção hospitalar abranja o correto uso dos esterilizadores assim como seu monitoramento periódico. O uso incorreto de esterilizadores e a falta de monitoramento prejudicam a eficácia dos mesmos podendo acarretar em sérios problemas de contaminação dos instrumentais médico-cirúrgicos, levando a surtos de infecção hospitalar.

2.3.1 Indicador biológico para esterilização a vapor

Os primeiros indicadores biológicos consistiam em tiras de papel contendo esporos resistentes ao processo de esterilização, acondicionadas em um envelope que era submetido ao ciclo de esterilização junto com a carga (Figura 3 b). Esta tira era então transferida de forma asséptica a um meio de cultura apropriado e então incubado à temperatura de crescimento do microrganismo, por até sete dias. O resultado positivo do teste (indicando falha na esterilização) era visualizado pela turbidez do meio gerada pelo crescimento microbiano. A possibilidade de contaminação pela manipulação da tira de papel e a dificuldade de interpretação do resultado levaram ao surgimento dos indicadores biológicos chamados “auto-

contidos”, onde os esporos e o meio de cultura são acondicionados na mesma embalagem.

Os comercialmente disponíveis se apresentam de duas formas: o meio de cultura contido em uma ampola de vidro quebrável e os esporos em um suporte (tira de papel), ambos acondicionados em uma embalagem flexível que permite a quebra da ampola antes da incubação levando o meio em contato com os esporos. Outra forma de apresentação consiste em esporos diretamente em suspensão no meio de cultura (Figura 4). Esta geração de indicadores biológicos também possibilitou o desenvolvimento de uma leitura mais rápida e confiável (AMES e CLEMENT, 2007).



FIGURA 3 –FORMAS DE APRESENTAÇÃO COMERCIAL DE ESPOROS DE *G. stearothermophilus*. A) SUSPENSÃO DE ESPOROS B) EM SUPORTE DE PAPEL.
 FONTE: A-NAMSA BIOLOGICAL INDICATORS, 2008. B- MESALABS, 2010

Além dos meios de cultura terem se tornado mais especializados permitindo melhores condições de desenvolvimento dos esporos danificados pelo calor, esta geração de bioindicadores possui um indicador de pH que muda de cor na presença do crescimento microbiano pela acidificação do meio, os resultados são fornecidos em 24 horas ou 48 horas. O mais utilizado nos indicadores para esterilização a vapor é o púrpura de bromocresol (PBC) que mantém a cor violeta em soluções alcalinas ou levemente ácidas (pH 6,0 a 8,0) e adquire a coloração amarela em pHs ácidos (abaixo de 5,5). Assim, o indicador se apresenta na cor violeta, e se após o teste e a devida incubação se tornar amarelo é sinal de que o ciclo de esterilização não foi eficiente.



FIGURA 4 - IBS AUTOCONTIDOS COMERCIAIS
 FONTE: SGM BIOTECH, INC, 2010.

Durante o ciclo de esterilização alguns esporos podem não ser totalmente mortos ou inativados, podendo apenas sofrer danos em enzimas ou proteínas de seu sistema de germinação que aumentem sua exigência nutricional (MARQUIS *et al.*, 1994; CAZEMIER *et al.* 2001). O meio de recuperação do indicador biológico deve fornecer um crescimento adequado a estes microrganismos, sendo rico em carboidratos, proteínas e minerais. Devido à presença de carboidratos, o meio de cultura está sujeito a sofrer as reações de Maillard quando submetidos a longos ciclos de esterilização, podendo sofrer uma alteração de cor indesejada (Figura 5).

No processo de esterilização por calor úmido a letalidade dos parâmetros físicos pode ser mensurada biologicamente através do IB. A sobrevivência do indicador biológico depende de sua população inicial e da resistência da mesma ao processo. Para se assegurar que os parâmetros do processo desenvolvido resultam na SAL de 10^{-6} não é necessário uma população inicial de 10^6 microrganismos no IB. Isso porque a população inicial e o valor do tempo de redução decimal do indicador biológico estão inter-relacionados, portanto, valores de D adequados são suficientes para validar processos de esterilização e descontaminação (USP 29, 2006b)

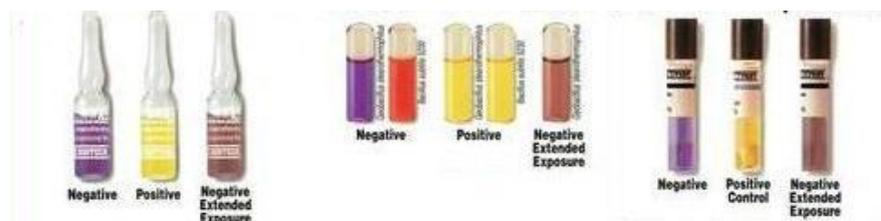


FIGURA 5 – INDICADORES BIOLÓGICOS COMERCIAIS DEMONSTRANDO A COLORAÇÃO DO RESULTADO NEGATIVO (VIOLETA), POSITIVO (AMARELO), E APÓS LONGA EXPOSIÇÃO AO CALOR (CAMELO).
 FONTE:

[HTTP://WWW.INDIAMART.COM/COMPANY/1652199/PRODUCTS.HTML](http://www.indiamart.com/company/1652199/products.html)

2.4 O MICRORGANISMO

O microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* é recomendado como bioindicador para monitorar processos de esterilização a vapor devido sua resistência ao calor úmido (FDA, 2007). Este microrganismo, na sua forma esporulada, também tem se mostrado resistente a processos de esterilização por microondas, vapor a baixa temperatura associado a agentes químicos como peróxido de hidrogênio e formaldeído (LATIMER e MATSEN, 1977; WRIGHT *et al.*, 1995; UNGER-BIMCZOK *et al.*, 2008), e tem sido utilizado para classificar agentes químicos esterilizantes de acordo com seu espectro de atividade (MASAADEH e JARAN, 2009). Possui grande potencial biotecnológico na produção de enzimas e metabólitos secundários como biosurfactantes, bacteriocinas e ácido láctico (SOLIMAN, 2008; GONDIM e PAZ, 2006; POKUSAEVA *et al.*, 2009; DANNER *et al.*, 1998, TALBOT e SYGUSCH, 1990).

Foi primeiramente descrito como *Bacillus stearothermophilus* por Donk (1920), que o isolou de milho enlatado e descreveu suas características termofílicas e de resistência ao calor. Este microrganismo está presente na classificação de Claus e Berkeley (1986) e devido a análise de 16sRNA e composição de ácidos graxos foi posteriormente inserido, juntamente a outras espécies, ao novo gênero *Geobacillus* (NAZINA *et al.*, 2001). Pode ser encontrado no solo, desertos, fontes geotérmicas, sedimentos oceânicos e alimentos (CLAUS e BERKELEY, 1986). Também é associado à deterioração “flat sour” de alimentos enlatados de baixa acidez, como milho, ervilha e aspargo (LIN *et al.*, 1968).

É uma bactéria termofílica formadora de endósporo (Figura 6 e Figura 7), aeróbia facultativa, fermentadora de glucose, frutose, manose e sucrose produzindo ácido e não gás. Possui habilidade de crescer as temperaturas de 37^oC a 75^oC, sendo a temperatura ótima entre 55^oC e 65^oC e o pH ótimo de crescimento 6,2-7,5 (CLAUS e BERKELEY, 1986; NAZINA *et al.*, 2001). Também utiliza maltose e hidrocarbonetos (C₁₀,C₁₁) como fonte de energia (NAZINA *et al.*, 2001).

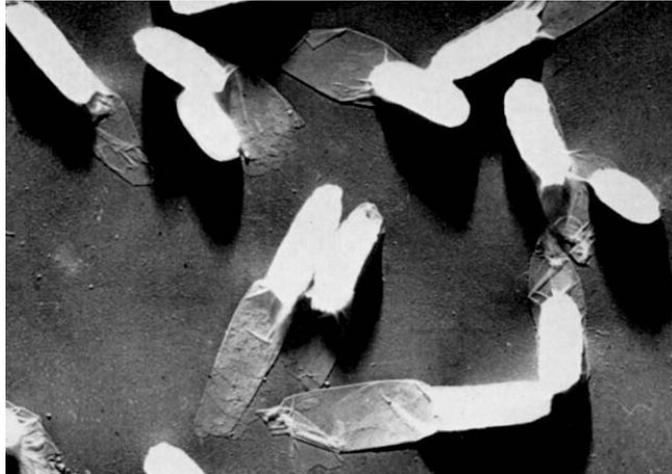


FIGURA 6 – ESPOROS DE *G. stearothermophilus*. MICROGRAFIA ELETRÔNICA COM AUMENTO DE 11.000X.
FONTE: WALKER e BAILLIE, 1968.

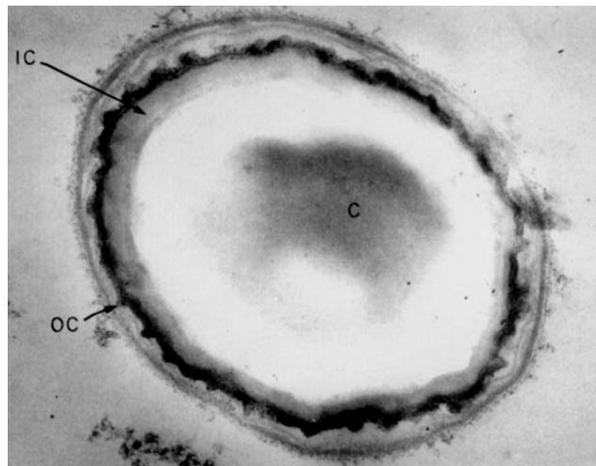


FIGURA 7 – CORTE DE CÉLULA DE *G. stearothermophilus* EM PROCESSO DE ESPORULAÇÃO. C- CERNE. IC- CAPA INTERNA. OC- CAPA EXTERNA. MICROGRAFIA ELETRÔNICA COM AUMENTO DE 88.000X. FONTE: WALKER E BAILLIE, 1968.

2.5 CICLO DE VIDA: GERMINAÇÃO E ESPORULAÇÃO

As bactérias formadoras de esporos como parte da flora do solo são vistas como oportunistas. Com o acesso ao substrato e germinantes propícios as formas esporuladas podem germinar e se desenvolver participando de diversos micro-habitats. A distribuição aérea de esporos dormentes pode explicar a ocorrência de espécies de *Bacillus* em habitats diversos (SLEPECKY e HEMPHILL, 2006).

O ciclo de germinação, multiplicação e esporulação vem sendo estudado sob muitos aspectos com diferentes espécies de formadores de esporos, mas devido a sua versatilidade genética, o *Bacillus subtilis* é o mais utilizado.

Revisões feitas por Moir (2006) e Setlow (2003) descrevem alguns eventos conhecidos associados à germinação dos esporos bacterianos. Uma ativação é necessária para dar início à germinação porém, esta é ainda um pouco desconhecida, podendo ser iniciada por moléculas simples como certos aminoácidos e ribosídeos (chamadas de germinantes) ou por certas condições independentes de nutrientes. Durante a ativação ocorre a perda de algumas proteínas da capa, ácido dipicolínico e Zn^{2+} e um aumento da fluidez da membrana. Após a quebra da dormência, uma série de reações degradativas é iniciada, podendo ser monitoradas pela perda da refratibilidade do esporo em microscopia de contraste de fase e diminuição da densidade óptica.

Nenhum germinante universal ainda foi descrito, mas alguns esporos requerem alanina ou glicose para germinação. Hipóteses sugerem que os germinantes agem sobre receptores de proteínas na membrana interna provocando mudanças conformacionais em sua permeabilidade. Isto leva ao lançamento de pequenas moléculas do cerne do esporo, principalmente ácido dipicolínico (DPA) quelado com íons divalentes, na sua maioria íons cálcio formando dipicolinato de cálcio (Ca-DPA), e a substituição destas moléculas por água. No estado dormente, os esporos mantêm um baixo nível de água para prevenir a atividade enzimática. Porém, a liberação de Ca-DPA causa uma ativação enzimática que termina por degradar o peptideoglicano do córtex do esporo (Figura 8). A hidrólise do córtex leva ao inchaço do núcleo e a absorção de água, possibilitando a atividade enzimática, metabolismo e síntese macromolecular, possibilitando então, o crescimento vegetativo (SETLOW, 2008).

Shah *et al.* (2008) reportaram um novo mecanismo que desencadeia a germinação. Demonstraram que esporos de *B. subtilis*, e certamente outras espécies, podem ter sua germinação desencadeada por concentrações extremamente baixas de muropeptídeos, produtos da degradação do peptideoglicano da parede celular da maioria das bactérias. Isto leva à teoria de que a germinação de alguns esporos pode desencadear a germinação de outros. Neste caso, se a resposta a este germinante (muropeptídeo) for muito sensível, a germinação inapropriada de um único esporo pode levar a germinação de toda a população em um ambiente desfavorável, causando sua morte (SETLOW, 2008).

Durante o início da germinação 20% das proteínas do esporo são degradadas fornecendo a fonte de aminoácidos para a biossíntese de novas proteínas e nucleotídeos durante a multiplicação (SETLOW e PRIMUS, 1975).

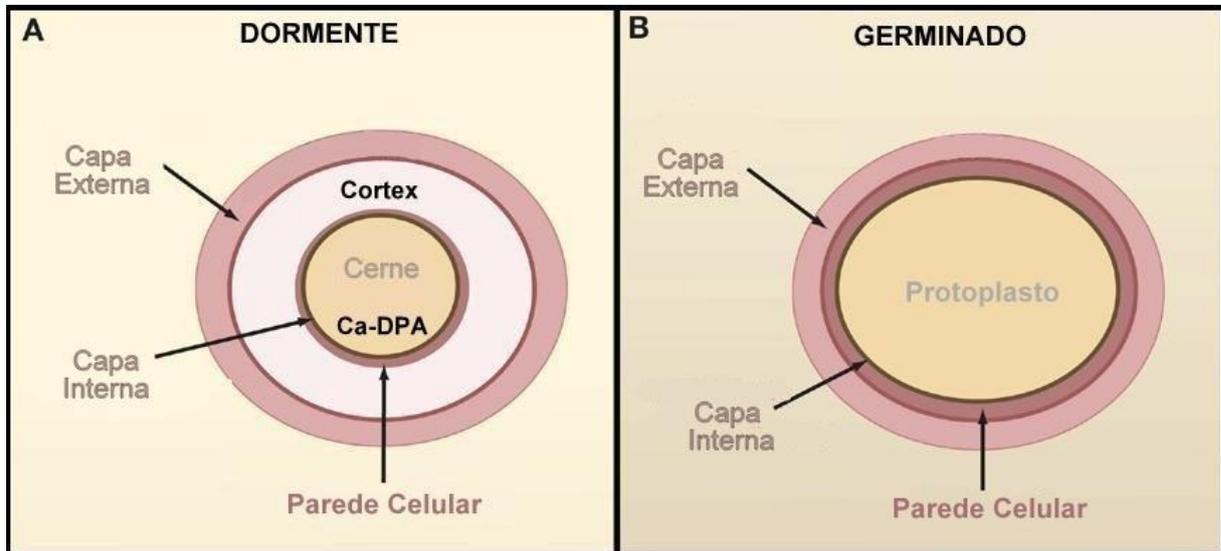


FIGURA 8 – ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE ESPORO DE *B. subtilis* DORMENTE (A) E GERMINADO (B).
 FONTE: ADAPTADO DE SETLOW, 2008.

O início da esporulação pode ser desencadeada por vários sinais do ambiente, como falta de nutrientes ou alta densidade de células. Isto leva uma subpopulação de células a mudar o seu programa genético resultando na formação de esporos (SONENSHEIN, 2000; ERRINGTON, 2003). Os fatores iniciadores da esporulação ainda não estão totalmente determinados, mas aparentemente a célula possui um sistema complexo e sofisticado para tomar a decisão de esporular, que monitora uma vasta gama de sinais internos e externos. O reconhecimento destes sinais inicia uma sequência de reações de fosforilação de proteínas-chave, chamada de *phosphorelay* (FUGITA e LOSICK, 2005; NGUELE *et al.*, 2010).

O número de eventos associados à esporulação é incerto, mas evidências genéticas sugerem que 200 genes em 50 *operons* estão envolvidos. A mudança de expressão genética associada a formação do esporo é conduzida pela ativação seqüencial de subunidades sigma (ou fatores sigma) da RNA polimerase, que adquire a capacidade de reconhecer diversas classes de promotores. A ativação destes fatores sigma em “cascata” (pois a ativação de um depende da ativação do fator precedente) é regulada em função dos sinais morfológicos que ocorrem nas sucessivas etapas de diferenciação (LOSICK *et al.*, 1986).

A esporulação não depende da idade da célula, tamanho ou tempo de divisão, a decisão de tomar o caminho da esporulação pode ter uma origem aleatória. Esta diferenciação pode ser uma estratégia de sobrevivência frente a um futuro incerto (em ambientes com muita flutuação), assegurando que pelo menos metade da população sobreviverá, ou da falta de nutrientes (os formadores de esporos) ou da reaparição destes (rápida multiplicação das células vegetativas). A estabilidade das células competentes não é irreversível, elas podem vir a se tornar esporos novamente (VEENING *et al.*, 2008).

O processo de formação do esporo é descrito em sete estágios (FOSTER, 1994; ERRINGTON, 2003; SETLOW, 2007). O desenho esquemático do processo pode ser visualizado na Figura 9. No estágio I o material nuclear está disposto axialmente em filamentos. No estágio II ocorre a segregação da cromatina concomitantemente com a invaginação da membrana plasmática em uma posição assimétrica da célula, formando um septo. No estágio III o esporo imaturo é envolvido por uma dupla membrana da célula mãe, em um processo semelhante à fagocitose. No estágio IV, a célula mãe produz o material que é depositado no córtex (similar ao peptidoglicano da célula vegetativa) e na parede celular. Ocorre também a formação e acúmulo de dipicolinato de cálcio no núcleo do esporo.

Durante o estágio V, capas protéicas são sintetizadas pela célula mãe. Em algumas espécies uma camada adicional chamada *exosporium* é sintetizada. Esta capa possui um papel muito importante na proteção do esporo, e apresenta muitas diferenças entre as espécies como a composição dos peptídeos estruturais e as proteases associadas. Estas diferenças podem ser responsáveis pela variação de certas propriedades de resistência entre as espécies.

No estágio VI, o esporo está maduro e se torna resistente ao calor e solventes orgânicos. No estágio VII, enzimas líticas provocam a lise da célula mãe liberando o esporo maduro. A atividade de algumas enzimas vegetativas desaparece, algumas permanecem e outras se modificam, e novas enzimas específicas da esporulação são sintetizadas.

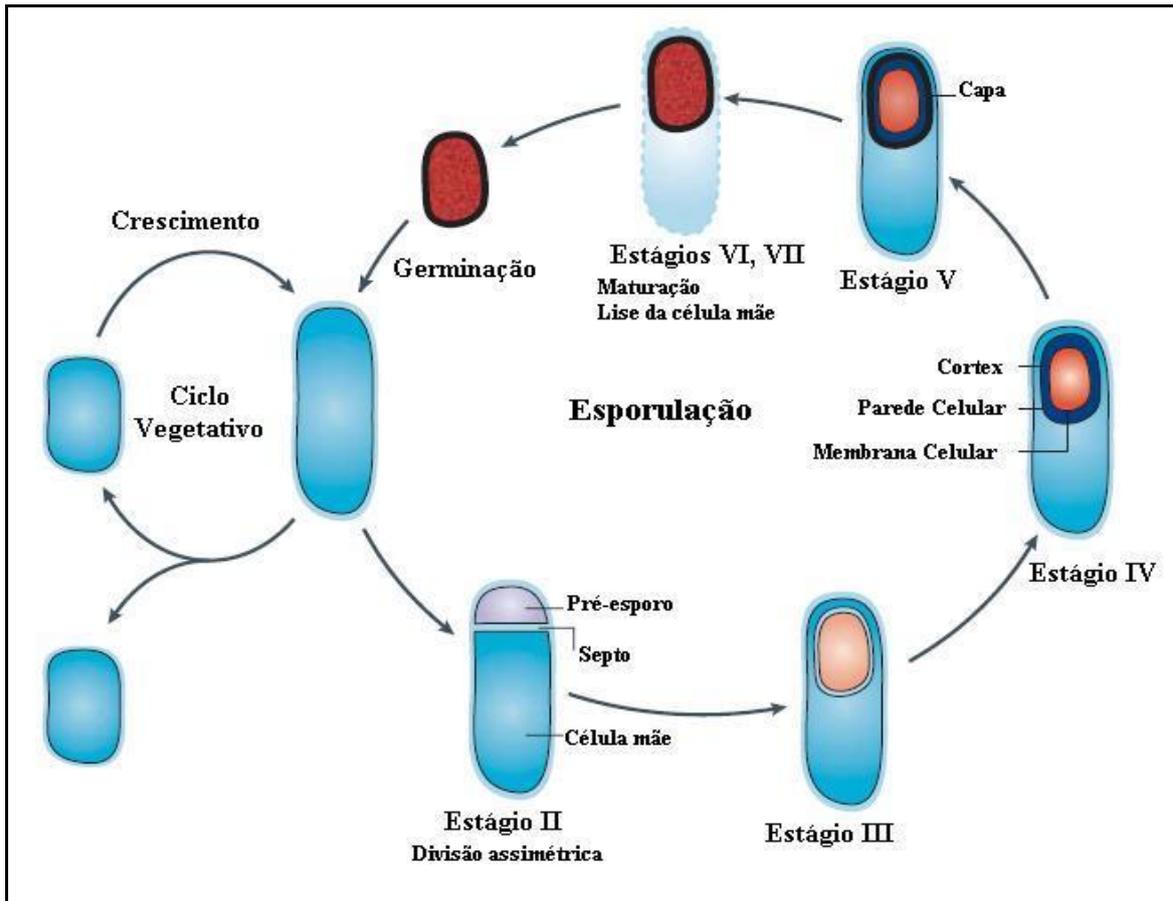


FIGURA 9 – ESQUEMA DO PROCESSO DE ESPORULAÇÃO DE *B. subtilis*.
 FONTE: ADAPTADO DE ERRINGTON, 2003.

2.6 RESISTÊNCIA DOS ESPOROS

Esporos bacterianos dormentes podem sobreviver durante centenas de anos devido suas propriedades fisiológicas (NICHOLSON *et al.*, 2000). Eles não exibem nenhum metabolismo detectável em água e podem sobreviver a tratamentos com radiação ultravioleta, dessecação, produtos químicos tóxicos e exposição ao calor (SETLOW, 2006). Esta sobrevivência e resistência são possíveis devido dois mecanismos que minimizam o dano ao DNA: a proteção e o reparo. O DNA está localizado no cerne do esporo, uma região com um baixo conteúdo de água e baixo pH (ambos menores do que em uma célula vegetativa). Nesta região também está presente uma grande quantidade de ácido dipicolínico (DPA), que corresponde a cerca de 20% do peso seco do núcleo (revisado por SETLOW, 2007). Ele está presente na forma quelada com cátions divalentes, predominantemente cálcio, resultando em Ca-DPA, e contribui para a resistência do DNA ao calor seco, calor

úmido, dissecação e peróxido de hidrogênio (SETLOW *et al.*, 2006). Outro fator é a saturação do DNA com as proteínas chamadas SASP (*Small Acid Soluble Spore Proteins*) que são sintetizadas no desenvolvimento do esporo e então degradadas quando completada a germinação. A estrutura do DNA se altera na associação com as SASP causando mudanças na sua reatividade química e fotoquímica (SETLOW, 1988).

A resistência ao calor varia entre esporos de espécies diferentes e também pode variar entre esporos da mesma espécie, e é influenciada pelos seguintes fatores: temperatura de formação do esporo, conteúdo de água no protoplasto, conteúdo mineral, temperatura ótima de crescimento do microorganismo e o córtex (GERHARDT e MARQUIS, 1989, citado por MARQUIS *et al.*, 1994).

Em geral, esporos termofílicos são mais resistentes ao calor úmido do que mesófilos (WARTH, 1978). A descoberta de microrganismos termófilos extremos e as necessidades industriais da enzimologia tem impulsionado a pesquisa de propriedades moleculares das proteínas que contribuem para a sua estabilidade e desempenho a altas temperaturas. A termotolerância das proteínas parece depender de pequenas mudanças em sua estrutura primária, que resulta em mudanças nas pontes dissulfeto, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas importantes para a manutenção das estruturas terciária e quaternária destas moléculas. Porém, existe uma grande individualidade para proteínas específicas, e uma dificuldade em se formular leis gerais para se prever termotolerância. As membranas de microrganismos termófilos são adaptadas para funcionarem a altas temperaturas devido a mudanças na composição lipídica e termoestabilidade das proteínas de membrana. As propriedades destas proteínas também parecem possuir um papel importante na resistência intrínseca do microorganismo (JEANICKE, 1991).

O fator mais importante que determina a resistência dos esporos ao calor úmido é o conteúdo de água no núcleo. Quanto menor o conteúdo de água, maior a resistência. (BEAMAN e GERHARDT, 1986; MELLY *et al.*, 2002). Segundo Beaman e Gerhardt (1986) esporos de diferentes espécies podem possuir entre 28% e 57% de água no protoplasto (peso úmido) dependendo de suas condições de termoadaptação.

O conteúdo de água no núcleo de uma única espécie e entre espécies diferentes pode variar de maneira significativa, esporos formados a temperaturas maiores geralmente possuem menor conteúdo de água do que os formados a

temperaturas menores, também possuindo maior resistência. Este também é um fator que contribui para que microrganismos termofílicos em geral sejam mais resistentes ao calor do que mesófilos (MELLY *et al.*, 2002).

O processo de desidratação do protoplasto se inicia durante a formação do esporo, que provavelmente contém cerca de 75% de água. Durante a maturação do esporo, a água que está mecanicamente presa, porém em seu estado livre começa a ser deslocada para fora do protoplasto, até um conteúdo mínimo de 28%. Este conteúdo corresponde a água que está em um estado ligado (BEAMAN E GERHARDT, 1986).

Também foi demonstrado que a presença de dipicolinato de cálcio está relacionada com a desidratação do núcleo. Esporos que não possuem a habilidade de sintetizar o dipicolinato são capazes de esporular, porém, possuem maior conteúdo de água no núcleo do que os que sintetizam o dipicolinato, possuindo também menor resistência (PAIDHUNGAT *et al.*, 2000).

A mineralização aumenta a resistência dos esporos em parte pela desidratação do protoplasto, e também por outros mecanismos. Em algumas espécies, como *Bacillus subtilis* var. *niger* (atualmente *B. atrophaeus*), sua resistência ao calor é fortemente afetada pela mineralização e desmineralização de seus esporos, porém para outras estes fenômenos não exercem papel fundamental (BENDER e MARQUIS 1985; MARQUIS e BENDER, 1985, YAMAZAKI *et al.*, 1997).

O córtex desempenha um papel essencial na resistência ao calor. Ele mantém o estado de desidratação osmótica atingida na esporulação, após a perda de potássio e água através da membrana. (MARQUIS *et al.*, 1983). O córtex é sintetizado ao redor do núcleo parcialmente desidratado e resiste ao movimento da água do protoplasto para dentro do esporo em formação. Papéis mais ativos foram propostos para o córtex na desidratação do protoplasto, como uma estrutura contrátil que responde a mudanças de pH e força iônica no ambiente (GOULD e DRING, 1975)

2.7 PRODUÇÃO DE ESPOROS PARA USO EM INDICADOR BIOLÓGICO

Para que o desempenho do bioindicador seja confiável, este deve apresentar características adequadas e padronizadas. Sua qualidade e desempenho são

influenciados pelas características do meio de cultura, dos esporos bacterianos, da embalagem e modo de apresentação (SMITH *et al.*, 1982), bem como suas condições de preparo e armazenagem (REICH e MORIEN, 1982; PENNA *et al.*, 2002). As características de resistência térmica (tempo de redução decimal e tempo de morte/sobrevivência) e a população de microrganismos presentes no indicador biológico são de suma importância e devem estar de acordo com as condições do tipo de esterilização a ser avaliada.

Do ponto de vista comercial, o microrganismo utilizado em indicadores biológicos deve ser não patogênico, possível de ser produzido em grande quantidade em um meio de cultura simples e de baixo custo, em um curto período de tempo, deve ser fácil de recuperar e deve manter suas características durante o armazenamento. Além disso, deve possuir resistência adequada ao processo ao qual é designado a monitorar, reprodutibilidade na resposta ao agente esterilizante, preferencialmente fornecendo curvas lineares semi-logarítmicas de sobrevivência (WRIGHT *et al.*, 1995; PENNA *et al.*, 2000).

É preciso avaliar e confirmar as características desejadas do microrganismo produzido para o uso no indicador biológico. É de extrema importância utilizar um meio de cultura que forneça esporos com características reprodutíveis a cada lote de produção. Estas características devem permanecer inalteradas sob armazenamento (PENNA *et al.*, 2000).

Hodges *et al.* (1980) verificaram variações entre esporos produzidos em meio complexo comercial de diferentes fornecedores com relação a sua resistência ao calor, glutaraldeído e antibióticos. Uma melhor reprodutibilidade foi demonstrada em esporos produzidos em meio definido e meio complexo de um único fabricante.

Wright *et al.* (1995) compararam os índices de esporulação de diferentes cepas de *Geobacillus stearothermophilus* em meios quimicamente definidos e demonstraram que nos meios semi-sólidos a esporulação foi mais satisfatória do que nos meios líquidos, e atribuíram estes resultados ao fato de que o meio semi-sólido possui uma maior área para troca gasosa, enquanto que no meio líquido, à temperatura de incubação do microrganismo (cerca de 55°C) a solubilidade do oxigênio é baixa, e sua escassez neste meio pode prejudicar a esporulação.

2.8 SUB-PRODUTOS E RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA NO CULTIVO DE MICRORGANISMOS

Um crescente aumento da preocupação com o meio ambiente vem tomando indústrias de diversos setores, direcionando uma utilização mais consciente de seus resíduos. Um exemplo é a indústria de álcool e açúcar, que há muitos anos vem utilizando o bagaço de cana para a geração de energia e a vinhaça para a fertirrigação. Mas avanços na indústria de biotecnologia tem oferecido novas oportunidades potenciais para uma utilização dos resíduos da agroindústria como o bagaço de cana, vinhaça, casca de café, bagaço de mandioca, e muitos outros.

Diversos processos que podem se utilizar destas matérias primas têm sido desenvolvidos para a geração de produtos finais com maior valor agregado como enzimas, biomoléculas e metabólitos secundários. Esta aplicação dos resíduos da agroindústria, além de fornecer um melhor destino aos mesmos, evitando problemas ao meio ambiente, pode contribuir para processos biotecnológicos com melhores rendimentos, menor custo e possibilitando o aparecimento de novos produtos e processos. (PANDEY *et al.* 2000a; PANDEY *et al.* 2000b; PANDEY *et al.* 2000c)

2.8.1 Sub-produtos e resíduos da soja

A soja é uma das mais importantes culturas para produção de grãos destinados à indústria para obtenção do óleo e o farelo. Pode ser usada na alimentação animal na forma de semente, casca ou farelo. A semente possui cerca de 40% de proteína, 35% carboidratos, 20% de gordura e 5% de cinzas em peso seco (CEGLA, 2005).

Atualmente o Brasil destina cerca de 23 milhões e 330 mil hectares para a produção de soja, rendendo um volume de 68 milhões e 50 mil toneladas na safra de 2008/2009, 15% a mais do que na safra passada (MESONES, 2010).

Por meio do esmagamento dos grãos de soja são obtidos três produtos distintos: o óleo, o farelo e a lecitina. O farelo de soja pode possuir de 43% a 58% de proteína bruta, em torno de 5% de matéria mineral, sendo fonte de cálcio e fósforo (MELO, 2004; MENDES *et al.*, 2004).

O farelo pode ser utilizado para a produção de proteína concentrada de soja (SPC) a partir da extração dos açúcares utilizando uma solução de álcool e água.

Este processo origina como sub-produto o melaço de soja, uma solução concentrada de açúcares (Figura 10). Este pode ser concentrado por meio de evaporação para facilitar seu transporte e armazenamento. Uma empresa paranaense produtora de SPC processa cerca de dois milhões de toneladas de grãos de soja por ano, dos quais 77% viram farelo. Deste farelo, 75% viram SPC e 25% viram melaço, o que representa uma produção anual de cerca de 500 mil toneladas de melaço de soja (FERREIRA, 2007).

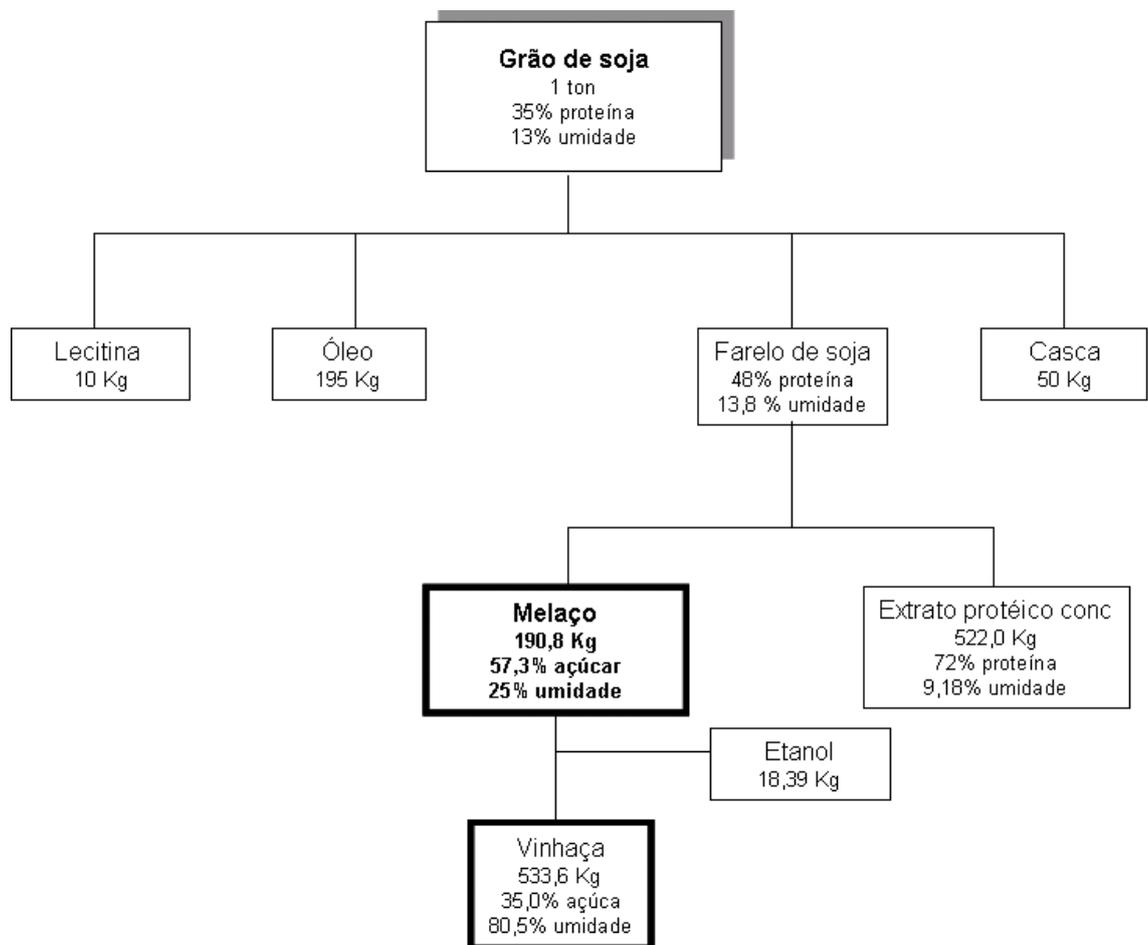


FIGURA 10- FLUXOGRAMA DO BENEFICIAMENTO DOS GRÃOS DE SOJA, OBTENDO COMO SUBPRODUTO O MELAÇO E COMO RESÍDUO A VINHAÇA FONTE: ADAPTADO DE SIQUEIRA (2006)

O melaço é uma matéria prima que impõe problemas ambientais de disposição, sendo utilizado principalmente como ingrediente de baixo custo para alimentação animal. Possuindo alta concentração de carboidratos, cerca de 57,3% em base seca (Tabela 1), seus oligossacarídeos são indigestos ao homem e animais monogástricos, por isso são associados a flatulência e ao desconforto ocasionados

pelo consumo da soja (CEGLA e SHUSTER, 2005). Devido ao baixo custo e à capacidade de alguns microrganismos de degradarem estes açúcares, o melaço de soja se mostra promissor como matéria-prima para meios de cultura em processos fermentativos.

A fermentação alcoólica do melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* converte apenas 50% do total de açúcares em etanol. Entre eles estão a sacarose, a glicose e a frutose. (SANADA, 2009).

A vinhaça de soja é um resíduo da produção do álcool de soja que possui alta concentração de compostos orgânicos, essencialmente açúcares não redutores. Devido à alta demanda biológica e química de oxigênio (DBO e DQO), a vinhaça não pode ser tratada como um efluente comum (SIQUEIRA, 2006). Seu aproveitamento pode contribuir para redução de custos com tratamento e eliminação, assim como prevenir contaminação ambiental. A vinhaça de soja contém cerca de 35,0% de açúcares (base seca) e 80,5% de umidade. Uma indústria paranaense que produz etanol a partir da fermentação do melaço de soja gera cerca de 220 m³ de vinhaça de soja por dia. Esta vinhaça é concentrada até 80°Brix e queimada para geração de energia para a indústria (SIQUEIRA, 2006).

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE SOJA. .

Componente	% em base seca
Glucose ¹	0,24
Frutose ¹	0,13
Galactose ¹	0,25
Sucrose ¹	28,40
Lactose ¹	--
Rafinose ¹	9,68
Estaquiase ¹	18,60
Carboidratos totais ¹	57,30
Proteína ¹	9,44
Lipídios ¹	21,20
Fibras ¹	5,70
Cinzas ¹	6,36
Umidade ²	12,3% (57°Brix)

Fonte: ¹ Siqueira, 2008 ² SELLA, 2008

A partir de quatro lotes de vinhaça de soja obtidas de uma indústria de produção de etanol, Dlugokenski (2008) determinou suas características físico-químicas (Tabela 2), e a partir da análise de quatorze lotes obteve a composição média dos açúcares contidos na fração de carboidratos (Figura 11).

A vinhaça de soja contém açúcares residuais que ainda podem ser consumidos por certos microrganismos, tornando-a uma fonte alternativa de nutrientes para processos fermentativos. Os principais açúcares são a estaquiase e a rafinose, oligossacarídeos com ligações do tipo α -1,6 que podem ser hidrolisados pela enzima α -galactosidase (Figura 12). A rafinose é um trissacarídeo composto por três hexoses (α -galactose + α -glicose + α -frutose), e a estaquiase é um tetrassacarídeo composto por quatro hexoses (α -galactose + α -galactose + α -glicose + α -frutose) (LEHNINGER, 2007).

TABELA 2- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA VINHAÇA DE SOJA

Análises	Resultado médio
DBO (mg.L ⁻¹)	148.066,93
DQO (mg.L ⁻¹)	195.333,33
Umidade e substâncias voláteis (g.100ml ⁻¹)	82,79
Resíduo mineral fixo (g.ml ⁻¹)	2,37
Gordura total (g.ml ⁻¹)	4,49
Proteínas (Nx5,75) (g.ml ⁻¹)	1,52
Carboidratos (g.100ml ⁻¹)	8,83

Fonte: DLUGOKENSKI, 2008.

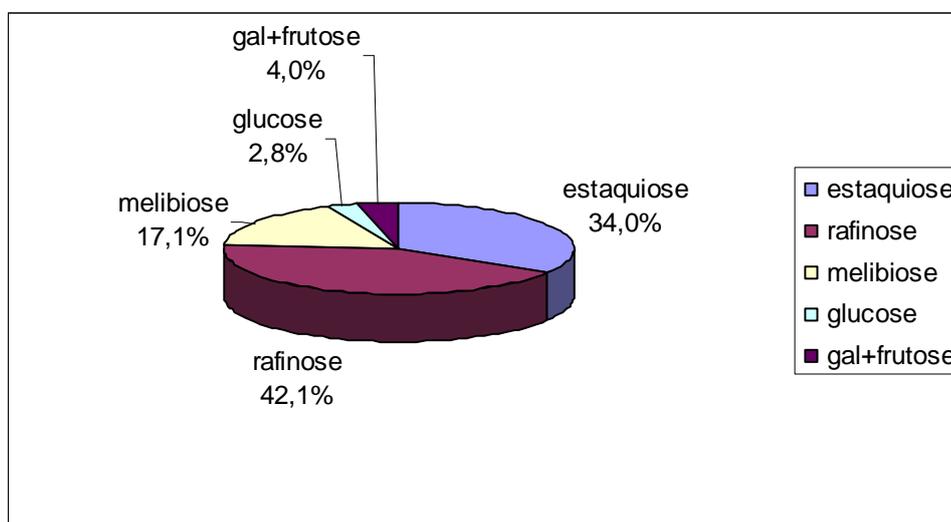


FIGURA 11 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DA FRAÇÃO DE CARBOIDRATOS DA VINHAÇA DE SOJA. FONTE: DLUGOKENSKI, 2008.

A enzima α -galactosidase já foi obtida de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (GARRO *et al.*, 1996; JIN *et al.*, 2001; GOTE *et al.*, 2006; YOON e HWANG, 2008). A sintetizada por *G. stearothermophilus* é termoestável, podendo apresentar atividade a 70^oC por até 19 horas, e possui grande afinidade por melibiose e rafinose (FRIDJONSSON *et al.*, 1999).

Kubo *et al.*(1994) isolou linhagens de *G. stearothermophilus* e *B. circulans* com capacidade de degradar de maneira eficiente o resíduo da soja proveniente da fabricação de tofu. Estes microrganismos secretam proteases termoestáveis no meio e são capazes de degradar de maneira eficiente as proteínas deste resíduo da soja a 50°C.

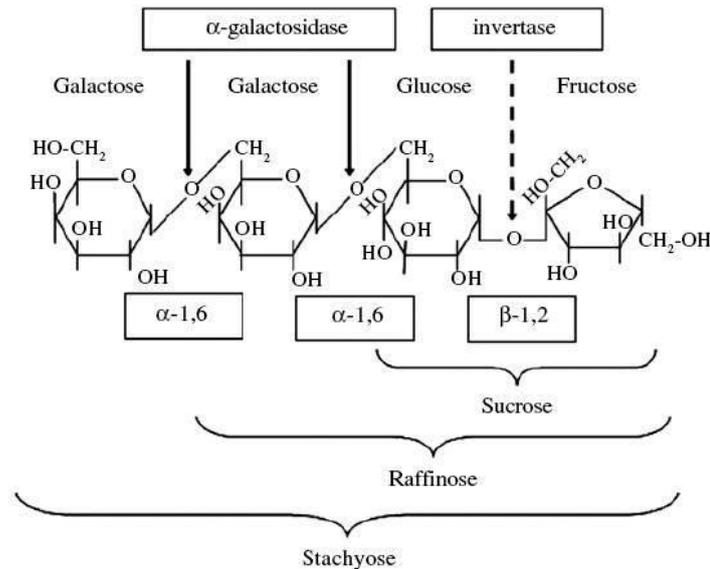


FIGURA 12- ESTRUTURA DA ESTAQUIOSE E RAFINOSE E ENZIMAS QUE CATALIZAM SUA HIDRÓLISE.

FONTES: LEBLANC *ET AL.* 2004.

Melo (2006) testou a capacidade de sub-produtos da soja como fonte de nitrogênio na fermentação de *Bacillus sphaericus* para sua utilização como bioinseticida para o controle biológico de *Culex quinquefasciatus* SAY (1823). Dentre os sub-produtos testados, extrato de soja, farelo, farinha e farelo branco de soja, este último foi o que resultou em um bioinseticida com maior mortalidade de larvas no ensaio biológico.

Sanada (2009) utilizou a vinhaça de soja como meio de cultura para a produção de α-galactosidase por *Lactobacillus agilis*. Karp (2007) também cultivou *Lactobacillus agilis* em um meio a base de vinhaça suplementado com melão de soja, obtendo bons rendimentos na produção de ácido L- lático.

2.8.2 Fermentação em Estado Sólido

Fermentação em estado sólido (FES) é uma tecnologia emergente para a produção de biomassa e produtos de origem microbiana como enzimas, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, e outros. Também chamada de cultivo em estado sólido ou cultivo em substrato sólido, esta técnica consiste no cultivo de microrganismos dentro ou na superfície de partículas umedecidas de uma matriz sólida. O conteúdo líquido do cultivo está ligado à matriz, mantendo o nível correspondente de atividade de água suficiente para o desenvolvimento do microrganismo, porém, sem exceder a capacidade máxima de retenção de água da matriz sólida (PANDEY, 2003; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Esta técnica é muito antiga, sendo utilizada em processos orientais clássicos como a fermentação de arroz por *Aspergillus oryzae* para o processo koji e a produção de queijo por *Penicillium roquefortii* (COUTO e SANROMÁN, 2006). Porém, com o sucesso da produção de penicilina por fermentação submersa nos anos 40, ela foi negligenciada pelo ocidente, se desenvolvendo industrialmente apenas depois dos anos 70 (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Atualmente ela tem se tornado uma alternativa atrativa à fermentação submersa devido suas aplicações e os novos avanços no desenho de reatores. Além disso, a utilização de subprodutos e resíduos da agroindústria como suporte ou substrato para a FES fornece uma via alternativa para agregar valor a estas matérias primas e desenvolver processos viáveis economicamente (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Algumas vantagens desta técnica são o baixo consumo de energia, baixa produção de água residual e o aproveitamento de resíduos que primeiramente seriam um problema ambiental. (PANDEY, 2003; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009).

O sucesso da fermentação em estado sólido depende de alguns fatores como a seleção do microrganismo, seleção do substrato, determinação das condições ótimas de cultivo e da recuperação do produto (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A razão pela qual muitos processos apresentam maior rendimento quando em fermentação em estado sólido provavelmente se deve ao fato de que as condições deste cultivo estão mais próximas do habitat natural de muitos microrganismos do que a fermentação submersa. (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

A relação entre a fisiologia do microrganismo e as condições físico-químicas do processo é o principal fator a ser considerado para a obtenção de altos

rendimentos. Os fatores que influenciam no processo são temperatura, pH, aeração, atividade de água, umidade, natureza do substrato e propriedades do leito como o tamanho de suas partículas e compactação (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Em geral os substratos utilizados neste tipo de cultivo são produtos heterogêneos com composição variada (celulose, amido, pectina, lignocelulose, fibras, etc...), que sua estrutura básica macromolecular lhe confere as propriedades necessárias para o cultivo em estado sólido. Sua estrutura pode simplesmente fornecer uma matriz inerte (como o bagaço de cana e resinas) em que os nutrientes estão adsorvidos na mesma (açúcares, lipídios, ácidos orgânicos etc...), mas geralmente esta matriz também fornece os nutrientes necessários ao cultivo (RAIMBAULT, 1998; PANDEY *et al.*, 2008).

Em alguns casos uma etapa de pré-tratamento é necessária para tornar o substrato bruto passível de utilização na fermentação, como: a redução de tamanho por moagem, raspagem ou corte; o tratamento físico, químico ou enzimático de seus polímeros para aumentar a disponibilidade de nutrientes; a suplementação com nutrientes ou água para adequar a umidade ao crescimento dos microrganismos (RAIMBAULT, 1998; PANDEY *et al.*, 2008).

Os maiores empecilhos deste tipo de cultivo estão relacionados com a heterogeneidade dos substratos (que ocasionam não uniformidade em sua estrutura, variabilidade entre as bateladas e limitação da reprodutibilidade do processo) e sua dificuldade de homogeneização, assim como a temperatura, pH e umidade durante o cultivo. Cada substrato apresenta suas vantagens e particularidades (RAIMBAULT, 1998; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

A baixa transferência de calor de algumas matrizes pode ocasionar pontos no leito em que a temperatura chega a ser cerca de 20^oC maior que a temperatura de incubação, podendo afetar o desenvolvimento do microrganismo e causar a desnaturação de produtos formados (PANDEY, 2008). Porém, a modelagem de biorreatores para fermentação em estado sólido tem buscado contornar as dificuldades de transferência de calor, massa e oxigênio apresentadas por esta técnica (MITCHELL *et al.*, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Diversos microrganismos podem ser utilizados em processos de fermentação em estado sólido. Devido as características de baixa atividade de água obtida neste cultivo, fungos e leveduras têm sido utilizados com sucesso no desenvolvimento de muitos processos (PRADO *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*,

2008; RODRIGUES *et al.*, 2009; SPIER *et al.*, 2009) porém, muitos autores também têm tido sucesso com culturas bacterianas (ARCHANA E SATYANARAYAMA, 1997, DEVI *et al.*, 2005; CHINN *et al.*, 2007; MIZUMOTO e SHODA, 2007; BUDHAVARAM e FAN, 2009). O cultivo de microrganismos termofílicos e a produção de produtos termoestáveis têm sido explorados como uma maneira de superar as dificuldades de remoção de calor do processo (ARCHANA E SATYANARAYAMA, 1997, DEVI *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; CHINN *et al.*, 2007; BUDHAVARAM e FAN, 2009).

Archana e Satyanarayama (1997) desenvolveram um processo de produção de xilanase pelo microrganismo termofílico *Bacillus licheniformis* A99 pela técnica de fermentação em estado sólido. O farelo de trigo demonstrou ser o substrato mais adequado ao processo, e uma elevada atividade de água demonstrou ser mais adequada à produção da enzima. Yang *et al.* (2005) obtiveram bons rendimentos de xilanase livre de celulase em fermentação em estado sólido com o fungo termofílico *Paecilomyces thermophila*, utilizando trigo como substrato.

Devi *et al.* (2005) desenvolveram um processo por cultivo em estado sólido economicamente viável para a produção do bioinseticida *Bacillus thuringiensis*, utilizando farelo de trigo como substrato.

Budhavaram e Fan (2009) cultivaram o microrganismo termofílico *B. coagulans* em lodo de papel (resíduo sólido da indústria de papel) para a produção de ácido láctico. Apesar da baixa umidade inicial (70%) e alta temperatura do cultivo (45^oC a 50^oC), o microrganismo foi capaz de converter mais de 87% da celulose contida no substrato, obtendo rendimentos maiores do que 80% na produção de ácido láctico.

Chinn *et al.* (2007) também utilizaram lodo de papel no cultivo de uma bactéria termofílica. Quando cultivado neste substrato, o microrganismo *Clostridium thermocellum* 27405 se mostrou adequado para a produção de acetato, lactato e etanol, e o aumento da umidade inicial acima de 30% apresentou atividades de água iguais (0,99) porém, resultou em um aumento da quantidade de produto final formado.

Visando melhorar a relação produtividade/custo, Sella *et al.* (2008a) desenvolveram a técnica de produção de esporos termorresistentes de *Bacillus atrophaeus* em fermentação em estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana como suporte e melaço de soja como fonte de carbono. Os esporos produzidos

apresentaram uma performance satisfatória na produção de indicadores biológicos para esterilização por calor seco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FASES DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

A produção do indicador biológico para esterilização a vapor consiste nas seguintes etapas:

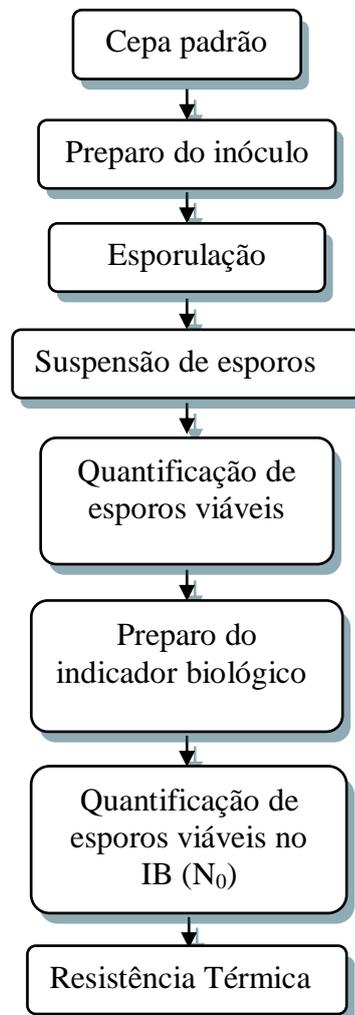


FIGURA 13- FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO INDICADOR BIOLÓGICO. FONTE: O AUTOR.

Estudos foram realizados em diferentes etapas da produção do indicador biológico (Figura 13). Na etapa de preparo do inóculo foram testados diferentes matérias primas para utilização no meio de cultura visando substituir o meio de cultura padrão por fontes alternativas e de menor custo.

Na etapa de esporulação também foram testadas diferentes fontes nutricionais na produção de esporos e sua influência no rendimento e termorresistência.

Foi realizado um estudo dos fatores que influenciam na resistência térmica dos esporos durante a sua produção (fontes de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos, pH, volume do inóculo), visando a sua utilização em indicador biológico para esterilização a vapor. Nesta etapa foi possível determinar as variáveis críticas do processo de esporulação na produção do indicador biológico.

Foi testada também a influência do diluente no preparo da suspensão de esporos e no seu armazenamento, visto que esta etapa também pode influenciar sua viabilidade e termorresistência, afetando a qualidade do produto.

No meio de recuperação do indicador biológico foi avaliada a concentração do indicador de pH púrpura de bromocresol, para estabelecer qual a sua concentração ótima. Também foi avaliada a influência da adição de glicerol ao meio de recuperação sobre a estabilidade da coloração e pH do meio após a utilização do IB.

3.2 MÉTODOS UTILIZADOS

3.2.1 Cepa padrão

A cepa padrão do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Ela foi mantida na forma de esporos em nitrogênio líquido, e também congelada a -80°C , sendo mantida na sua forma vegetativa em tubos de ensaio contendo Ágar de Soja Trypticaseína (Tryptone Soy Agar - TSA) inclinado, e conservada sob refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). Foram realizados repiques semestrais para sua manutenção.

3.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo consiste em uma suspensão de células vegetativas do microrganismo. Este foi preparado em tubos de ensaio contendo 25,0 ml de Caldo de Soja Trispticaseína (Tryptone Soy Broth – TSB), inoculados com 10^7 esporos (retirados da suspensão semente de esporos, cujo preparo está descrito no item 3.2.3) e incubado a $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante seis horas.

Esta técnica de preparo de inóculo foi desenvolvida por Dlugokenski (2008), que realizou a cinética de crescimento de *G. stearothermophilus* em TSB a partir de esporos (Figura 14). O tempo de incubação foi determinado com base na fase logarítmica de crescimento, que foi entre três e seis horas de cultivo. O tempo de geração (duplicação) calculado foi de 0,69 hora correspondendo a 41,4 minutos e a velocidade específica máxima de crescimento, foi de $0,76 \text{ min}^{-1}$.

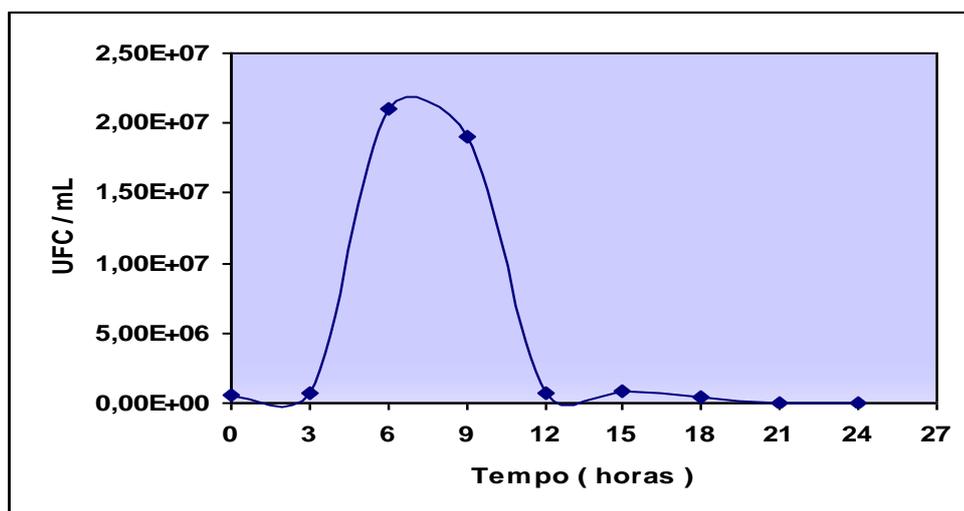


FIGURA 14 – CURVA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO *Geobacillus stearothermophilus*. FONTE: DLUGOKENSKI, 2008.

3.2.3 Preparo da suspensão de esporos

Foi utilizada como base a metodologia padronizada pelo CPPI, a qual está contida no procedimento operacional padrão (POP) nº14.00.02- Procedimento para produção e padronização do concentrado de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (PARANÁ, 2005). A partir da cepa armazenada em freezer - 80°C , foi produzida uma suspensão semente de esporos de *G. stearothermophilus* para a utilização durante toda a pesquisa como padrão e para o preparo do inóculo.

A esporulação foi realizada em garrafas de Roux contendo 400 ml de ágar para esporulação padronizado pelo CPPI para produção do Esteriteste (PARANÁ,

2005), que possui a seguinte composição: peptona, 0,3%; triptona, 0,5%; extrato de carne, 0,3%; extrato de levedura, 0,5%; sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,005%; sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,0038%; cloreto de cálcio bihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,0034%; fosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,005%; ágar, 2%. O pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1N, esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e posteriormente inclinado. A taxa de inoculação empregada foi de 1% (v/v), a suspensão de células foi espalhada sobre a superfície do ágar através da suave movimentação da garrafa e a mesma foi incubada a $57,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 12 dias.

A recuperação dos esporos do meio foi realizada raspando-se delicadamente a superfície do ágar com um bastão de vidro estéril e adicionando-se 80 ml de água deionizada estéril. A suspensão retirada foi filtrada em uma camada de algodão e outra de gaze e centrifugada a 2500 rpm (1,048 g) durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado, o sedimento resuspendido em 100 ml de água destilada estéril e a centrifugação e resuspensão realizadas mais duas vezes. Ao término deste procedimento a suspensão obtida foi envasada em frascos-ampola com 5 ml cada e armazenada sob refrigeração ($5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$).

Nas demais etapas da pesquisa em que foram preparadas suspensões de esporos a metodologia utilizada foi a mesma, porém, com algumas variações. As esporulações foram realizadas em garrafas de 200 ml contendo 60 ml de meio de esporulação cada (Figura 15), o volume de água utilizado na recuperação e centrifugação foi de 50 ml, e o volume final das suspensões obtidas foi de 20 ml para cada garrafa de esporulação. O meio de esporulação utilizado variou de acordo com a etapa da pesquisa, e está especificado em cada item.



FIGURA 15 – GARRAFA DE 200 ML UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS COM ÁGAR INCLINADO.

FONTE: O AUTOR.

3.2.4 Quantificação de microrganismos viáveis.

A contagem de microrganismos viáveis foi realizada pelo método da gota (MILES e MISRA, 1938), padronizado para IBs e suspensões de esporos por Sella (2008) e Dlugokenski (2008). Foi realizada a diluição decimal seriada das amostras e posterior inoculação de 50µl das mesmas em duplicata sobre superfície de TSA. As placas foram incubadas com a superfície virada para cima *overnight* a 57°C. A contagem de colônias presentes nas placas permitiu o cálculo das unidades formadoras de colônias por ml de suspensão (UFC.ml⁻¹).

Para a contagem apenas das formas esporuladas presentes, as amostras foram submetidas a vapor fluente em autoclave (100°C) durante cinco minutos para eliminação das formas vegetativas antes da contagem de colônias. Para a determinação do número inicial de microrganismos no indicador biológico após preparação (N₀), foi feito um *pool* de dez IBs, e este foi utilizado como amostra para a contagem.

3.2.5 Preparo do Indicador Biológico

Os esporos produzidos nos experimentos e armazenados na forma de suspensão foram utilizados na preparação de indicadores biológicos para esterilização a vapor, a qual teve como base o POP n°14.00.04 - Procedimento para a produção do Esteriteste (PARANÁ, 2003).

Adicionou-se um volume suficiente de suspensão de esporos ao meio de recuperação para a obtenção de um número desejado de esporos dentro do indicador biológico (10³ ou 10⁴ esporos por indicador biológico), o qual é ajustado em função da termorresistência do microrganismo. O meio de recuperação contendo esporos foi homogeneizado em agitador magnético durante 20 minutos, envasado em frascos-ampola de 7 ml com 3 ml cada, tampados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio. Foram armazenados em geladeira (5°C ±3°C) até a data de sua utilização.

Em algumas etapas da pesquisa foi utilizado como referência o meio de recuperação utilizado na produção de Esteriteste (PARANÁ, 2003), que possui a seguinte composição: TSB, 3%; amido, 0,1%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018%; púrpura de bromocresol, 0,001%, pH 7,0. Em outras etapas foi utilizado o meio

formulado por Dlugokenski (2008): vinhaça de soja, 1,5%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018%; amido, 0,1%; extrato de levedura, 0,8%; púrpura de bromocresol, 0,01%, pH 7,3.



FIGURA 16- ENVASE E SELAGEM DOS INDICADORES BIOLÓGICOS.
FONTE: DLUGOKENSKI, 2008.

O indicador de pH púrpura de bromocresol presente no meio apresenta coloração violeta em pH levemente alcalino (pH 6,0 a 8,0) e coloração amarelo em pH ácido (pH abaixo de 5,5), logo, o indicador biológico quando preparado apresenta coloração violeta. Após submetido a um ciclo de esterilização este é incubado a 57^oC durante 48 horas. A mudança de coloração para amarelo indica leitura positiva, ou seja, o ciclo de esterilização não foi suficiente para destruir todos os esporos contidos no IB, que quando incubados a temperatura de crescimento germinam e se multiplicam gerando metabólitos ácidos a partir do consumo do meio de cultura. A permanência da coloração violeta indica leitura negativa, ou seja, ausência de crescimento microbiano (Figura 17).



FIGURA 17 – INDICADORES BIOLÓGICOS AUTOCONTIDOS NEGATIVO (VIOLETA) E POSITIVO (AMARELO).
FONTE: O AUTOR.

3.2.6 Resistência Térmica

A resistência ao calor úmido dos esporos produzidos durante o trabalho foi avaliada pelos valores do tempo de redução decimal a 121°C ($D_{121^{\circ}\text{C}}$) e do tempo médio de morte (U_{sk}) do indicador biológico no qual estes foram utilizados. Foi utilizado o método de análise da fração negativa – Spearman-Kaber como recomendado pela U.S.P. 29 (2006a) para IBs auto-contidos.

O método de análise da fração negativa é indicado para se determinar a resistência de IBs. Estes são submetidos a ciclos de esterilização de diferentes tempos de exposição, sendo que no mesmo ciclo uma fração de IBs irá apresentar crescimento e outra não. Este método propicia uma análise estatística com base na proporção dos organismos sobreviventes aos ciclos de esterilização. Maiores tempos de exposição apresentam uma fração menor de IBs positivos, assegurando que apenas um um pequeno número de esporos sobreviveu ao ciclo, fornecendo um rigoroso desafio ao sistema como um todo.

O teste foi feito de acordo com o POP n° 10.06.03- Controle Microbiológico do Indicador Biológico para Esterilização a Vapor – Esteriteste- Termorresistência (PARANÄ, 2007). As amostras (IBs) foram submetidas a ciclos de esterilização em autoclave gravitacional a 121°C durante seis diferentes tempos de exposição: 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5 minutos. Foram utilizadas dez amostras por tempo de exposição, e após o teste estas foram incubadas a $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. A leitura foi realizada observado-se o número de amostras que possuíram crescimento positivo ou negativo pela mudança de coloração (Figura 19).



FIGURA 18 - SEIS LOTES DE IBs PREPARADOS PARA O TESTE DE RESISTÊNCIA TÉRMICA.
FONTE: O AUTOR.

Os parâmetros de resistência térmica foram calculados como determina a Farmacopéia Americana USP 29 (2006a) pelas seguintes fórmulas:

$$U_{sk} = U_k - \frac{d}{2} - \left[\frac{d}{n} \times \sum \frac{r}{n} \right]$$

$$D_{121^\circ C} = \frac{U_{sk}}{\log N_0 + 0,2507}$$

A variância para U_{sk} foi obtida por:

$$V = \left(\frac{d^2}{n^2(n-1)} \right) \sum r_i(n-r_i)$$

O desvio padrão foi calculado por:

$$SD = \sqrt{V}$$

Os limites mínimo e máximo com 95% de confiança para o valor de $D_{121^\circ C}$ foram calculados pela equação:

$$D_{121^\circ C} = \frac{U_{sk} \pm 2SD}{\log N_0 + 0,2507}$$

Aonde:

$D_{121^\circ C}$ = tempo de redução decimal a 121°C

U_{sk} = tempo médio de morte

d = intervalo entre os tempos de aquecimento

U_k = primeiro intervalo de tempo onde todas as amostras apresentaram crescimento negativo

r = número de amostras negativas a cada tempo de exposição entre t_1 e t_k

n = número total de amostras por tempo de exposição



FIGURA 19 – EXEMPLO DE RESULTADO DO TESTE DE RESISTÊNCIA TÉRMICA PELO MÉTODO DA FRAÇÃO NEGATIVA.
FONTE: O AUTOR.

3.2.7 Viabilidade

Para avaliar a viabilidade de IBs produzidos, dez amostras foram incubadas a $57,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Para que o teste seja satisfatório, as dez amostras devem apresentar resultado positivo.

3.2.8 Fermentação em Estado Sólido

A esporulação pela técnica de Fermentação em Estado Sólido foi realizada utilizando-se diferentes matérias-primas sólidas como suporte contendo meio de cultura líquido adsorvido como fonte de nutrientes. Os cultivos foram feitos em Erlenmeyer de 250 ml de boca larga, contendo 5 g da matéria seca do suporte a ser testado.

A quantidade de meio de cultura adicionado ao suporte foi calculada com base na umidade inicial a ser utilizada para cada matéria-prima. Esta foi determinada da seguinte maneira: adicionou-se 10 g da matéria seca do suporte a um frasco de Erlenmeyer contendo 100 ml de água deionizada, o qual foi autoclavado durante 15 minutos a 121°C . A umidade inicial para cada suporte foi calculada pela seguinte fórmula:

$$Umidade = \frac{massa_{H_2O}}{massa_{H_2O} + massa_{seca}}$$

A recuperação dos esporos do cultivo foi realizada adicionando-se pérolas de vidro e 100 ml de uma solução de Tween 80 0,01% a cada frasco. Em seguida, os

frascos foram levados à agitação em *shaker* a 250 rpm a 4°C durante 60 minutos. Após a agitação, os cultivos foram filtrados com uma camada de tecido de celulose, uma de gaze e outra de algodão (previamente esterilizados). O filtrado foi centrifugado a 2500 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em água deionizada estéril. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, e o último sedimento foi resuspenso em 20 ml de água, obtendo-se assim uma suspensão concentrada de esporos

3.2.8.1 Atividade de água, pH e umidade

A atividade de água foi determinada no aparelho Aqualab CX-2. O pH foi determinado após diluição de 1 g do cultivo em 10 ml de água, homogeneização em vortex e filtração em uma camada de algodão.

A umidade foi determinada pelo método termogravimétrico. Cerca de 1,0 g da amostra a ser testada foi pesada em cápsulas de porcelana previamente secas em estufa e taradas em balança analítica de precisão. A amostra foi seca durante 24 horas a 105°C (tempo necessário para se atingir peso constante) e pesada novamente. A perda de água permitiu o cálculo da umidade pela seguinte equação:

$$Umidade (g\%) = \frac{A \cdot 100}{P}$$

Onde:

A= diferença de peso entre a amostra úmida e seca

P= peso da amostra úmida

3.2.9 Planejamento de experimentos e análise estatística

Nas etapas em que foram trabalhadas diversas variáveis do processo foi utilizada a técnica de planejamento experimental, baseada nos fundamentos estatísticos. A utilização desta técnica reduz o número de experimentos, melhora a qualidade da informação obtida pelos resultados e permite a análise de diversos fatores simultaneamente. Os planejamentos do tipo fatorial envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores, e os valores de tais níveis são fixados a princípio do experimento.

Na etapa de otimização do meio de cultura do inóculo, primeiramente foi utilizado um planejamento do tipo fatorial completo. Neste tipo de planejamento estão presentes todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator, e a partir das respostas obtidas é possível determinar o efeito de cada fator estudado nas variáveis resposta. Para a otimização do meio de cultura foi utilizado um delineamento do tipo Composto Central Rotacional (DCCR). Este tipo de planejamento consiste na parte fatorial, contento as combinações nos níveis escolhidos, e de pontos axiais (nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$). Ele permite a obtenção de uma superfície de resposta e da região dos fatores estudados que otimiza os valores das variáveis resposta.

Na etapa de avaliação da influência das variáveis do processo de esporulação na resistência térmica dos esporos foram utilizado primeiramente planejamentos experimentais do tipo Plackett-Burman. Este tipo de delineamento é baseado em matrizes ortogonais do tipo Hadamard (com níveis +1 e -1), ele permite analisar os efeitos dos fatores estudados sobre as variáveis resposta auxiliando no *screening* de fatores que são significativos no processo, dentro dos níveis pré-estabelecidos. Sua vantagem sobre os planejamentos fatoriais completos é que fornece respostas consistentes com um número reduzido de experimentos. Depois da etapa de *screening*, para a otimização das variáveis nesta etapa também foi utilizado um planejamento do tipo DCCR.

Em experimentos em que houve a necessidade de se avaliar se os resultados observados era diferentes entre si, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). A análise de variância é a comparação das médias de diferentes grupos, cujo objetivo é avaliar se as diferenças observadas entre as médias das amostras são estatisticamente significativas. São calculadas as variâncias dos valores entre grupos, e a variância dentro dos grupos. Em seguida, determina-se a distribuição F, que é a fração entre a variância entre grupos e a variância dentro dos grupos, que permite verificar se a variabilidade é proveniente da variação amostral ou é uma evidência da diferença entre as médias das populações. Quanto maior for a variabilidade *entre*, mais forte é a evidência de as médias das populações serem diferentes. O resultado do F observado é comparado com o F crítico (valor tabelado, de acordo com o nível de significância previamente estabelecido), fornecendo o p-valor. A partir do p-valor é possível determinar se existe diferença significativa entre as médias dos grupos estudados.

Para determinar quais médias são estatisticamente diferentes entre si, após a ANOVA realizou-se o teste da menor diferença significativa de Fisher (*Fisher's LSD*), o qual realiza comparações pareadas entre as médias.

A obtenção das matrizes dos planejamentos experimentais, assim como a análise estatística dos resultados, foram realizadas com o auxílio dos programas *Statistica 7.0* (Statsoft, Inc.) e *Statgraphics Plus 5.0* (Statistical Graphics Corp.).

REFERÊNCIAS

ADAMS, D.M. Inactivation of *Clostridium perfringens* Type A Spores at Ultrahigh Temperatures. **Applied Microbiology**, v. 26, n.3, p.282-287, 1973.

AMES, H.; CLEMENT, L. Self-study series: Evolution, a biological indicator story. 2007. Disponível em: <<http://www.hponline.com/ce/pdfs/0707cetest.pdf> > Acessado em: 10 out 2009.

ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. . Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v, 21, n.1, p. 12–17, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS-ABNT. **NBR ISO 11134** Esterilização de Produtos Hospitalares - Requisitos para Validação e Controle de Rotina - Esterilização pelo Calor Úmido. São Paulo, 2001.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR (APECIH). Limpeza, Desinfecção e Esterilização de Artigos em Serviços de Saúde. São Paulo, 2ª edição, 375 p., 2010.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI. **Comprehensive Guide to Steam Sterilization in Healthcare Facilities. ANSI/ AAMI ST79:2006**. Arlington, 2006a.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI. **Sterilization of health care products-Vocabulary. ANSI/AAMI/ISO TIR11139:2006**. Arlington, 2006b.

AYUB, M. A. Z. *et al.* Conversão de resíduos agroindustriais da soja em etanol e outros solventes orgânicos. Relatório parcial PSPPG, processo 520712/99-4, 2002. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/Projetos%20Plano%20Sul/ufrgs_relatorio2002.htm. Acesso em: 20/ 10/ 2006.

BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p.1242-1246, 1986.

BENDER, G.R.; MARQUIS, R.E. Spore heat resistance and specific mineralization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1415–1421, 1985.

BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization, and preservation**. Philadelphia: Steris. 5° ed., 2001, p. 695-723.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. **Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde**. Brasília, p.50, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações gerais para central de esterilização**. Brasília, p. 20-29, 2001.

BUDHAVARAM, N.K.; FAN, Z. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulan* strains. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5966-5972, 2009.

CALBERG, D. M. Cleanroom microbiology for the non microbiologist. CRC Press, 2^a ed., 2005.

CAZEMIER, A. E.; WAGENAARS, S. F. M.; STEEG, P.F. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 761-770, 2001

CEGLA, U. G.; SHUSTER, M. Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof. UNITED STATES PATENT. 6,913,771, July 5, 2005.

CHINN, M. S.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Influence of process conditions on end product formation from *Clostridium thermocellum* 27405 in solid substrate cultivation on paper pulp sludge. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2184–2193, 2007

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872, p. 1105-1139. Em P. H. A. SNEATH, N. S. MAIR, M. E. SHARPE, AND J. G. HOLT (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.

CORRÊA, E.G.; CASTILHO, A.R.F. de; PEREIRA, C.V. Indicadores químicos e biológicos da eficácia de esterilização por autoclave ou estufa. **Revista Odonto Ciência**, v. 24, n.2, p.156-160, 2009.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p. 291–302, 2006.

DANNER, H.; NEUREITER, M.; MADZINGAIDZO, L.; GARTNER, M.; BRAUN, R. *Bacillus stearothermophilus* for Thermophilic Production of L-Lactic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 895-903, 1998.

DEVI, P.S.V.; RAVINDER, T.; JAIDEV, C. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, n.2, p. 163-168, 2005

DLUGOKENSKI, R.E.F. Emprego de resíduo agroindustrial na germinação de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 danificados pelo calor úmido sob pressão. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. 156 p., 2008.

DONK, P. J. A highly resistant thermophilic organism. **Journal of Bacteriology**, v. 5, p.373-374, 1920

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 117- 126, 2003.

FERREIRA, P. Pioneirismo mundial troca resíduos de soja por soluções. **Inovação em Pauta**. FINEP, 3ª edição, p. 41-43, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA. **Biological Indicator (BI) Premarket Notification [5210(k)] Submissions**: Guidance for Industry and FDA Staff, 2007.

FOSTER, S.J. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 76, p. 25S-39S, 1994.

FRIDJONSSON, O.; WATZLAWICK, H.; GEHWEILER, A.; MATTES, R. Thermostable K-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621: cloning, sequencing and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, n. 1, p. 147-153, 1999.

FUJITA, M; LOSICK, R. Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. **Genes and Development**, v. 19, p.2236-2244, 2005

GARRO, M.; VALDEZ, G. F.; OLIVER, G.; GIORI, G. S. Purification of alphasgalactosidase from *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 103-109, 1996.

GONDIM, A. L. N.; PAZ, M. C. F. Influência da temperatura, fonte de carbono e de pH na produção de biossurfactantes e biomassa por *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. **Anais do I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação tecnológica**, Natal/RN, 2006.

GOTE, M.; KHAN, I.; GOKHALE D.; BASTAWDE K.; KHIRE J. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable a-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). **Process Biochemistry**, v 41, p.1311–1317, 2006.

GOULD, G. W.; DRING, G. J. Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory córtex. **Nature**, v. 258, p. 402–405, 1975.

HANSEN, N .-H.; RIEMANN, H. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 26, n. 3, p. 314-333, 1963.

HODGGES, N.A.; MELLING, J.; PARKER, S.J. A comparison of chemically defined and complex media for the production of *Bacillus subtilis* spores having reproducible resistance and germination characteristics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 126-13-, 1980.

JEANICKE, R. Review: Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n.3, p. 715-728, 1991.

JIN, F.; LI, Y.; ZHANG, C.; YU, H. Thermostable α -amylase and α -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF strain. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.559-564, 2001.

KARP, S. G. Production of L-lactic acid from the soybean vinasse. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brasil/França. 49 p., 2007.

KUBO, M.; OKAJIMA, J.; HASUMI, F. Isolation and characterization of soybean waste-degrading microorganisms and analysis of fertilizer effects of the degraded products. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p. 242-247, 1994.

LEBLANC, J. G.; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; GIORI, G. S.; PIARD, J. C.; SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase. **Genetics And Molecular Research**, v. 3, p. 432-440, 2004a.

LATIMER, J.M.; MATSEN, J.M. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n.4, p. 340-342, 1977.

LEE, C.; MONTVILLE, T. J.; SINSKEY, A. J. Comparison of the efficacy of sterilization indicators. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 113-117, 1979.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. 4ª Ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007.

LIN, C.; WU,B.; LIN, D. Spoilage bacteria in canned foods i. flat sour spoilage bacteria in canned asparagus and the thermal death time. **Applied Microbiology**, v. 16, n.1, p. 45-47, 1968.

LÓPEZ, M.; GONZÁLEZ, I.; MAZAS, M.; GONZÁLEZ, J.; MATIN, R.; BERNARDO, A. Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 32, n. 4, p. 305-311, 1997.

LOSICK, R.; YOUNGMAN, P.; PIGGOT, J.P. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Annual Review of Genetics**, v. 20, p. 625–669, 1986

MACIEL, G.M.; VANDENBERGHE, L.P.S.; HAMINIUK, C.W.I.; FENDRICH, R.C.; BIANCA, B.E.D.; BRANDALISE, T.Q. da S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Xylanase Production by *A. niger* in Solid State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 181–187, 2008.

MAGGE, A.; GRANGER, A.C.; WAHOME, P.G.; SETLOW, B.;VEPACHEDU, V.R.; LOSHON, C.A.;PENG, L.; CHEN, D.;LI, Y-Q; SETLOW, P. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n.14, p. 4798-4807, 2008.

MARQUIS, R.E.; BENDER G.R. Mineralization and heat resistance of bacterial spores. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n.2, p. 789-791, 1985.

MARQUIS, R.E.; BENDER, G.R.; CARSTENSEN, E.L.; CHILD, S.Z. Dielectric Characterization of Forespores Isolated from *Bacillus megaterium* ATCC 19213. **Journal of Bacteriology**, v.153, n.1, p. 436-442 , 1983.

MARQUIS, R.E.; SIM, J.; SHIN, S.Y. Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 76, n. 4 , p.40-48, 1994.

MASAADEH, H. A.; JARAN, A. S. Determination of the antibacterial efficacy of common chemical agents in cleaning and disinfection in hospitals of north Jordan. **American Journal of Applied Sciences**, v.6, n.5, p. 811-815, 2009.

MCERLANE, B.; ROSEBUSH, W.J.; WATERFIELD, J.D. Assessment of the effectiveness of dental sterilizers using biological monitors. **Journal of Canadian Dental Association**, v.58, n.6, p.481-483, 1992.

MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PASTORE, G.M.; SOCCOL, C.R. Aroma Compounds Produced by Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p.47–51, 2006.

MELLY, E.; GENEST, P.C.; GILMORE, M.E.; LITTLE, S.; POPHAM, D.L. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n.6, p.1105-1115, 2002.

MELO, A. L. de A. Elaboração e otimização de bioprocessos para a produção de *Bacillus sphaericus* meyer e neide (1904) visando o controle biológico de *Culex quinquefasciatus* SAY (1823). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná. 64 p., 2006.

MELO, R. P. Importância da alimentação em sistemas de produção de leite. Artigos Técnicos Equipe **Rehagro**. Maio de 2004. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1182>> Acesso em: 08 de abril de 2010.

MENDES, W.S.; SILVA, I.J.; FONTES, D.O. ; RODRIGUEZ, N.M. ; MARINHO, P.C.; SILVA, F.O.; AROUCA, C.L.C.; SILVA, C.L.C. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.2, p.207-213, 2004

MESALABS. Raven Labs- Sterility assurance for industry and healthcare. Acesso em: 15 de abril de 2010. Disponível em: <<http://www.mesalabs.com/products-services/raven-labs.html>>

MESONES, W. G. De La P.. Análise conjuntural do mercado da soja-Junho/2010. **Centro de Inteligência da Soja**, Emater. 17 de junho de 2010. Acesso em: 22 de junho de 2010. Disponível em:<
<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=8187>

MILES, A.A e MISRA A.A. The estimation of bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**. v. 38, p. 732-749, 1938

MITCHELL, D.A.; MEIEN O.F.Von; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 137-147, 2003.

MIZUMOTO, S.; SHODA, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2007

MOIR, A. How do spores germinate? Review article. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 526–530, 2006.

NAMSA BIOLOGICAL INDICATORS. Information on NAMSA biological indicators. BioNovus Life Sciences, 2008. Acesso em: 15 de abril de 2010, disponível em:<
<http://www.bionovuslifesciences.com.au/products-and-applications/namsa-product-and-applications/namsa-biological-indicators>>

NARESSI, S.C.M.; AKAMA, C.M.; SILVA, L.M.P.; SIVIERO, M. Analysis of the sterilization forms and means of control used by the surgeon-dentists from São José dos Campos - SP. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.33, n.4, p.169-74, 2004.

NAZINA, T.N.; TOUROVA, T. P.; POLTARAUS, A.B.; NOVIKOVA, E.V.; GRIGORYAN, A.A.; IVANOVA; A.E.; LYSENKO, A.M.; PETRUNYAKA, V.V.; OSIPOV, G.A.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Taxonomic Study of Aerobic Thermophilic Bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov.,sp.nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from Petroleum Reservoirs and Transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new Combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 433 - 446, 2001.

NGUELE, J.C.; ESWARAMOORTHY, P.; BHATTACHARYA, M.; NGOU-MILAMA, E.; FUJITA, M. Genetic and biochemical analyses of sensor kinase a in *Bacillus subtilis* sporulation. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p. 573-590, 2010

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH,H.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 64, n. 3, p. 548–572, 2000.

PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, P. Role of Ger Proteins in Nutrient and Nonnutrient Triggering of Spore Germination in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n.9, p. 2513–2519, 2000.

PANDEY, A; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; SEVASTIANOS, R. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000.a

PANDEY, A; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Review paper: Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p. 69-80, 2000.b

PANDEY, A; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Review: Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p. 81-87, 2000.c

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R. DUSSAP, C-G. **Advances in Fermentation Technology**. Asiatech Pub Inc, New Delhi, 672p. 2008.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 10.06.03- Controle Microbiológico do Indicador Biológico para Esterilização a vapor – Esteriteste- Termorresistência**. Rev 03, 16p, Piraquara, 05/06/2007.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.02- Procedimento para a Produção e Padronização do Concentrado de Esporos do *Geobacillus stearothermophilus***. Rev 05, 16p, Piraquara, 16/05/2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.04- Procedimento para a Produção do Esteriteste**. Rev 02, 10p, Piraquara, 19/05/2003.

PENNA, T.C.V; ISHII, M, MACHOSHVILI, I.A.; MARQUES, M. The effect of bioindicator preparation and storage on thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, n.1-9, p.525-538, 2002.

PENNA, T. C. V., MACHOSHVILI, I. A., ISHII, M. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 106, n. 1-3, p.287-294, 2003.

PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A.; TAQUEDA, M.E.S.; ISHII, M. The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 54, n. 5, 2000.

POKUSAIEVA, K.; KUISIENE, N.; JASINSKYTE, D.; RUTIENE, K.; SALEIKIENE, J.; CHITAVICHIUS, D. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. **Central European Journal of Biology**, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/fw14404881143241/fulltext.pdf?page=1>>

PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Relation between Citric Acid Production by Solid State Fermentation from Cassava Bagasse and Respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in Semi-pilot Scale. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, V. 48, p. 29-36, 2005.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, p. 2-15, 1998.

REICH, R. R.; MORIEN, L. L. Influence on environmental storage relative humidity on biological indicator resistance, viability, and moisture content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 609-614, 1982.

RODRIGUES, C; VANDENBERGHE P de S; TEODORO, J; OSS, J.F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, p. 181-188, 2009

RODRIGUEZ-LEON, J.A.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; RODRÍGUEZ, D.E. Factors affecting solid-state fermentation, capítulo 3, p. 26-47 em PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. e LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. Springer New York, 2008.

RUTALA ,W.A.; JONES, S.M. E WEBER, D.J. Comparison of a rapid readout biological indicator for steam sterilization with four conventional biological indicators and five chemical indicators. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.17, n.7, p.423-428, 1996.

RUTALA ,W.A.; WEBER, D.J. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. **Center for Disease Control and Prevention (CDC)**, 158p., 2008. Acesso em 17 de junho de 2010, Disponível em:<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf>

SANADA, C. T. N. produção de α -galactosidase a partir de vinhaça de soja. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. 103 p., 2009.

SCHNEIDER, P. M.; REICH, R. R.; KIRCKOF, S. S.; FOLTZ, W. G. Performance of various steam sterilization indicators under optimum and sub-optimum exposure conditions. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 5, p. 55-67, 2005.

SELLA, S.R.B.R; GUIZELINI, B.P.; VANDENBERGHE,L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; SOCCOL, C.R. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus* ' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation . **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1019-1026, 2008a

SELLA, S. B. R. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de esporos termorresistentes de *Bacillus atrophaeus*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, UFPR, 2008b.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p. 13-18, 2009

SETLOW, B.; ATLURI, S.; KITCHEL, R.; KOZIOL-DUBE, K.; SETLOW, P. Role of dipicolinic acid in the germination, resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β type small acid soluble proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3740–3747, 2006.

SETLOW, P. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: Structure, synthesis, genetics, function and degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p.319–338, 1988

SETLOW, P. Spore germination. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 550-556, 2003.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514–525, 2006.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 172-180, 2007.

SETLOW, P. Dormant spores receive an unexpected wake-up-call. **Cell**, v. 135, n.3, p.410-412, 2008.

SETLOW, P e PRIMUS, G. Protein metabolism during germination of *Bacillus megaterium* spores I. Protein synthesis and amino acid metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 2, p. 632-630, 1975.

SGM BIOTECH, INC. Products and services- Biological Indicators. Acesso em: 15 de abril de 2010. Disponível em: <<http://www.sgmbiotech.com/products.php?process=steam#bi>>

SHAH, I.M.; LAABERKI, M-H.; POPHAM, D.L.; DWORKIN, J. A eukaryotic-like ser/thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. **Cell**, v. 135, n. 3, p.486-496, 2008.

SILVA, F.O.; AROUCA, C.L.C.; SILVA, C.L.C. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.2, p.207-213, 2004

SIQUEIRA, P. F. Production of bio-ethanol from soy bean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea. Curitiba, Brazil, 2006.

SIQUEIRA, P. F. KARP, S.G. ; CARVALHO, J.C. ; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A. ; THOLOZAN, J.L. ; SINGHANIA, R.R. ; PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n.17, p. 8156-8163, 2008.

SLEPECKY, R.A. E HEMPHILL, H.E. The Genus *Bacillus*- Nonmedical. **The Prokaryotes Volume 4**. Editora Springer, Nova York,. 48, p. 530-562, 2006.

SMITH, G. M.; KOPELMAN, M.; JONES, A.; PFLUG, I. J. Effect of environmental conditions during heating on commercial spore strip performance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n.1, p.12-18, 1982.

SOCCOL, C. R. e VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003

SOLIMAN, N. A. Coproduction of thermostable amylase and β -galactosidase enzymes by *Geobacillus stearothermophilus* SAB-40: application of Plackett-Burman design to evaluate culture requirements affecting enzyme production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 695–703, 2008

SONENSHEIN, A.L. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion on Microbiology**, v. 3, p. 561-566, 2000.

SPIER, M.R.; LETTI, L.A.J.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R.. A simplified model for *A. Niger* FS3 growth during phytase formation in solid State fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 151-158, 2009.

TALBOT G. & SYGUSCH J. Purification and characterization of thermostable b-mannanase and a-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3505-3510, 1990.

UNGER-BIMCZOK, B.; KOTTKE, V.; HERTEL, C.; RAUSCHNABEL, J. The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor . **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 3, n. 2, p. 123-133, junho 2008.

U.S.P. 29. Chapter 55. Biological indicators-resistance and performance tests. In: **The United States Pharmacopeia**. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, p. 2501 -2503, 2006a.

U.S.P. 29. Chapter 1035. Biological indicators for steam sterilization. In: **The United States Pharmacopeia**. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, p. 2811 -2814, 2006b.

U.S.P. 29. Chapter 1211. Sterilization and sterility assurance of compendial articles Tests. Em: **The United States Pharmacopeia**. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 2006c.

VEENING, J.W., STEWART, E.J., BERNGRUBER, T.W., TADDEI, F., KUIPERS, O.P., AND HAMOEN, L.W. Epigenetic inheritance in bacterial cell development.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 11, p. 4393-4398, março 2008

WALKER, P. D. e BAILLIE, A. Structure of *Bacillus stearothermophilus*: An electron microscope study. **Journal of Applied Bacteriology**, v.31, p. 108-113, 1968.

WARTH, A.D. relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 134, n.3, p. 699-705, 1978.

WRIGHT, A. M.; HOXEY, E. V. ; SOPER, C. J.; DAVIES, D. J. G. Biological indicators for low temperature steam and formaldehyde sterilization: the effect of defined media on sporulation, growth index and formaldehyde resistance of spores of *Bacillus stearothermophilus* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n.4, p. 432-438, 1995

YAMAZAKI, K.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; SHINANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n.2, p. 153–156, 1997.

YOKOYA, F. e YORK, G. K. Effect of several environmental conditions on the "thermal death rate" of endospores of aerobic, thermophilic bacteria. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 993-999, 1965

YOON, M. Y.; HWANG, H. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -d-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. **Food Microbiology**, v. 25, n.6, p. 815-823, 2008.

4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

4.1 INTRODUÇÃO

O inóculo, ou cultura semente, é indispensável para um processo fermentativo. O desenvolvimento do inóculo pode possuir um efeito subsequente na performance do processo, como a duração da fase lag, velocidade específica de crescimento, rendimento de biomassa, esporulação e qualidade do produto final. O inóculo normalmente é um processo em batelada que correlaciona o estado metabólico da cultura com o processo desejado. Em alguns processos fermentativos, o crescimento ótimo do microrganismo no estágio de produção depende da idade e da densidade da cultura iniciadora. Estes dois parâmetros são inter-relacionados e devem ser otimizados a fim de se encontrar a densidade de biomassa e o tempo ótimo de produção de um inóculo (SEN e SWAMINATHAN, 2004).

O curso de algumas fermentações pode ser afetado pelo inóculo, pois culturas de bactérias “velhas” precisam de um maior tempo de adaptação, não se desenvolvendo da mesma maneira que uma cultura jovem. Por esta razão, o tempo de incubação do inóculo é muito importante (CALAM, 1976 citado por MILNER *et al.*, 1997). Muitos trabalhos não estudam o desenvolvimento do inóculo em seu processo, acreditando que esta etapa não seja crítica, mas alguns autores mostram que se trabalhar com a cultura iniciadora pode melhorar o rendimento de alguns processos (MILNER *et al.*, 1997; SEN e SWAMINATHAN, 2004; LALUCE *et al.*; 2009).

Milner *et al.* (1997) comparou inóculos de um e dois estágios na produção de amilase por *B. amyloliquefaciens*, estudando diferentes tempos de incubação dos mesmos. Desenvolvendo um inóculo de dois estágios aumentou a produção da enzima em cerca de 20%, além disso reduziu seu tempo de produção.

Sen e Swaminathan (2004) verificaram uma forte interação entre o volume do primeiro estágio e o tempo de produção do segundo estágio do inóculo na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* DSM 3256. A otimização destas duas variáveis contribuiu para o aumento do rendimento da produção.

Laluce *et al.* (2009) demonstraram que é possível aumentar o rendimento da produção de etanol aumentando a concentração do inóculo. Verificaram também

que a interação entre a temperatura e a concentração de inóculo afetam positivamente a viabilidade do microrganismo durante o processo, e a interação entre a concentração de inóculo e de açúcares leva a uma maior produção de etanol.

Na produção de esporos bacterianos a primeira etapa é o inóculo, que consiste em produzir biomassa de sua forma vegetativa até atingir a fase estacionária. O inóculo pode ser iniciado a partir de células vegetativas mantidas em ágar inclinado, de esporos em suspensão aquosa, liofilizados ou congelados. Esporos em suspensão aquosa são relativamente estáveis por um longo período, fáceis de armazenar e quantificar, fornecendo um inóculo com um número de microrganismos mais preciso.

O aproveitamento de resíduos da agroindústria como fonte alternativa de substratos para o desenvolvimento de microrganismos vem crescendo na biotecnologia. Alguns trabalhos demonstram a habilidade de bactérias do gênero *Bacillus* em se desenvolver em substratos complexos e resíduos da agroindústria, como a produção de biosurfactantes por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* a partir de melaço de cana e proteínas do queijo (JOSHI *et. al.*, 2007) e a utilização de melaço de cana e água de maceração de milho no desenvolvimento de *Bacillus megaterium* para a produção de poli ácido hidroxibutírico (GOUDA *et. al.*, 2001). Sella *et al.* (2008) desenvolveram um meio para produção de inóculo de *Bacillus atrophaeus* contendo 4,0% de melaço de soja e 4,0% de peptona de caseína em substituição ao Caldo de Soja Trypticaseína (TSB). O inóculo se mostrou eficaz na produção de esporos termorresistentes para a utilização em indicadores biológicos para esterilização.

O melaço de soja é um subproduto do processamento da soja, obtido durante a produção de concentrado de proteínas, e se destaca pela alta concentração de açúcares, em torno de 57% do peso seco (SIQUEIRA *et. al.* 2006).

Visando substituir o meio de cultura industrializado utilizado na produção do inóculo de *Geobacillus stearothermophilus* (Caldo de Soja Trypticaseína ou TSB), buscou-se uma formulação alternativa utilizando o melaço de soja como fonte de carbono, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Seleção da fonte de nitrogênio

Foram preparados três meios de cultura utilizando melaço de soja como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio, sendo TSB usado como meio controle. O melaço de soja foi obtido de uma indústria de proteína concentrada de soja e armazenado na concentração de 75⁰Brix.

A formulação dos meios está apresentada na Tabela 1. Os meios 2 e 3 foram formulados para se obter uma relação C:N próxima a do meio controle (1,32) com base nos dados da Tabela 2. Na formulação do meio 1 optou-se por uma relação mais elevada (C:N =5) devido ao fato da peptona apresentar grande concentração de carbono, o que impossibilita a formulação do meio com a relação C:N inicialmente citada.

Foram preparados 2 tubos de ensaio com 25 ml de cada meio, o pH foi ajustado para 7,2 ±0.1, e autoclavados a 121⁰C durante 15 minutos. Para a realização do ensaio os tubos foram inoculados com 10⁷ esporos em cada tubo (100 µl de suspensão semente de esporos) e incubados a 57,5 ± 2,5⁰C durante 6 horas (item 3.2.2). A quantificação dos microrganismos viáveis (formas vegetativas) foi realizada como descrito no item 3.2.4 e expressas em UFC.ml⁻¹.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS PARA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO DO INÓCULO UTILIZANDO MELAÇO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO.

Meio	Composição
1	Melaço 0,8% + Peptona 2%
2	Melaço 0,8% + Extrato de Carne 2,2%
3	Melaço 0,45% + Triptona 1,9%
4	TSB (controle)

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTURA. FONTE: ¹BD BIOPHARMACEUTICAL PRODUCTION, 2004; ²SIQUEIRA, 2006.

	Carboidratos (%)	Nitrogênio (%)
TSB (preparado) ¹	0,33	0,25
Extrato de Carne ¹	0,20	11,20
Triptona ¹	7,70	13,00
Peptona ¹	15,40	6,29
Melaço de Soja ²	19,54	0,52

4.2.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção do inóculo

Após a escolha da melhor combinação de nutrientes, foi realizado um planejamento experimental para determinar a influência das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio na produção de microrganismos viáveis de *G. stearothermophilus*. Foi realizado um planejamento do tipo fatorial 2^2 completo com duplicata e dois pontos centrais, totalizando 10 experimentos. Os valores reais das variáveis estudadas no planejamento estão apresentados na Tabela 3, a seguir:

TABELA 3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2^2 COMPLETO PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *G. stearothermophilus*.

Experimento	Melaço de Soja (% p/v)	Extrato de Carne (% p/v)
1	0,2	0,5
2	1,4	3,5
3	0,2	3,5
4	1,4	0,5
5 (PC)	0,8	2,0

4.2.3 Otimização do meio de cultura do inóculo

Para a otimização do meio de cultura do inóculo foi realizado um delineamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR). Foram estudadas duas variáveis em dois níveis, os experimentos foram realizados em duplicata, com a adição de quatro pontos axiais e dois pontos centrais, totalizando 19 experimentos. A matriz de experimentos com os valores codificados está representada na Tabela 4. As variáveis codificadas e seus valores reais são apresentados na Tabela 5. Os valores a serem estudados foram determinados de acordo com a resposta do experimento anterior.

TABELA 4 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS DO DELINEAMENTO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.

Ensaio	Níveis	
	(1) Melaço de Soja	(2) Extrato de Carne
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9 (PC)	0	0

TABELA 5 – NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
(1) Melaço de Soja	0,01	0,2	0,5	0,8	1,0
(2) Extrato de Carne	2,0	2,4	3,5	4,6	5,0

Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo de segunda ordem de acordo com a equação 1, que descreve a superfície de resposta obtida

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Onde y representa a variável resposta, b representa os coeficientes de regressão, e x os valores codificados para as variáveis independentes.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Seleção da fonte de nitrogênio

Três fontes de nitrogênio foram testadas em formulações de meios de cultura para o inóculo de *G. stearothermophilus* utilizando melaço de soja como fonte de carbono. Os resultados estão na Tabela 6:

TABELA 6 – RESULTADOS DAS CONTAGENS DE BACIOS VIÁVEIS DA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO PARA O MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.

Meio	Composição	Resultados – média das duplicatas (UFC.ml ⁻¹)
1	Melaço 0,8% + Peptona 2%	4,0. 10 ⁷
2	Melaço 0,8% + Extrato de Carne 2,2%	4,0.10 ⁷
3	Melaço 0,45% + Triptona 1,9%	3,8.10 ⁷
4	TSB (controle)	1,4.10 ⁸

Todos os meios testados proporcionaram o crescimento do microrganismo. Os resultados obtidos estão em torno de 4,0.10⁷ UFC.ml⁻¹, menos de um log abaixo do resultado fornecido pelo meio controle (1,4.10⁸ UFC.ml⁻¹).

Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para determinar se existe diferença significativa entre os meios de cultura testados a um nível de 90% de confiança (Tabela 7).

O valor de F_{calc} de 12,52 é quase três vezes maior que $F_{\text{crítico}}$ (4,19) e o p-valor é menor do que 0,1, mostrando que existe uma diferença significativa entre as

médias dos resultados obtidos dos quatro meios testados. Para determinar quais médias são significativamente diferentes entre si foi realizado o teste da menor diferença significativa de Fisher. Os resultados são mostrados na Figura 1.

TABELA 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *G. stearothermophilus* EM MEIOS DE CULTURA COM MELAÇO DE SOJA E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F _{calc}	p-valor
Entre os grupos	1,87108.10 ¹⁶	3	6,23693.10 ¹⁵	12,52	0,0168
Residual	1,99269.10 ¹⁵	4	4,98173.10 ¹⁴		
Total Corrigido	2,07035.10 ¹⁶	7			

O gráfico mostra que os meios contendo melaço de soja como fonte de carbono são estatisticamente iguais entre si, mas diferentes do meio controle. Isso demonstra que eles possuem a mesma capacidade de produção de biomassa de *G. stearothermophilus*, no entanto não substituem o meio controle.

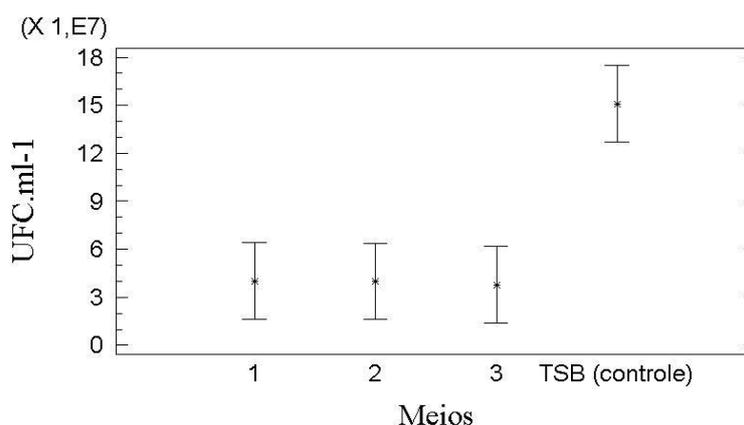


FIGURA 1 –PLOTAGEM DAS MÉDIAS DOS MEIOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO DO INÓCULO. (1) MELAÇO E PEPTONA (2) MELAÇO E EXTRATO DE CARNE (3) MELAÇO E TRIPTONA .

4.3.2 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção do inóculo

Como as fontes de nitrogênio apresentaram a mesma capacidade de multiplicação dos bacilos, o extrato de carne foi escolhido para o próximo experimento por ser o substrato estudado que apresenta menor porcentagem de carbono em sua composição, proporcionando assim uma melhor avaliação do efeito do nitrogênio sobre a produtividade. Os resultados das duplicatas da quantificação de bacilos viáveis estão apresentados na Tabela 8.

As médias das contagens de colônias são apresentadas graficamente na figura 2. As formulações testadas forneceram resultados entre 10^5 e 10^7 UFC.ml⁻¹ e a que apresentou maior rendimento foi a referente ao experimento 3, contendo 0,2% de melaço de soja e 3,5% de extrato de carne.

TABELA 8 – RESULTADOS DAS CONTAGENS DE BACIOS VIÁVEIS DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COMPLETO.

Experimento	Resultados das duplicatas (UFC.ml ⁻¹)	
1	$5,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$
2	$1,3 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$
3	$4,4 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$
4	$1,1 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^5$
5 (PC)	$8,1 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^6$

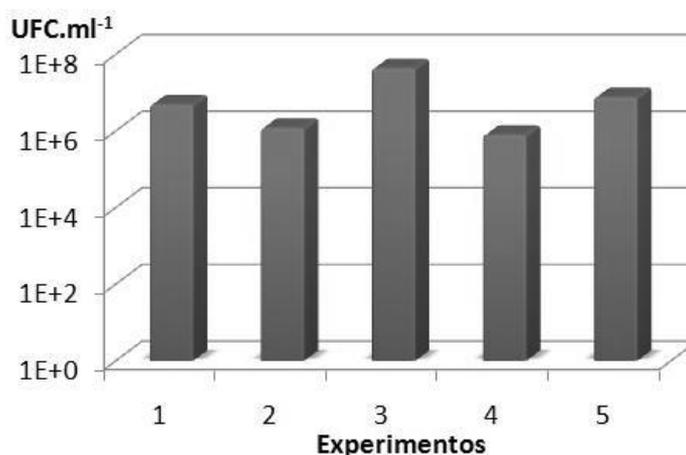


FIGURA 2 – MÉDIAS DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COMPLETO.

A Tabela 9 apresenta os efeitos estimados das variáveis e da interação entre elas, assim como o erro padrão e o teste *t*. A um intervalo de 90% de confiança, as variáveis que apresentaram um *p*-valor < 0,1 são estatisticamente significativas. O gráfico de Pareto (Figura 3) ilustra graficamente os efeitos estimados das variáveis.

TABELA 9 – EFEITOS ESTIMADOS DO MELAÇO DE SOJA E EXTRATO DE CARNE NA PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *G. stearothermophilus* A UM INTERVALO DE 90% DE CONFIANÇA.

	Efeito	Erro Padrão	<i>t</i> (6)	<i>p</i> -valor
Média	11622500	817976	14,2089	0,000008
Melaço de soja	-23218750	1829049	-12,6944	0,000015
Extrato de carne	19523750	1829049	10,6743	0,000040
Interação	-19126250	1829049	-10,4569	0,000045

Analisando os efeitos e o resultado do teste *t*, pode-se observar que, nos intervalos de concentrações estudados, ambas as variáveis possuíram efeitos

estatisticamente significativos no desenvolvimento do microrganismo. O aumento da concentração da fonte de nitrogênio (extrato de carne) em até 3,5% apresentou um efeito positivo sobre o desenvolvimento do inóculo, enquanto que o aumento da concentração de melaço de soja de 0,2% a 2,4% afetou negativamente o crescimento. A interação entre as variáveis apresentou um efeito estatisticamente significativo sobre o crescimento do microrganismo, o que significa que uma alteração no nível de um fator influencia o efeito causado pela outra variável. Isto pode estar relacionado com a relação C:N do meio de cultura, já que a variação de um dos componentes altera esta relação, causando uma interferência no efeito da outra variável. Isto prova que as duas variáveis estão intimamente relacionadas pela relação C:N.

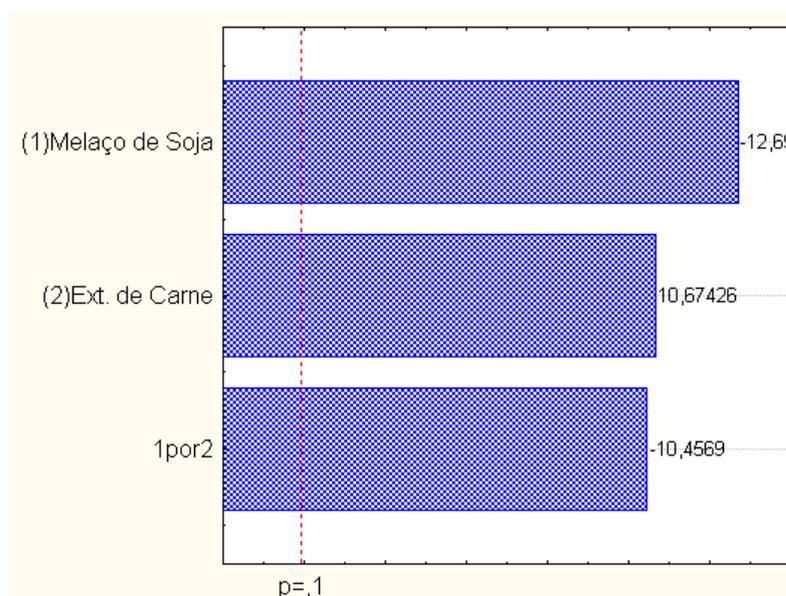


FIGURA 3 - GRÁFICO DE PARETO PARA OS EFEITOS ESTIMADOS DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO SOBRE O CULTIVO DE *G. stearothermophilus* A UM INTERVALO DE 90% DE CONFIANÇA.

4.3.3 Otimização do meio de cultura do inóculo

Os resultados das contagens de bacilos viáveis dos experimentos estão apresentados na Tabela 10. Os experimentos apresentaram resultados entre 10^4 e 10^7 UFC.mL⁻¹, sendo que os maiores resultados foram obtidos nos experimentos 3 (0,8% de melaço e 2,4% de extrato de carne) e 7 (0,5% de melaço e 2,0% de extrato de carne), respectivamente. Os menores crescimentos foram observados nos meios 2 (0,2% melaço de soja e 3,5% extrato de carne), e 5 (0,01% melaço e 3,5% extrato

de carne), respectivamente. A dificuldade de crescimento do microrganismo nestes meios pode ter ocorrido devido à insuficiência de açúcares (baixas concentrações de melaço), e excesso de nitrogênio.

TABELA 10 – RESULTADO DAS DUPLICATAS DOS ENSAIOS DO DELINEAMENTO DO TIPO DCCR.

Ensaio	(1) (UFC.ml ⁻¹)	(2) (UFC.ml ⁻¹)	(3) (UFC.ml ⁻¹)
1	2,0.10 ⁷	3,2.10 ⁶	-
2	5,8.10 ⁴	6,0.10 ⁴	-
3	1,2.10 ⁷	1,9.10 ⁷	-
4	5,5.10 ⁶	9,9.10 ⁵	-
5	2,4.10 ⁵	3,0.10 ⁵	-
6	4,9.10 ⁶	4,9.10 ⁶	-
7	4,9.10 ⁷	4,6.10 ⁷	-
8	5,2.10 ⁵	5,2.10 ⁵	-
9 (PC)	8,2.10 ⁶	4,7.10 ⁶	1,1.10 ⁷

A análise de variância com os respectivos p-valores de cada variável está apresentada na Tabela 11.

TABELA 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O DELINEAMENTO DO TIPO DCCR.

	Soma dos Quadrados	gl	Média dos quadrados	F	p-valor
(1)melaço de soja (l)	4,997128.10 ¹³	1	4,997128.10 ¹³	0,81415	0,384649
Melaço de soja (q)	1,455127.10 ¹⁴	1	1,455127.10 ¹⁴	2,37076	0,149571
(2) ext. De carne (l)	1,909692.10 ¹⁵	1	1,909692.10 ¹⁵	31,11355	0,000120
Ext. De carne (q)	2,207027.10 ¹⁴	1	2,207027. 10 ¹⁴	3,59579	0,082255
1 por 2	3,477780.10 ¹¹	1	3,477780. 10 ¹¹	0,00567	0,941237
Erro	7,365377.10 ¹⁴	12	6,137815. 10 ¹³		
Soma dos quadrados total	3,695298.10 ¹⁵	17			

A análise de variância mostra que a variável estatisticamente significativa a 90% de confiança ($p < 0,1$) foi o extrato de carne. Devido ao resultado obtido no planejamento anterior, que demonstrou que o aumento da concentração de melaço de soja de 0,2% a 1,4% influenciou negativamente o crescimento do microrganismo, optou-se por estudar a sua concentração em uma faixa menor neste planejamento. O diagrama de Pareto (Figura 4) mostra que sua adição no meio de cultura de 0,01% a 1% não foi estatisticamente significativa no crescimento do microrganismo. Já o aumento da concentração de extrato de carne de 2,0% a 5,0% apresentou efeito linear negativo estatisticamente significativo a 90% de confiança, e o efeito quadrático foi positivo.

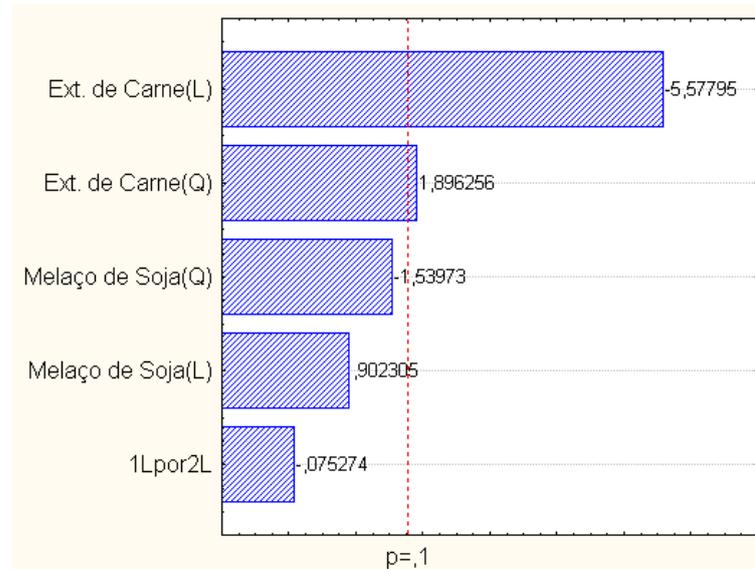


FIGURA 4 – DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO, EM UM INTERVALO DE 90% DE CONFIANÇA.

O gráfico de contorno é apresentado na Figura 5, demonstrando que a formulação ótima para o meio de cultura para a produção do inóculo se encontra em torno do ponto melaço de soja 0,5% e extrato de carne 2,0%.

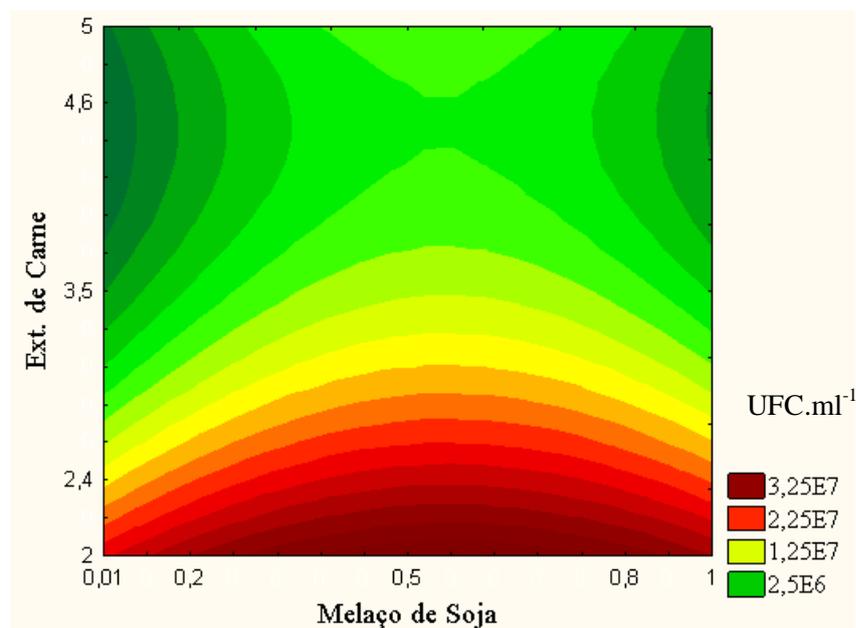


FIGURA 5 – GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE CONTOURNO PARA O DELINEAMENTO DO TIPO DCCR.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função de resposta com os dados experimentais. O modelo obtido que descreve a superfície de resposta está representado na equação 2, onde x_1 representa os valores codificados para a

variável melação de soja e x_2 para extrato de carne. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi de 0,80, o que significa que este explica 80% da variabilidade dos resultados.

$$y = 9600000 + 1767259,1078124 * x_1 - 5001000 * x_1^2 - 10925005,851866 * x_2 + 6159000 * x_2^2 - 208500 * x_1 x_2$$

O cálculo do ponto ótimo da superfície de resposta foi efetuado pelo programa *Statistics* e os valores ótimos fornecidos para as variáveis foram: melação de soja, 0,6% e extrato de carne, 2,0%. Para a validação do modelo foi realizado um experimento em triplicata nas condições otimizadas. Os resultados estão na Tabela 12.

TABELA 12- VALIDAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DO INÓCULO.

Resultados (UFC. ml ⁻¹)	Média (UFC. ml ⁻¹)	Desvio padrão (UFC. ml ⁻¹)
5,7.10 ⁷	4,510 ⁷	1,1.10 ⁷
4,3.10 ⁷		
3,3.10 ⁷		

A resposta máxima predita pelo modelo a partir dos valores otimizados foi de 3,8.10⁷ UFC.ml⁻¹, a resposta obtida pelos experimentos está próxima deste valor, o que torna válida a superfície de resposta obtida e seu respectivo modelo.

Sella *et al.* (2008) também desenvolveu um meio de cultura a base de melação de soja para o inóculo do processo de produção de esporos para sua utilização em indicador biológico. A formulação, contendo 4,0% melação de soja e 4,0% de peptona como fonte de nitrogênio, proporcionou o crescimento vegetativo de *Bacillus atrophaeus*. Assim como o resultado obtido no planejamento fatorial completo deste trabalho, o aumento da concentração de fonte de nitrogênio apresentou um efeito positivo no crescimento do microrganismo.

De acordo com os dados da composição do melação de soja fornecidos por Siqueira (2008) e Sella (2008), podemos afirmar que a formulação otimizada deste trabalho, que utiliza o melação de soja 75⁰Brix na 0,5% (p/v), possui como os principais açúcares disponíveis para a utilização do microrganismo: sacarose, 1,2 g.l⁻¹, estaquiose, 0,8 g.l⁻¹, e rafinose, 0,4g.l⁻¹.

A estaquiase e a rafinose são fontes de carbono de fácil assimilação para o microrganismo *G. stearothermophilus*, visto que este possui a enzima α -galactosidase, necessária para a hidrólise das ligações α -1,6 destes açúcares (FRIDJONSSON *et al.*, 1999). Este microrganismo também é um fermentador da sacarose (CLAUS e BERKELEY, 1986; NAZINA *et al.*, 2001), portanto, os resultados obtidos neste trabalho, que demonstraram a capacidade de crescimento de *G. stearothermophilus*, estão de acordo com a literatura.

Outros processos já foram descritos por outros autores, utilizando a sacarose como fonte de carbono para este microrganismo (WELKER e CAMPBELL, 1963; DANNER *et al.*, 1998)

Danner *et al.* (1998) demonstrou que *G. stearothermophilus* é capaz de converter a sacarose em ácido L-lático em cultura contínua em condições não estéreis. O meio desenvolvido para o crescimento vegetativo deste microrganismo, além de ser efetivo no preparo do inóculo da produção de esporos, apresenta um potencial como meio de cultura de baixo custo para outros processos biotecnológicos.

4.4 CONCLUSÃO

O microrganismo demonstrou ser capaz de se desenvolver, em sua forma vegetativa, utilizando melaço de soja como fonte de carbono. Peptona, extrato de carne e triptona se mostraram fontes de nitrogênio adequadas para a formulação do meio de cultura do inóculo.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a utilização de melaço de soja como fonte de carbono para o desenvolvimento do inóculo de *G. stearothermophilus*, o que torna estes resultados inéditos.

A adição de extrato de carne em até 3,5% contribuiu para um maior crescimento do microrganismo, porém, o aumento da concentração de melaço de soja de 0,8% a 1,4% influenciou negativamente seu crescimento. A otimização do meio de cultura através de um planejamento do tipo DCCR possibilitou a obtenção de uma superfície de resposta e um modelo quadrático que a descreve, assim como a formulação ótima do meio de cultura. A formulação otimizada foi calculada em 0,6% de melaço de soja e 2,0% de extrato de carne. A validação do modelo

apresentou um crescimento médio de $4,5 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹, sendo adequado para a utilização como inóculo na produção de esporos de *G. stearothermophilus*, em substituição ao meio de cultura industrializado (TSB).

REFERÊNCIAS

BD BIOPHARMACEUTICAL PRODUCTION: **Bionutrient Technical Manual**, 2nd ed. Becton, Dickinson & Co., Sparks, md, 72 p, 2004.

CLAUS, D., AND R. C. W. BERKELEY. Genus *Bacillus* Cohn 1872, p. 1105-1139. Em P. H. A. SNEATH, N. S. MAIR, M. E. SHARPE, AND J. G. HOLT (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.

DANNER, H.; NEUREITER, M.; MADZINGAIDZO, L.; GARTNER, M.; BRAUN, R. *Bacillus stearothermophilus* for thermophilic production of l-lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 895-903, 1998.

FRIDJONSSON, O.; WATZLAWICK, H.; GEHWEILER, A.; MATTES, R. Thermostable K-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621: cloning, sequencing and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, n. 1, p. 147-153, 1999.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHP by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbial Research**, v.156, p. 201-207, 2001.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v.99, p. 195-199, 2008.

LALUCE, C.; TOGNOLI, J.O.; OLIVEIRA, K.F.; SOUZA, C.S.; MORAIS, M.R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n.4, p. 627-637, 2009.

MILNER, J.A.; MARTIN, D.J.; SMITH, A. Two-stage inocula for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 5, p. 382-386, 1997.

NAZINA, T.N.; TOUROVA, T. P.; POLTARAUS, A.B.; NOVIKOVA, E.V.; GRIGORYAN, A.A.; IVANOVA, A.E.; LYSENKO, A.M.; PETRUNYAKA, V.V.; OSIPOV, G.A.; BELYAEV, S.S.; IVANOV, M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp.nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, V. 51, P. 433 - 446, 2001.

SELLA, S. R. B. R.; DLUGOKENSKI, R. E. F.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Selection and optimization of *Bacillus atrophaeus* inoculum medium and its effect on spore yield and thermal resistance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, p. 380–392, 2008.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. p. 141–148 , 2004.

SIQUEIRA, P. F. Production of bio-ethanol from soy bean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea.Curitiba, Brazil, 2006.

SIQUEIRA, P. F. KARP, S.G. ; CARVALHO, J.C. ; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A. ; THOLOZAN, J.L. ; SINGHANIA, R.R. ; PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n.17, p. 8156-8163, 2008

WELKER, N.E.; CAMPBELL, L. L. Effect of carbon sources on formation of α -amylase by *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 86, p. 681-686, 1963

5 PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

5.1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies do gênero *Bacillus* são utilizadas industrialmente com diversas finalidades, pois são não-patogênicas, facilmente cultiváveis, possuem um metabolismo versátil e se adaptam a diferentes fontes de nutrientes. Em processos fermentativos são utilizados na produção de enzimas, antibióticos, surfactantes, e outros metabólitos. Em sua forma esporulada também possuem interesse comercial, como: probióticos, bioinseticidas, agentes de controle biológico e bioindicadores. Sua capacidade de manter a viabilidade durante condições adversas os tornam apropriados para formulações comerciais estáveis.

Diversos meios de cultura definidos como promotores de esporulação já foram desenvolvidos apresentando resultados satisfatórios (CAMPBELL e WILLIAMS, 1953; ROWE *et al.*, 1975; GUZMAN *et al.* 1972; HODGES *et al.*, 1980), porém, para a produção em larga escala apresentam um custo muito elevado. Muitos trabalhos relatam a utilização de diferentes meios de cultura na tentativa de otimizar o processo, e com a crescente demanda industrial também cresce a necessidade da utilização de matérias primas de baixo custo como fontes nutricionais, especialmente resíduos e sub-produtos da agroindústria.

Mizumoto e Shoda (2007) utilizaram okara (resíduo da soja proveniente da fabricação de tofu) e farelo de soja no cultivo de *Bacillus subtilis* RB14-CS para a produção de iturina A, um lipopeptídeo que suprime o crescimento de diversos patógenos em plantas.

Com o objetivo de produzir um agente de controle biológico contra podridão negra das raízes, Luna *et al.* (2002) avaliaram a produção de *B. subtilis* R14 em um biorreator do tipo batelada utilizando melaço de cana e extrato de levedura. Foi observado que diminuindo a relação C/N o tempo de esporulação diminuiu, pois a formação de esporos estava associada ao esgotamento dos açúcares redutores.

Shi e Zhu (2007) utilizaram efluente de destilaria suplementado para a produção de esporos de *B. subtilis*. Através da aplicação de planejamentos estatísticos avaliaram a influência da adição de diversas fontes de carbono,

nitrogênio e sais inorgânicos ao efluente no crescimento do microrganismo e identificaram a melhor formulação para a produção. Os nutrientes que se mostraram mais adequados para a suplementação do efluente de destilaria foram sulfato de amônia, sulfato de manganês e farinha de milho. As fontes de nitrogênio orgânicas resultaram em maior produção de esporos do que as inorgânicas, e entre elas, o extrato de levedura e peptona foram as melhores fontes de nitrogênio orgânicas. Ambas possuem alta concentração de proteína ou hidrolisado de proteína, o que indica que suas concentrações podem ser fatores chave na esporulação. No trabalho citado, a suplementação do meio com $MgSO_4$, $CaCO_3$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 aumentou a produção de esporos em 1 log aproximadamente.

Chen *et al.* (2010) verificaram que o amido de milho, a farinha de milho e o farelo de trigo se mostraram excelentes fontes de carbono para a obtenção de altos índices de esporulação de *B. subtilis* em meio líquido, e farinha de soja, água de maceração de milho e extrato de levedura excelentes fontes de nitrogênio. A farinha de soja também foi utilizada na esporulação de outras espécies como *B. sphaericus* para controle biológico de mosquitos (PRABAKARAN *et al.*, 2007) e *B. thuringiensis* como biopesticida (VALICENTE *et al.*, 2008). A Água de maceração de milho foi citada como fonte de nitrogênio de baixo custo na produção de esporos de *B. thuringiensis var. israelensis* (LUNA *et al.*, 2004) e de *B. cereus* (LALLOO *et al.*, 2009).

Com relação a produção de esporos de *G. stearothermophilus*, alguns trabalhos foram desenvolvidos estudando a influência das fontes de nutrientes em sua esporulação, mas pouca literatura recente foi encontrada.

Alguns meios de cultura definidos foram desenvolvidos ou modificados para *G. stearothermophilus*, como o meio semi-sólido de Campbell e Williams (1953), contendo ácido glutâmico, metionina, leucina, triptofano, histidina e valina; o meio líquido de Anderson e Freisen (1972) (citado por HOXEY *et al.*, 1984) contendo ácido glutâmico e o meio semi-sólido de Guzman *et al.* (1972) contendo apenas leucina como fonte de aminoácidos. Destes, o que apresentou melhor resultado foi o meio semi-sólido de Campbell e Williams com índices de 80% de esporulação para algumas linhagens.

Long e Williams (1959) relataram a produção de esporos de *G. stearothermophilus* em um meio complexo com triptose e glucose e demonstraram que a 55°C a aeração influenciou negativamente o rendimento. No entanto,

Thompson e Thames (1967) estudaram sua esporulação em meios de cultura contendo triptona, peptona e sulfato de manganês, em cultivo submerso com aeração por borbulhamento, demonstrando a suscetibilidade da esporulação às influências nutricionais. Kim e Naylor (1966) relataram a esporulação em ágar nutriente suplementado com extrato de levedura e cloreto de manganês, verificando que ao reduzir a concentração de extrato de levedura a produção de esporos era reduzida drasticamente. Guzman *et al.* (1972) testou diversos aminoácidos individualmente e em combinações em um meio definido, demonstrando que a composição de aminoácidos do meio afeta o rendimento da formação de esporos.

Linhagens de *G. stearothermophilus* não esporulam tão facilmente quanto outras espécies de *Bacillus*, mas melhores índices de esporulação podem ser obtidos em meio semi-sólidos do que em meio líquido. Este fato pode ser devido a maior superfície de troca gasosa fornecida pelos meios semi-sólidos (HOXEY *et al.*, 1984; WRIGHT *et al.* 1995).

Penna *et al.* (2000) testaram diversas formulações de meio complexo para esporulação de *G. stearothermophilus* para utilização em indicador biológico para esterilização a vapor, e verificaram que o extrato de levedura, a peptona e o sulfato de amônio contribuíram para os melhores resultados, entre 10^6 e 10^7 esporos/ml em suspensão. Penna *et al.* (2003) avaliaram a influência das concentrações de glicose, peptona, extrato de levedura e de cátions divalentes na formação de esporos e sua resistência ao calor úmido, e também verificaram que o aumento das concentrações de peptona e extrato de levedura favoreceu a formação de esporos.

O objetivo desta etapa foi testar e comparar a capacidade de diferentes fontes nutricionais na produção de esporos de *G. stearothermophilus* em cultivo semi-sólido em ágar, e avaliar as características dos esporos produzidos para a sua utilização em indicadores biológicos para esterilização a vapor. Na primeira parte foram testadas fontes nutricionais industrializadas com a finalidade de eleger um meio de esporulação de referência para o trabalho. Na segunda parte foram testadas fontes nutricionais alternativas, como sub-produtos e resíduos da agroindústria.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Comparação entre meios de cultura industrializados

Foram testados três meios de esporulação utilizando somente matérias primas industrializadas geleificadas com ágar com as seguintes formulações:

- Meio 1: peptona de caseína, 0,3%; triptona, 0,5%; extrato de carne, 0,3%; extrato de levedura, 0,5%; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,005%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005%; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,005 %; K_2HPO_4 , 0,005 %; ágar, 2,0% (SELLA, 1995).

- Meio 2: extrato de levedura, 0,8%; caldo nutriente, 0,4%; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01%; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,005 %; ágar, 2,0%. (KIM e NAYLOR, 1966);

- Meio 3: TSB, 3%; ágar, 2%.

- Meio 4: TSB, 3%; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05%; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,05%; K_2HPO_4 , 0,1%; ágar, 2%.

- Meio 5: amido, 1%; extrato de levedura, 0,1%; triptona, 0,15%; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05%; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,05%; K_2HPO_4 , 0,1%; ágar, 2%. (CARMELO *et al.*, 2002 modificado)

O meio 1 foi desenvolvido por Sella (1995) para a produção de esporos de *G. stearothermophilus* para indicador biológico para esterilização a vapor, que é o mesmo padronizado pelo CPPI para a produção de esporos do indicador biológico (PARANÁ, 2005). Foi testada também a capacidade de promoção de formação de esporos do TSB adicionado de ágar (com e sem a adição de sais), já que este é um excelente promotor de crescimento de *G. stearothermophilus* em meio líquido e rico em nutrientes. O meio 5 foi desenvolvido por Carmelo *et al.* (2002) para o cultivo de *G. stearothermophilus* em meio líquido para produção de amilase em batelada alimentada. O meio foi modificado pela adição de ágar para verificar se o amido seria uma boa fonte de carbono para esporulação, e se esta formulação em meio semi-sólido forneceria o esgotamento das fontes de carbono em poucas horas e, conseqüentemente, a formação de esporos.

Os cultivos foram realizados em garrafas de 200 ml contendo 60 ml de meio de cultura inclinado em cada uma. Todos tiveram seu pH ajustado para 7,4 com NaOH 0,1N e foram autoclavados a 121^oC durante 15 minutos. O inóculo foi preparado como descrito no 3.2.2 e a taxa de inoculação foi de 1%. Foram realizados cultivos a 57,5 ± 2,5^oC de 3, 7 e 12 dias de incubação, em duplicata.

As suspensões de esporos foram preparadas e quantificadas como descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4 respectivamente. Os esporos produzidos com rendimento

maior do que $1,0 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹ foram utilizados no preparo de indicadores biológicos contendo o meio de recuperação padronizado pelo CPPI (Paraná, 2003) e submetidos ao teste de resistência térmica para a determinação dos parâmetros de resistência ao calor úmido.

Para a formulação que apresentou melhor resultado, foi realizada uma curva de produção de esporos, com acompanhamento diário por até 12 dias de incubação, em duplicata. Nesta etapa, a recuperação dos microrganismos foi feita raspando-se a superfície do ágar delicadamente com um bastão de vidro e resuspendendo em 50 ml de água deionizada. Foi realizada a quantificação de microrganismos viáveis totais (bacilos e esporos) antes do tratamento térmico, e de esporos após o tratamento térmico. Depois de realizada toda a cinética, apenas as amostras que apresentaram contagem de células viáveis maior do que $1,0 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹, para foram utilizadas no preparo de suspensões de esporos e submetidas ao teste de resistência térmica

5.2.2 Fermentação em estado sólido

A técnica de Fermentação em Estado Sólido foi realizada de acordo com o item 3.2.8. Foram testados três matérias primas como suporte para o cultivo: Casca de soja, polpa cítrica e bagaço de cana. O meio de cultura líquido adicionado como fonte de nutrientes na etapa de seleção do suporte foi o utilizado pelo CPPI para produção de esporos (PARANÁ, 2005), preparado em tampão fosfato pH 7,8 com a finalidade de neutralizar a acidez dos suportes. Após adicionado o meio de cultura líquido, os Erlenmeyers foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C. O inóculo foi preparado como descrito no item 3.2.2 e a taxa de inoculação foi de 10%. Foram realizados cultivos de três, sete e doze dias para cada suporte testado a $57,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ em duplicata.

A quantificação dos microrganismos viáveis foi realizada de acordo com o item 3.2.4. O suporte que apresentou melhor resultado foi testado novamente com meios de cultura formulados com sub-produtos agroindustriais da soja, apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS LIQUIDOS ADICIONADOS AO SUPORTE DA FES ESCOLHIDO.

Formulações líquidas
Controle (PARANÁ, 2003)
Melaço 0,45%, triptona 1,5% e sais*
Melaço 0,45% e sais *
Vinhaça 1,5%, extrato de levedura 0,8% e sais *
Vinhaça 1,5% e sais*
* Sais = MgSO ₄ .7H ₂ O 0,005%; MnSO ₄ .H ₂ O 0,0038%; CaCl ₂ .2H ₂ O 0,0034%; KH ₂ PO ₄ 0,005%.

5.2.3 Esporulação com fontes nutricionais alternativas em ágar

Para a produção de esporos termorresistentes de *G. stearotherophilus* foram testadas formulações utilizando resíduos e sub-produtos da soja (farinha, farelo, extrato, melaço e vinhaça) e matérias primas industrializadas (extrato de carne, extrato de levedura e triptona), todos contendo ágar 2%. O meio controle utilizado para comparação foi o meio utilizado pelo CPPI na produção de esporos para o indicador biológico Esteriteste (PARANÁ, 2005), cuja formulação está descrita no item 3.2.3.

A esporulação foi feita em garrafas de leite contendo 60 ml de ágar inclinado. As formulações dos meios de cultura estão na Tabela 2. Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 7,4 com NaOH 1N e foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos. O inóculo foi preparado como descrito no item 3.2.2 e a taxa de inoculação foi de 1%. Os experimentos foram realizados em duplicata e incubados a 57,5 ± 2,5°C durante sete dias.

Os esporos produzidos com rendimento maior do que 1,0.10⁶ UFC.ml⁻¹ foram utilizados no preparo de indicadores biológicos e submetidos ao teste de resistência térmica para a determinação dos parâmetros de resistência ao calor úmido. Como nesta etapa foi visada a utilização de resíduos e sub-produtos industriais, o meio de recuperação utilizado no indicador biológico foi meio a base de vinhaça de soja formulado por Dlugokenski (2008) descrito no 3.2.5

TABELA 2 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE ESPORULAÇÃO CONTENDO FONTES NUTRICIONAIS ALTERNATIVAS.

Formulações testadas (% p/v)	
1	Melaço 0,45% e triptona 1,9%
2	Melaço 0,45% , triptona 1,9% e sais*
3	Melaço 0,8% e ext. de carne 2%
4	Melaço 0,8%, ext. de carne 2% e sais*
5	Melaço 0,8% e peptona 2%
6	Melaço 0,8% peptona 2% e sais*
7	Melaço 0,8%
8	Melaço 0,45%
9	Vinhaça 1,5% e ext. de levedura 0,8%
10	Vinhaça 1,5%, ext. de levedura 0,8% e sais*
11	Farinha 4%
12	Farelo 4%
13	Farinha 2% e melaço 0,2%
14	Farelo 2% e melaço 0,2%
15	Extrato 0,57% e melaço 0,2%
16	Controle

* Sais = MgSO₄.7H₂O 0,005%; MnSO₄.H₂O 0,0038%; CaCl₂.2H₂O 0,0034%; KH₂PO₄ 0,005%.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Produção de esporos em meios de cultura industrializados

Os resultados da produção de esporos nos meios de cultura industrializados estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DAS SUSPENSÕES OBTIDAS NOS MEIOS DE CULTURA INDUSTRIALIZADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO. MÉDIAS DAS DUPLICATAS EM UFC.ML⁻¹

Meios	3 dias	7 dias	12 dias
1	9,6.10 ⁶	1,3.10 ⁷	1,2.10 ⁷
2	2,4.10 ⁶	5,4.10 ⁶	4,3.10 ⁶
3	1,2.10 ⁷	1,1.10 ⁷	1,1.10 ⁷
4	1,2.10 ⁷	1,5.10 ⁷	1,2.10 ⁷
5	1,0.10 ³	4,5.10 ⁴	4,0.10 ³

Os meios 1 (padronizado pelo CPPI), 3 e 4 (TSB adicionado de ágar, TSB adicionado de ágar e sais inorgânicos, respectivamente) foram os que forneceram maior quantidade de esporos em todos os tempos de incubação, em torno de 10⁷ UFC.ml⁻¹. O meio 2 (KIM e NAYLOR, 1966) forneceu resultados em torno de 10⁶ UFC.ml⁻¹, e o meio 5 (contendo amido como fonte de carbono) foi o que apresentou a menor produtividade (10³ a 10⁴ UFC.ml⁻¹). É interessante observar que o meio 3

produziu esporos mesmo sem a adição dos sais estimuladores de esporulação, e com apenas três dias de incubação.

Os resultados de produtividade dos meios estudados foram submetidos ao teste F, que forneceu um p-valor $< 0,1$, indicando que existe diferença significativa entre as médias em um intervalo de 90% de confiança (Tabela 4).

TABELA 4 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PRODUTIVIDADE DOS MEIOS DE CULTURA INDUSTRIALIZADOS PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F _{calc}	p-valor
Entre grupos	$3,84187 \cdot 10^{14}$	4	$9,60467 \cdot 10^{13}$	55,26	0,0000
Dentro dos grupos	$1,73812 \cdot 10^{13}$	10	$1,73812 \cdot 10^{12}$		
Total Corrigido	$4,01568 \cdot 10^{14}$	14			

Para determinar quais médias são significativamente diferentes entre si foi realizado o teste de comparação múltipla pelo método da menor diferença significativa de Fisher (Fisher's LSD). Os resultados são mostrados graficamente na Figura 1.

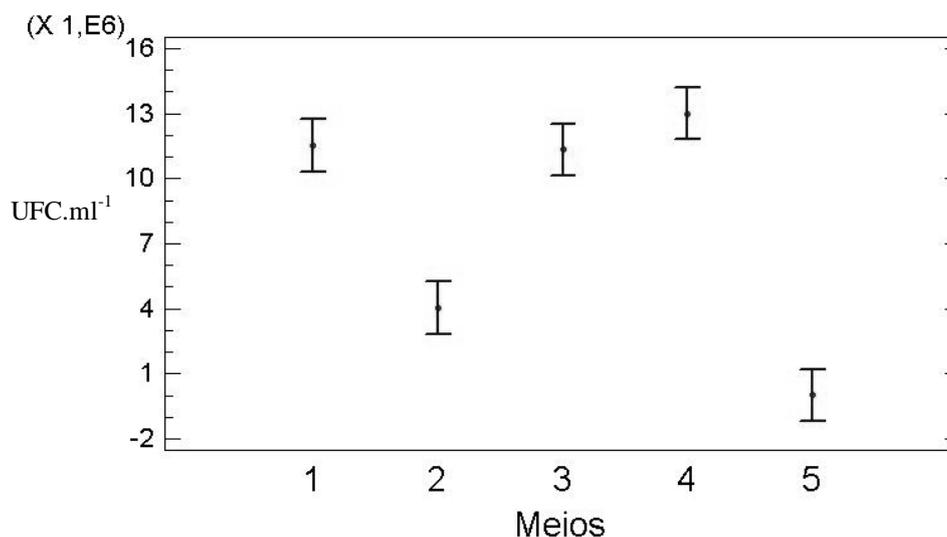


FIGURA 1 – PLOTAGEM DAS MÉDIAS DA PRODUTIVIDADE DOS MEIOS PARA ESPORULAÇÃO CONTENDO MATÉRIAS PRIMAS INDUSTRIALIZADAS. MEIOS: (1) SELLA, 1995. (2) KIM E NAYLOR, 1966. (3) TSB E ÁGAR. (4) TSB, SAIS E ÁGAR. (5) CARMELO *et al*, 2002 MODIFICADO.

A produtividade dos meios 1, 3 e 4 (meio padronizado pelo CPPI, meio TSB 3%, e meio TSB 3% adicionado de sais inorgânicos, respectivamente) são estatisticamente iguais entre si e diferentes nos meios 2 e 5 (meio contendo extrato de levedura, caldo nutriente adicionado de sais inorgânicos e meio contendo amido como fonte de carbono, respectivamente).

O meio 5 foi descartado devido a sua baixa produtividade. Apesar da produtividade do meio 2 ser inferior e estatisticamente diferente dos meios 1, 3 e 4, ela é suficiente para a utilização no preparo do indicador biológico (acima de $1,0 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹), logo, os esporos produzidos neste meio também foram submetidos ao teste de termorresistência.

Os valores do tempo de redução decimal e do tempo médio de morte das suspensões de esporos obtidas dos meios 1 a 4 com 3, 7 e 12 dias de incubação são mostrados na Tabela 5.

Os esporos produzidos no meio 3 foram os que apresentaram menor termorresistência, com valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 2,4 minutos 1,8 minutos e 1,9 minutos com 3, 7 e 12 dias de incubação respectivamente; em seguida foram os esporos produzidos no meio 4 com valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 2,9 minutos 2,4 minutos e 1,8 minutos com 3, 7 e 12 dias de incubação respectivamente. Os meios 1 e 2 produziram esporos com termorresistência semelhante (valores de $D_{121}^{\circ C}$ em torno de 3 minutos).

TABELA 5 – RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS EM DIVERSOS MEIOS COM MATÉRIAS PRIMAS INDUSTRIALIZADAS. RESULTADOS EM MINUTOS.

Meios	3 dias		7 dias		12 dias	
	$D_{121}^{\circ C}$	U_{sk}	$D_{121}^{\circ C}$	U_{sk}	$D_{121}^{\circ C}$	U_{sk}
1	3,2±0,1	16,2±0,7	3,2 ±0,1	16,2±0,7	3,1±0,2	16,1±0,8
2	3,2±0,2	16,0±0,9	3,2±0,2	16,0±0,9	2,7±0,1	13,5±0,5
3	2,4±0,1	11,0±0,5	1,8±0,03	8,5±0,2	1,9±0,1	8,7±0,5
4	2,9±0,1	13,5±0,5	2,4±0,1	11,2±0,5	1,8±0,03	8,5±0,2

Os meios 1, 3 e 4 apresentaram produtividade equivalente, porém destes, o que apresentou melhor resistência térmica dos esporos produzidos foi o meio 1 ($D_{121}^{\circ C}$ de 3,2 minutos e U_{sk} de 16,2 minutos já no terceiro dia de incubação). Por esta razão ele foi escolhido como o meio de referência e teve sua produtividade avaliada durante doze dias de incubação consecutivos (Tabela 6 e Figura 2).

A Figura 2 apresenta a curva de esporulação do Meio 1 (SELLA, 1995). Observa-se um aumento do número de microrganismos viáveis totais, sendo que aproximadamente 1 log é representado por bacilos. No segundo dia de cultivo ainda pode-se notar a presença de aproximadamente 1 log de bacilos viáveis e a partir do

terceiro dia o número de microrganismos viáveis totais torna-se muito próximo do número de esporos (Figura 2).

TABELA 6 – PRODUÇÃO DE ESPOROS NO MEIO 1 DURANTE 12 DIAS.

Tempo de incubação (dias)	Células viáveis totais (UFC.ml ⁻¹)	Esporos (UFC.ml ⁻¹)
0 (Inóculo)	$1,3 \cdot 10^6$	0
1	$7,4 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^6$
2	$3,1 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^6$
3	$5,6 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$
4	$5,8 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$
5	$4,1 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$
6	$2,0 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$
7	$2,3 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$
8	$2,2 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$
9	$2,0 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
10	$2,4 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$
11	$1,9 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$
12	$1,8 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$

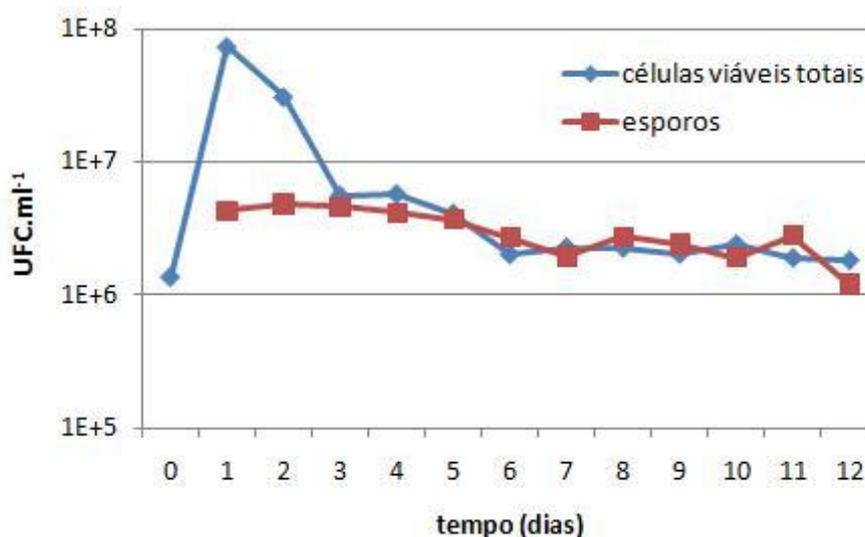


FIGURA 2 – CURVA DE ESPORULAÇÃO DO MEIO 1 DURANTE 12 DIAS.

Podemos concluir então que a partir do terceiro dia de cultivo não existe mais um número significativo de bacilos viáveis no meio de cultura, apenas esporos. A quantidade de esporos formados no primeiro dia permanece praticamente a mesma nos dias de cultivo que o sucedem. Segundo a Farmacopéia Americana, o erro da metodologia de contagem de colônias pode ser de até 300%, portanto, esta pequena variação pode ser considerada desprezível (U.S.P. 29, 2006).

Apesar da coloração de Gram do esfregaço do primeiro dia de cultivo apresentar somente bacilos (Figura 3), a contagem de esporos viáveis (após

tratamento térmico letal das formas vegetativas) demonstra a presença de esporos. Isto se deve ao fato de os esporos estarem formados, porém ainda dentro da célula mãe. A coloração de Gram do segundo dia de cultivo já permite a visualização de esporângios (Figura 4), e no terceiro dia (Figura 5) já é possível visualizar esporos maduros (que apresentam refratibilidade, área não corada).

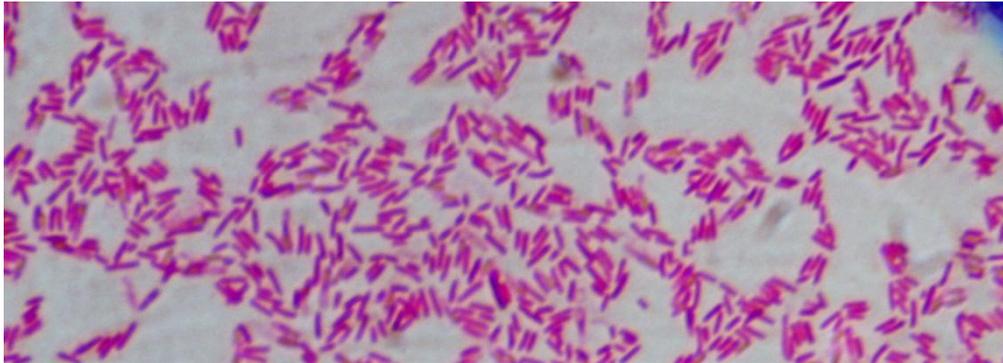


FIGURA 3 - COLORAÇÃO DE GRAM DO ESFREGAÇO DO CRESCIMENTO DO MEIO 1 APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO. AUMENTO DE 100X.
FONTE: O AUTOR.

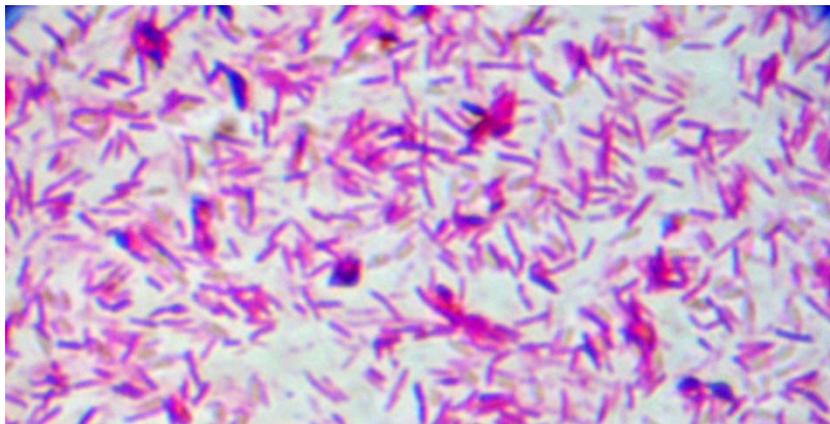


FIGURA 4 - COLORAÇÃO DE GRAM DO ESFREGAÇO DO CRESCIMENTO DO MEIO 1 APÓS 2 DIAS DE INCUBAÇÃO. AUMENTO DE 100X.
FONTE: O AUTOR.

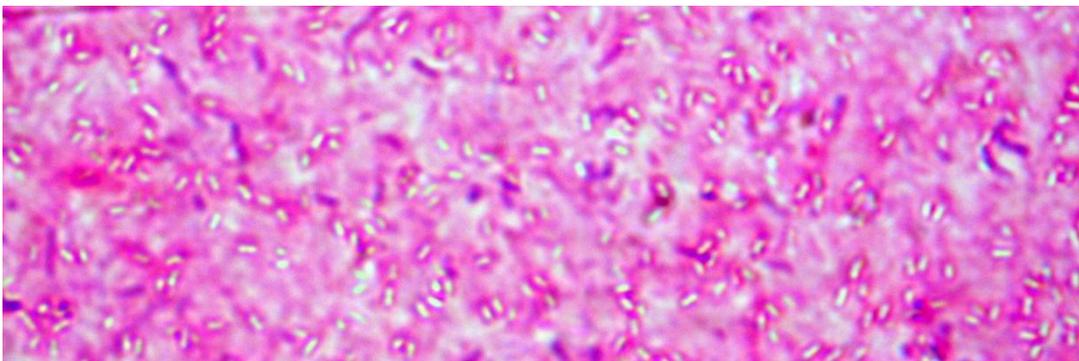


FIGURA 5 - COLORAÇÃO DE GRAM DO ESFREGAÇO DO CRESCIMENTO DO MEIO 1 APÓS 3 DIAS DE INCUBAÇÃO. AUMENTO DE 100X.
FONTE: O AUTOR.

Para verificar se os esporos produzidos nos três primeiros dias de incubação possuem resistência ao calor úmido, foi feito um *pool* das duplicatas de cada dia de cultivo. Estes foram centrifugados e as suspensões de esporos foram preparadas. A concentração final de esporos nas suspensões preparadas estão na Tabela 7.

TABELA 7 – CONCENTRAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS PREPARADAS NO MEIO 1 NOS TRÊS PRIMEIROS DIAS DE CULTIVO.

Tempo de incubação (dias)	Esporos (UFC.ml ⁻¹)
1	1,0.10 ⁷
2	6,0.10 ⁶
3	6,4.10 ⁶

Os resultados foram compatíveis com o experimento anterior, o meio 1 forneceu suspensões de esporos em torno de 1,0.10⁷ UFC.ml⁻¹. Os resultados da resistência térmica destas suspensões de esporos estão na Tabela 8.

TABELA 8 –RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS NO MEIO 1 (SELLA, 1995).

Tempo de incubação (dias)	D _{121 °C} (min)	U _{sk} (min)
1	3,3 ± 0,2	13,6 ± 0,8
2	3,8 ± 0,1	16,0 ± 0,5
3	3,8 ± 0,3	15,8 ± 1,3

Os maiores valores de resistência térmica foram fornecidos pelos esporos obtidos a partir do segundo dia de incubação, com valores de D_{121 °C} de 3,8 minutos e U_{sk} de 16,0 minutos. Porém, a variabilidade da metodologia de contagem de colônias (de até 300%) influencia também no resultado de resistência térmica, logo os resultados obtidos durante os três dias podem ser considerados semelhantes.

A maioria dos autores compara o rendimento dos meios de cultura através da porcentagem de esporulação obtida por contagem direta em microscópio. Neste trabalho não foi avaliada a porcentagem de esporulação oferecida por cada meio de cultura, mas sim a contagem final de esporos na suspensão preparada, pois o objetivo é produzir uma suspensão de esporos adequada para o preparo de indicadores biológicos. Comparando com os resultados obtidos por Penna *et al.* (2000) os meios 1 a 4 estão de acordo com resultados encontrados na literatura (de 10⁶ a 10⁷ UFC.ml⁻¹).

A baixa produção de esporos pelo meio 5 pode ser devido à sua baixa concentração de proteínas. Nota-se também a grande quantidade de sais de cálcio e manganês nesta formulação (dez vezes maior do que a concentração no meio 1), e

estes íons divalentes em concentrações muito altas podem estar inibindo processos metabólicos fundamentais para a esporulação. Outra hipótese seria a indisponibilização do cálcio adicionado ao meio. Após a esterilização deste meio notou-se a formação de um precipitado branco no fundo dos frascos. Isto pode ter ocorrido devido à grande quantidade de fosfato de potássio e cloreto de cálcio. Ambos podem reagir durante o processo de esterilização formando fosfato de cálcio insolúvel (precipitado), o tornando o cálcio indisponível ao microrganismo.

Para alguns meios de cultura o tempo de incubação pode chegar a 14 dias (HOXEY *et al.*, 1984). Os meios complexos testados por Penna *et al.* (2000) foram incubados por 3 a 6 dias, sendo que 6 dias de incubação produziram esporos mais termorresistentes. Os meios 1 a 4 deste experimento demonstram rendimento máximo com apenas 3 dias de incubação, e o aumento do tempo de incubação não acarretou em aumento da resistência térmica dos esporos. O resultado obtido com o meio 2 está de acordo com o obtido por Kim e Naylor (1966) e Albert *et al.* (1998), em 72 horas de incubação os resultados já são satisfatórios.

A Farmacopéia Americana – USP 29- recomenda que o indicador biológico apresente o valor de $D_{121}^{\circ C}$ acima de 1,5 minutos e de U_{sk} entre 9 e 15 minutos, logo, os esporos produzidos no meio 1 (SELLA, 1995) somente com 24 horas (1 dia) de incubação possuem resistência ao calor úmido satisfatória para uso no indicador biológico ($D_{121}^{\circ C}$ de 3,3 minutos e U_{sk} de 13,6 minutos).

5.3.2 Produção de esporos utilizando sub-produtos da agroindústria

A umidade inicial utilizada para os suportes testados foi: polpa cítrica, 75%; casca de soja, 83,3%; bagaço de cana, 85,7%. Uma maior umidade inicial pode ser obtida com o bagaço de cana devido à sua baixa atividade de água (0,288) e a umidade (3,4%), que lhe confere uma alta capacidade de absorção de água (SELLA, 2008).

Os resultados do processo de esporulação nos três suportes testados estão nas Tabelas 9, 10 e 11. Os valores apresentados são as médias obtidas dos experimentos em duplicata. O tempo 0 de incubação representa as características iniciais do cultivo após esterilização do substrato e adição do inóculo.

TABELA 9- RESULTADOS DA FES UTILIZANDO POLPA CÍTRICA COMO SUPORTE.

Tempo de incubação (dias)	Totais (UFC.g massa seca ⁻¹)	Esporos (UFC.g massa seca ⁻¹)	pH	Aw
0	8,5.10 ⁶	0	5,1	0,967
3	4,2.10 ⁵	2,6.10 ⁵	4,9	0,966
7	4,6.10 ⁵	2,5.10 ⁵	4,8	0,965
12	2,2.10 ⁵	1,4.10 ⁵	4,7	0,964

TABELA 10- RESULTADOS DA FES UTILIZANDO CASCA DE SOJA COMO SUPORTE.

Tempo de incubação (dias)	Totais (UFC.g massa seca ⁻¹)	Esporos (UFC.g massa seca ⁻¹)	pH	Aw
0	8,6.10 ⁶	0	6,3	0,972
3	2,0.10 ⁵	1,7.10 ⁵	5,4	0,969
7	2,7.10 ⁵	1,6.10 ⁵	5,3	0,969
12	1,9.10 ⁵	2,3.10 ⁵	5,3	0,968

TABELA 11- RESULTADOS DA FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA COMO SUPORTE.

Tempo de incubação (dias)	Totais (UFC.g massa seca ⁻¹)	Esporos (UFC.g massa seca ⁻¹)	pH	Aw
0	1,0.10 ⁷	0	6,7	0,969
3	1,3.10 ⁶	1,0.10 ⁶	6,6	0,969
7	8,4.10 ⁵	7,0.10 ⁵	6,4	0,969
12	9,8.10 ⁵	4,0.10 ⁵	6,2	0,968

Os suportes de casca de soja e polpa cítrica renderam resultados em torno de 10⁵ UFC.g de massa seca⁻¹, e o bagaço de cana apresentou um maior número de esporos, em torno de 10⁶ UFC.g de massa seca⁻¹. Para todos os suportes estudados, é possível verificar que desde o terceiro dia de incubação a quantidade de microrganismos totais (esporos e células vegetativas) é muito próxima da quantidade de esporos obtidos, o que significa que com três dias de incubação não existem mais células vegetativas no cultivo. Também é possível observar para todos os suportes, que o rendimento máximo da esporulação já foi obtido no terceiro dia de incubação (aproximadamente 10⁵ UFC.g de massa seca⁻¹ para polpa cítrica e casca de soja e de 10⁶ UFC.g de massa seca⁻¹ para bagaço de cana), não aumentando até o décimo segundo dia.

Comparando o número inicial de células no cultivo e a quantidade de esporos obtida, é possível concluir que a técnica de fermentação em estado sólido proporcionou a transformação das células em esporos, porém não permitiu o crescimento vegetativo das células antes da esporulação e, conseqüentemente, o aumento da biomassa. Para a produção de esporos para indicador biológico este resultado não é o ideal, pois demandaria um volume maior de meio para a formação de esporos e um maior volume de solução de lavagem e recuperação dos mesmos. O ideal seria um aumento de biomassa com o início do cultivo, para proporcionar um

maior número de esporos por volume de meio, diminuindo os custos da produção e facilitando a recuperação dos esporos obtidos.

Apesar da utilização de solução tampão com pH alcalino (7,8), todos os cultivos resultaram em grande acidificação do meio após a autoclavação. A polpa cítrica foi a que apresentou maior decréscimo do pH após esterilização, de 2,7 unidades de pH. Quando comparada às condições iniciais, o cultivo em casca de soja foi o que apresentou uma maior acidificação do meio, com uma queda em torno de 1 unidade de pH. O pH é um fator importante na fermentação em estado sólido assim como em todo cultivo, podendo afetar o desenvolvimento do microrganismo em questão. Sella (2008) demonstrou que o aumento do pH influenciou positivamente a esporulação de *Bacillus atrophaeus* em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana como suporte. Segundo Yazdany e Lashkari (1975) o pH ideal para esporulação de *G. stearotherophilus* se encontra entre 7,7 e 8,7. O baixo pH do substrato pode ter contribuído para a obtenção de baixos rendimentos neste processo.

A água possui grande importância no crescimento de microrganismos, pois atua como um solvente para nutrientes e metabólitos, influenciando a difusão de biomoléculas e gases, assim como a osmorregulação da célula. A atividade de água pode ser suficiente para explicar os efeitos da água em cultivos em suporte sólido (GERVAIS e MOLIN, 2003). Seus valores sofreram uma pequena alteração apenas no cultivo utilizando polpa cítrica como substrato, porém, em todos os cultivos este parâmetro se mostrou dentro do valor adequado (em torno de 0,96) para o crescimento do microrganismo, visto que bactérias do gênero *Bacillus* necessitam de valores maiores de 0,90 para seu desenvolvimento (BROWN, 1976).

Apesar dos valores de atividade de água terem se mantido em um nível adequado, optou-se por realizar um novo cultivo controlando a umidade do processo. Utilizou-se papel alumínio para vedar a boca dos frascos e impedir a evaporação da água, e em paralelo foi realizado um cultivo com frascos fechados com tampão de algodão ou papel de alumínio. Utilizou-se o bagaço de cana como suporte por ter apresentado melhor resultado. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Apesar da atividade de água ter se mantido em níveis adequados nos dois cultivos, a diminuição da umidade foi menor quando foi utilizado papel alumínio para vedar os frascos. O cultivo vedado com tampão de algodão apresentou um

decréscimo de 26,7 % em sua umidade inicial no final do décimo segundo dia de cultivo, enquanto o vedado com papel alumínio apresentou um decréscimo de apenas 5,7%. Esta perda significativa de umidade se deva à alta temperatura de incubação (próxima a 60°C).

TABELA 12 – RESULTADOS DA FES UTILIZANDO TAMPÃO DE ALUMÍNIO OU DE ALGODÃO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA COMO SUPORTE

Tempo de incubação (dias)	Com tampão de algodão				Com papel alumínio			
	Esporos (UFC.g massa seca ⁻¹)	pH	aw	U (%)	Esporos (UFC.g massa seca ⁻¹)	pH	aw	U (%)
0	0	6,7	0,969	85,7	0	6,8	0,969	85,7
3	1,2.10 ⁶	6,6	0,969	78,1	1,910 ⁶	6,7	0,969	81,4
7	8,4.10 ⁵	6,4	0,969	63,8	7,8.10 ⁵	6,5	0,969	81,2
12	9,8.10 ⁵	6,2	0,968	62,8	1,2.10 ⁶	6,3	0,968	80,8

Nos três primeiros dias de incubação, quando ambos já apresentaram o rendimento máximo de esporos produzidos (aproximadamente 10⁶ UFC.g de massa seca⁻¹), o cultivo vedado com tampão de algodão apresentou um decréscimo de 8,9% em sua umidade inicial, enquanto o vedado com papel alumínio apresentou um decréscimo de apenas 5%. Apesar desta diferença na perda de umidade, os dois cultivos apresentaram resultados equivalentes, portanto a água parece não ter sido um fator limitante neste processo.

Foi realizado um novo experimento utilizando o bagaço de cana como suporte e fontes de carbono alternativas como substrato (vinhaça e melado de soja). Devido aos resultados anteriores o tempo de incubação foi padronizado em três dias. Os resultados estão na Tabela 13:

TABELA 13 – RESULTADOS DA FES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA COMO SUPORTE E DIFERENTES FONTES DE CARBONO ALTERNATIVAS

Meio	Esporos (UFC.g massa seca ⁻¹)	Esporos (UFC.ml ⁻¹)
Controle (PARANÁ, 2003)	1,9.10 ⁵	8,0.10 ³
Melado 0,45% e triptona 1,5%	4,8.10 ³	2,0.10 ²
Melado 0,45%	1,6.10 ⁴	4,4.10 ²
Vinhaça 1,5% e extrato de levedura 0,8%	7,5.10 ⁴	3,1.10 ³
Vinhaça 1,5%	4,4.10 ⁴	1,8.10 ³

A utilização de formulações contendo melaço e vinhaça de soja como fontes de carbono apresentaram rendimentos inferiores ao meio controle, (em torno de 10^2 UFC.g de massa seca⁻¹ utilizando melaço, em torno de 10^3 UFC.g de massa seca⁻¹ utilizando vinhaça e $8,0 \cdot 10^3$ UFC.g de massa seca⁻¹ utilizando o meio controle). As concentrações das suspensões de esporos obtidas por FES (em torno de 10^3 UFC.ml⁻¹) são muito baixas comparadas com as suspensões obtidas em cultivo realizado em meio ágar (em torno de 10^7 UFC.ml⁻¹). Além disso, a baixa concentração obtida impossibilitou sua utilização no preparo de indicadores biológicos para avaliar sua resistência térmica.

Devido ao seu baixo rendimento, a técnica de FES não se mostrou adequada para a produção de esporos termorresistentes de *G. stearothermophilus* para sua utilização em indicadores biológicos. Porém, Sella (2008) obteve bons resultados para *B. atrophaeus* (cerca de 10^{10} UFC.g massa seca⁻¹), obtendo esporos com termorresistência adequada para indicadores biológicos para esterilização pelo calor seco. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os apresentados por Dlugokenski (2008), que também não obteve bons resultados para a esporulação de *G. stearothermophilus* pela técnica de FES utilizando casca de soja e bagaço de cana como suporte.

Segundo Gutiérrez-Correa e Villena (2003), o crescimento dos microrganismos pela técnica de FES não está associada ao baixo conteúdo de água, mas sim à adesão das células ao suporte sólido. Esta adesão depende das propriedades físicas do suporte como sua carga eletrostática e rugosidade (BIGERELLE *et al.*, 2002), e das características da célula: estruturas de adesão como flagelo, *pili* e *fimbriae*, hidrofobicidade e produção extracelular de polissacarídeos (SEALE *et al.*, 2007; PUREVDORJ *et al.*, 2002; DAVEY E O'TOOLE, 2000; O'TOOLE e KOLTER, 1998). Em bactérias esta capacidade de adesão está relacionada à expressão fenotípica de formação de biofilmes (DAVEY e O' TOOLE, 2000)

Elhariry (2008) demonstrou que o microrganismo *G. stearothermophilus* é um fraco formador de biofilme. Seale (2007) atribuiu este fenômeno às características hidrofílicas deste microrganismo, que dificultam sua adesão a diferentes superfícies. Portanto, o baixo rendimento de esporos deste microrganismo pela técnica de FES está associado à sua dificuldade de crescimento pela adesão em superfícies sólidas, por ser uma bactéria não formadora de biofilme.

Os resultados obtidos das esporulações em superfície de ágar 2% utilizando formulações contendo fontes nutricionais alternativas estão expressos no gráfico da Figura 6. As colunas representam as médias das contagens de esporos viáveis obtidas nos experimentos em duplicata.

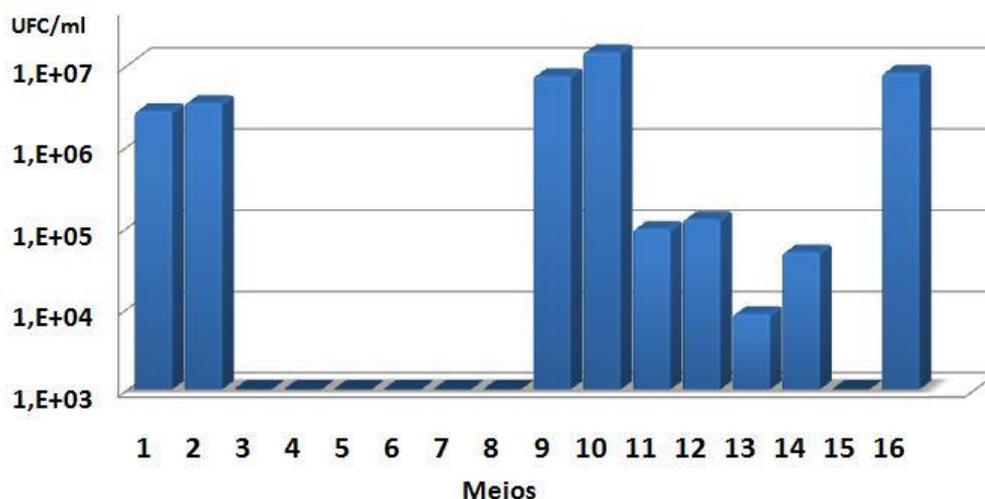


FIGURA 6 – PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *G. stearothermophilus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. (1) MELAÇO E TRIPTONA (2) MELAÇO, TRIPTONA E SAIS (3) MELAÇO E EXTRATO DE CARNE (4) MELAÇO, EXTRATO DE CARNE E SAIS (5) MELAÇO E PEPTONA (6) MELAÇO, PEPTONA E SAIS (7) MELAÇO 0,8% (8) MELAÇO 0,45% (9) VINHAÇA E EXTRATO DE LEVEDURA (10) VINHAÇA, EXTRATO DE LEVEDURA E SAIS (11) FARINHA (12) FARELO (13) FARINHA E MELAÇO (14) FARELO E MELAÇO (15) EXTRATO E MELAÇO (16) CONTROLE.

As formulações a base de: melaço de soja apenas, melaço de soja suplementado com extrato de carne ou peptona não proporcionaram a formação de esporos, mesmo com a adição de sais inorgânicos. Os meios a base de melaço de soja suplementado com triptona (1 e 2) e vinhaça de soja suplementado com extrato de levedura (9 e 10) apresentaram resultados satisfatórios (acima de $1,0 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹), sendo este último o que apresentou melhor resultado (10^7 UFC.ml⁻¹). Resultados inferiores foram obtidos nas formulações utilizando farinha ou farelo de soja como fonte de nitrogênio (entre 10^4 e 10^5 UFC.ml⁻¹), e o extrato de soja não proporcionou a formação de esporos.

Valores de $D_{121}^{\circ C}$ e U_{sk} das suspensões de esporos que apresentaram resultados satisfatórios para a produção de esporos estão apresentados no gráfico da Figura 7.

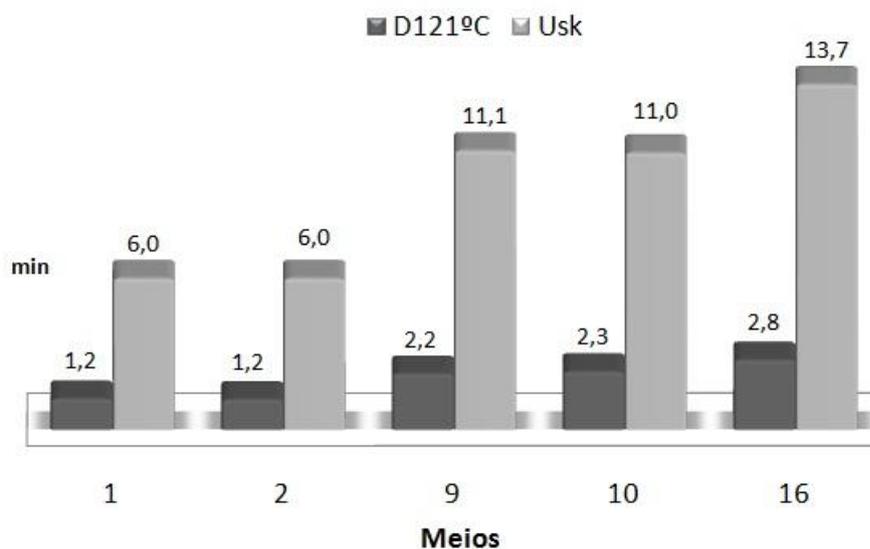


FIGURA 7 – RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS EM DIVERSOS MEIOS DE CULTURA. (1) MELAÇO E TRIPTONA (2) MELAÇO, TRIPTONA E SAIS (9) VINHAÇA E EXTRATO DE LEVEDURA (10) VINHAÇA, EXTRATO DE LEVEDURA E SAIS (16) CONTROLE.

As formulações que forneceram esporos com os melhores parâmetros de resistência térmica quando utilizados em IBs formulados com o meio a base de vinhaça de soja foram: vinhaça de soja suplementado com extrato de levedura com e sem a adição de sais, com valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 2,3 min e 2,2 min e valores de U_{sk} de 11 min e 11,1 min, respectivamente. Este novo indicador biológico desenvolvido utiliza sub-produtos da agroindústria na formulação do meio de esporulação e no meio de recuperação e atende os requisitos internacionais ($D_{121}^{\circ C}$ acima de 1,5 minutos e de U_{sk} entre 9 e 15 minutos).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que melaço e a vinhaça de soja suplementados com fontes de nitrogênio são fontes nutricionais adequadas para a esporulação de *G. stearothermophilus* em superfície de ágar, sendo a vinhaça a que forneceu melhor rendimento (10^7 UFC.ml⁻¹). Estes resultados são opostos aos encontrados por Sella (2008) para *Bacillus atrophaeus*, que obteve boa esporulação em meio contendo ágar 2% formulado apenas com melaço de soja como fonte de nutrientes (10^8 a 10^9 UFC.ml⁻¹), porém não obteve esporos em meio utilizando vinhaça de soja como fonte de carbono.

A vinhaça de soja pode estar favorecendo a rápida multiplicação e esporulação de *G. stearothermophilus* devido à sua composição em oligossacarídeos com ligações do tipo α -1,6 (principalmente estaquiose e rafinose), que possuem cadeia curta e podem ser hidrolisadas pela enzima α -galactosidase, a

qual já foi isolada deste microrganismo (FRIDJONSSON *et al.*, 1999), sendo uma fonte de carbono de fácil assimilação.

Melo (2006) relatou o uso de farelo, farinha e extrato de soja para a esporulação de *B. sphaericus*. Utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio, Valicente e Mourão (2008) alcançaram rendimentos de até 10^8 UFC.ml⁻¹ na esporulação de *Bacillus thuringiensis*, e Prabakaran *et al.* (2007) até 10^9 UFC.ml⁻¹ na esporulação de *B. sphaericus*. Porém neste trabalho, estes sub-produtos da soja não se mostraram adequados como fonte de nitrogênio na esporulação de *G. stearothermophilus*.

Assim como outros resultados já descritos na literatura, o extrato de levedura se mostrou uma excelente fonte de nitrogênio na esporulação de *Bacillus*, o que não é surpreendente já que é uma rica fonte de aminoácidos, vitaminas e outros fatores de crescimento (CHEN *et al.*, 2010; KIM E NAYLOR, 1966; LUNA *et al.*, 2002; PENNA *et al.*, 2003; SHI e ZHU, 2007).

Além dos meios de cultura quimicamente definidos e das fontes nutricionais industrializadas (como extrato de levedura, triptona e peptonas), não foram encontrados relatos de utilização de meios de cultura alternativos formulados com matérias primas de baixo custo ou sub-produtos e resíduos da indústria para a esporulação de *G. stearothermophilus*. Portanto, o meio desenvolvido neste trabalho utilizando vinhaça de soja na produção de esporos deste microrganismo é inédito e ainda não havia sido descrito na literatura.

5.4 CONCLUSÃO

Na produção de esporos termorresistentes de *G. stearothermophilus* para o uso em indicador biológico autocontido para esterilização a vapor, o meio 1 (SELLA, 1995) apresentou melhor desempenho, pois produziu esporos com a melhor resistência ao calor ($D_{121}^{\circ C}$ de 3,3 minutos e U_{sk} de 13,6 minutos) e apresentou rendimento satisfatório (10^7 UFC.ml⁻¹), com apenas um dia de incubação.

Neste estudo atingiu-se uma redução significativa no tempo de incubação de sete para três dias. Diante deste resultado, sugere-se a alteração do POP n° 14.00.04 do CPPI (Procedimento para a produção e padronização do concentrado de esporos de *Geobacillus stearothermophilus*), sendo que para a obtenção de uma

suspensão de esporos livre de células vegetativas recomenda-se três dias de incubação.

A técnica de fermentação em estado sólido, utilizando bagaço de cana, casca de soja ou polpa cítrica como suporte, não se mostrou adequada para a produção de esporos de *G. stearothermophilus* devido aos seus baixos rendimentos. O máximo resultado obtido foi de 10^6 UFC.g de massa seca⁻¹, rendendo suspensões com concentração em torno de 10^3 UFC.ml⁻¹, quantidade insuficiente para o preparo de indicadores biológicos.

Das fontes nutricionais alternativas utilizadas em cultivo em ágar, o meio de esporulação formulado com vinhaça de soja suplementado com extrato de levedura apresentou o melhor resultado com produção de esporos de 10^7 UFC.ml⁻¹. Quando utilizados no preparo de IB com meio de recuperação a base de vinhaça de soja, os esporos produzidos apresentam valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 2,3 min e U_{sk} de 11,0 min e 11,1 min, o que está dentro dos parâmetros preconizados pela USP 29 ($D_{121}^{\circ C}$ acima de 1,5 minutos e de U_{sk} entre 9 e 15 minutos). Com isso desenvolveu-se um IB formulado com sub-produtos da soja que atende os pré-requisitos de produção. Este resultado fornece uma alternativa inédita de produção de IB para esterilização a vapor com menor custo de matéria prima, visto que a vinhaça de soja é um resíduo da agroindústria da soja.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, H.; DAVIES, D.J.G.; WOODSON, L.P.; SOPER, C.J. Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore associated alpha-glucosidase enzyme. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 865-874, 1998.
- BIGERELLE, M.; ANSELME, K.; DUFRESNE, E.; HARDOUIN, P.; LOST, A. An unscaled parameter to measure the order of surfaces: a new surface elaboration to increase cells adhesion. **Biomolec. Engineering**, v. 19, p. 79-83, 2002
- BROWN, R. Microbial water stress. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n.4., p.803-846, 1976.
- CAMPBELL, L. L.; WILLIAMS, O. B. The effect of temperature on the nutritional requirements of facultative and obligate thermophilic bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 65, p. 141-145, 1953
- CARMELO, V.; FLORIDO, A.; VINHAS, I.; ROSEIRO, J.C. Physiological responses of *Bacillus stearothermophilus* continuous culture to carbon source concentration and temperature shifts. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 763-770, 2002.
- CHEN, Z-M.; LI, Q.; LIU, H-M.; YU, N.; XIE, T-J.; YANG, M-Y.; SHEN, P.; CHE, X-D. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n.5, p. 1353-1360, 2010.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 64, p. 847-867, 2000.
- ELHARIRY, H.H. Biofilm Formation by Endospore-forming *Bacilli* on Plastic Surface under Some Food-related and Environmental Stress Conditions **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, n.2, p.69-78, 2008.
- FRIDJONSSON, O.; WATZLAWICK, H.; GEHWEILER, A.; MATTES, R. Thermostable K-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621: cloning, sequencing and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, n. 1, p. 147-153, 1999.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n. 2-3, p. 85-101, 2003.
- GUTIÉRREZ-CORREA, M; VILLENA, G.K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n.2, p.113-124, 2003.
- GUZMAN, A.; FIELDS, M.L.; HUMBERT, R.D.; KAZANAS, N. Sporulation and heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores produced in chemically defined media. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n.2, p.775-776, 1972.

HODGGES, N.A.; MELLING, J.; PARKER, S.J. A comparison of chemically defined and complex media for the production of *Bacillus subtilis* spores having reproducible resistance and germination characteristics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 126-13, 1980.

HONEY, E.V.; SOPER C.J.; DAVIES D.J.G. Biological indicators for low temperature steam formaldehyde sterilization: effect of defined media on sporulation, germination index and moist heat resistance at 110°C of *Bacillus* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, n. 2, p. 207-214, 1985.

KIM, J.; NAYLOR, B. Spore production by *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 690-691, 1966.

LALLOO, R.; MAHARAJH, D.; GÖRGENS, J.; GARDINER, N.; GÖRGENS, J. F. High-density spore production of a *B. cereus* aquaculture biological agent by nutrient supplementation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n.1, p. 59-66, 2009.

LONG, S. K.; WILLIAMS, O. B. Factors affecting growth and spore formation of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 79, p. 625-628, 1959.

LUNA, C.L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 133–140, 2002.

MELO, A. L. de A. Elaboração e otimização de bioprocessos para a produção de *Bacillus sphaericus* meyer e neide (1904) visando o controle biológico de *Culex quinquefasciatus* say (1823). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. 64 p., 2006.

MIZUMOTO, S; SHODA, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2007

O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p.295–304, 1998.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.04- Procedimento para a Produção do Esteriteste**. Rev 02, 10p, Piraquara, 19/05/2003.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.02- Procedimento para a Produção e Padronização do Concentrado de Esporos do *Geobacillus stearothermophilus***. Rev 05, 16 p., Piraquara, 16/05/2005.

PENNA, T. C. V., MACHOSHVILI, I. A., ISHII, M. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 106, n. 1-3, p.287-294, 2003.

PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A.; TAQUEDA, M.E.S.; ISHII, M. The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 54, n. 5, p. 398-412, 2000.

PRABAKARAN, G.; BALARAMAN, K.; HOTI,S.L.; MANONMANI, A. M. A cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus sphaericus* H5a5b (VCRC B42) for mosquito control. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 379-383, 2007.

PUREVDORJ, B.; J. W. COSTERTON; P. STOODLEY. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4457-4464, 2002

ROWE, J. J.; GOLDBERG, I. D.; AMELUNXEN, R. E. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 1, p. 279-284, 1975.

SASAKI, K.; SHINTANI, H.; ITOH, J.; KAMOGAWA, T.; KAJIHARA, Y. Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC7953 spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.12, p. 5509-5513, 2000.

SEALE, R.B.; FLINT, S.H.; MCQUILLA, A.J. e BREMER, P.J. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.3, p.731-737, 2008.

SELLA, S. R. B. R. Produção e controle de qualidade de indicadores biológicos para esterilização a vapor. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 31-36, 1995.

SHI, F.Y.; ZHU, Y.B. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. **BioControl**, v. 52, p. 845–853, 2007.

THOMPSON, P. J.; THAMES, A. Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 975-979, 1967.

U.S.P. 29. Chapter 1035. Biological Indicators for Steam Sterilization. In: **The United States Pharmacopeia**. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, p. 2811 -2814, 2006.

VALICENTE, F. H.; MOURAO, A. H.C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p.702-708, 2008 .

WRIGTH, A. M.; HOXEY, E. V. ; SOPER, C. J.; DAVIES, D. J. G. Biological indicators for low temperature steam and formaldehyde sterilization: the effect of

defined media on sporulation, growth index and formaldehyde resistance of spores of *Bacillus stearothermophilus* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, n.4, p.432-438, 1995

YAZDANY, S.; LASHKARI, K. B. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v.30, n.1, p.1-3, 1975.

6 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE ESPORULAÇÃO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus*

6.1 INTRODUÇÃO

Diversos mecanismos são responsáveis pela resistência dos esporos de *Bacillus* ao calor, radiação e produtos químicos. A resistência ao calor úmido é influenciada pelo conteúdo de água do núcleo do esporo, que é muito menor do que no protoplasto de células em desenvolvimento. Um menor conteúdo de água geralmente resulta em maior resistência ao calor úmido. O nível e o tipo de íon mineral no núcleo do esporo e a estabilidade intrínseca do total de proteínas do esporo também possuem um papel importante na resistência ao calor, bem como a saturação do DNA com SASP protege o DNA contra danos pelo calor úmido. Esporos de espécies termófilas são invariavelmente mais resistentes ao calor úmido do que os mesófilos devido ao baixo conteúdo de água no núcleo e à maior termoestabilidade intrínseca de suas proteínas (SETLOW, 2007).

A mineralização do núcleo também é um fator importante na resistência ao calor úmido. Altos níveis de cátions divalentes quelados com DPA no núcleo contribuem para uma maior resistência, assim como a natureza destes íons. Esporos com altos níveis de íons cálcio são os mais resistentes, seguidos de esporos contendo manganês e magnésio, e aqueles que contêm íons potássio e sódio apresentam a menor resistência (BENDER e MARQUIS, 1985).

As condições em que a esporulação ocorre possuem grande influência sobre diferentes características dos esporos formados, inclusive sua resistência ao calor (AMAHA e ORDAL, 1957; CAZEMIER *et al.*, 2001; MELLY *et al.*, 2002, MINH *et al.*, 2008)

Merkel e Perry (1977) demonstraram que o substrato de cultivo possui influência na morte térmica de um microrganismo termofílico, provavelmente devido a mudança da composição de ácidos graxos da membrana celular.

Melly *et al.* (2002) demonstraram que esporos de *B. subtilis* formados em diferentes temperaturas apresentam uma pequena diferença na composição do córtex, porém a diferença foi significativa na composição protéica na capa dos

esporos. Também demonstraram que esporos formados em maiores temperaturas apresentaram maior resistência ao calor úmido. As proteínas da capa são sintetizadas pela célula mãe assim que se inicia a formação do septo na célula em processo de esporulação. A estrutura da capa protege o peptidoglicano do córtex de ataques exógenos e é extremamente importante na resistência dos esporos aos produtos químicos (TENNEN *et al.*, 2000; LOSHON *et al.*, 2001).

O conteúdo mineral dos esporos e a desidratação do protoplasto podem ser afetados pelo meio de esporulação. Cazemier *et al.* (2001) verificaram que esporos de *Bacillus* produzidos em ágar nutriente suplementado com diversos íons (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} e K^+) são mais termorresistentes e possuem menor conteúdo de água no protoplasto do que os produzidos em ágar nutriente suplementado apenas com Mn^{2+} . A desidratação do protoplasto é o principal componente que determina a resistência ao calor dos esporos (BENDER e MARQUIS, 1985). Para esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 7953, a resistência intrínseca, que é característica dos termófilos, contribui para a resistência associada com a mineralização e desidratação para render esporos muito resistentes (MARQUIS *et al.*, 1994).

Penna *et al.* (2003) avaliaram a interferência de oito componentes do meio de cultura no rendimento da esporulação e na resistência ao calor úmido a 121°C de *Geobacillus stearothermophilus* em suspensão de acetato de cálcio 0,02M e em suportes previamente tratados com acetato de cálcio. O efeito combinado de extrato de levedura, peptona e glicose contribuiu positivamente para o rendimento de esporos e para a estabilidade da resistência térmica dos esporos em suspensão e em suporte.

Estudos de otimização e avaliação de vários fatores realizados variando-se um fator por vez podem ser muito laboriosos e não levam em consideração possíveis interações entre as variáveis estudadas. O planejamento experimental baseado em técnicas estatísticas é uma boa ferramenta para este tipo de estudo e é cada vez mais utilizado, pois reduz o número de experimentos a ser realizado e demonstra se existe interação entre as variáveis estudadas.

Este capítulo visou avaliar o efeito das principais variáveis do processo de esporulação na resistência térmica dos esporos formados. O objetivo foi determinar qual(is) a(s) variável(is) crítica(s) nesta etapa do processo de produção de indicador biológico, que pode(m) afetar mais significativamente a resistência térmica dos esporos produzidos, influenciando a qualidade do produto final.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três delineamentos experimentais para *screening* e um para otimização das variáveis que influenciam na resistência térmica durante o processo de esporulação (concentração de nutrientes, sais inorgânicos, pH do meio e taxa de inoculação). Em todos os experimentos o inóculo foi produzido de acordo com descrito no item 3.2.2, variando-se apenas a taxa de inoculação. A esporulação foi realizada em garrafas de 200 ml contendo 60 ml de meio durante 7 dias a $57,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. O preparo da suspensão de esporos e a quantificação de esporos viáveis foram feitas de acordo com o descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4 respectivamente.

As suspensões de esporos produzidas em cada experimento foram utilizadas no preparo de indicadores biológicos (item 3.2.5) contendo 10^3UFC/IB , e submetidos ao teste de resistência térmica (item 3.2.6). Foram determinados os valores de $D_{121^{\circ}\text{C}}$ (tempo de redução decimal em 121°C) e do tempo médio de morte (U_{sk}) dos IBs produzidos com as suspensões de esporos a serem testadas, sendo que o primeiro foi o parâmetro utilizado para realização da análise estatística.

6.2.1 Estudo do efeito da composição do meio de produção sobre a resistência térmica dos esporos – Primeiro planejamento experimental Plackett-Burman

Para efetuar um *screening* das variáveis que possuem influência significativa sobre a resistência térmica dos esporos durante a sua produção, foi utilizado um planejamento experimental Plackett-Burman. Para este estudo selecionamos dez variáveis independentes e foi utilizada uma matriz de 16 ensaios (matriz não saturada). As variáveis estudadas foram: os componentes do meio de cultura (fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos), pH e taxa de inoculação, conforme demonstrado na Tabela 1 (variáveis e seus níveis) e na Tabela 2 (matriz dos experimentos).

As matrizes deste tipo de delineamento experimental não possuem ensaios nos pontos centrais. Entretanto, foram realizados ensaios nos pontos centrais para que a partir da observação da variabilidade das respostas, fosse possível identificar qualquer anomalia durante os experimentos. Além disso, estes ensaios possibilitam verificar se a escolha dos valores dos níveis das variáveis estudadas foi adequada.

TABELA 1 - VARIÁVEIS E SEUS NÍVEIS ESTUDADOS NO PRIMEIRO PLANEJAMENTO DO TIPO PLACKETT-BURMAN

Variáveis		Níveis		
		-1	0	+1
X1	Peptona (g/l)	2	5	8
X2	Tripona (g/l)	1	3	5
X3	Extrato de Carne (g/l)	1	3	5
X4	Extrato de Levedura (g/l)	2	5	8
X5	Sulfato de Manganês (g/l)	0	0,05	0,1
X6	Sulfato de Magnésio (g/l)	0	0,05	0,1
X7	Cloreto de Cálcio (g/l)	0	0,04	0,08
X8	Fosfato de Potássio (g/l)	0	0,05	0,1
X9	pH	6,5	7,5	8,5
X10	Taxa de Inoculação (%)	1	3	5

TABELA 2 – MATRIZ DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN DE 16 ENSAIOS PARA O ESTUDO DE DEZ VARIÁVEIS (MATRIZ NÃO SATURADA).

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	Vi1	Vi2	Vi3	Vi4	Vi5
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

6.2.2 Estudo da influência do nível variáveis significativas sobre a resistência térmica dos esporos durante sua produção– Segundo planejamento experimental Plackett-Burman

A partir dos resultados do primeiro delineamento experimental foi realizado um segundo delineamento experimental Plackett-Burman. As variáveis que não apresentaram influência estatisticamente significativa na primeira etapa foram retiradas do delineamento experimental ou estudadas em novas faixas de valores. Para o estudo de seis variáveis independentes utilizou-se uma matriz de 12 experimentos. Os níveis das variáveis estudadas e seus respectivos valores estão

demonstrados na Tabela 3, a matriz do delineamento Plackett-Burman de 12 experimentos está representada na Tabela 4.

TABELA 3 – VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT- BURMAN.

Variáveis		Níveis		
		-1	0	+1
X1	Extrato de Levedura (g/l)	0,5	1,25	2
X2	Peptona (g/l)	0,5	1,25	2
X3	Triptona (g/l)	0	0,5	1
X4	Extrato de Carne (g/l)	0,3	0,65	1
X5	Sulfato de Manganês (g/l)	0	0,025	0,05
X6	pH	7,0	7,75	8,5

TABELA 4- MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN DE 12 ENSAIOS PARA SEIS VARIÁVEIS (MATRIZ NÃO SATURADA)

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Vi1	Vi2	Vi3	Vi4	Vi5
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
PC1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

6.2.3 Estudo do efeito da composição do meio de produção sobre a esporulação e resistência térmica dos esporos - Terceiro planejamento experimental Plackett-Burman.

A partir dos resultados do segundo delineamento experimental verificou-se a necessidade de um novo delineamento incluindo a ausência de todos os componentes do meio de cultura na faixa de concentração estudada. Nesta etapa, além da resistência térmica dos esporos formados, foi analisada como variável resposta o rendimento da produção de esporos, para verificar quais fontes nutricionais possuem maior influência na produtividade. Foi utilizado novamente um planejamento experimental Plackett-Burman de doze ensaios para seis variáveis

independentes. As variáveis e os respectivos valores dos níveis estudados estão na Tabela 5.

TABELA 5 – VARIÁVEIS E VALORES DOS NÍVEIS ESTUDADOS NO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Variáveis		Níveis		
		-1	0	+1
X1	Peptona (g/l)	0	1	2
X2	Triptona (g/l)	0	0,5	1
X3	Extrato de Carne (g/l)	0	0,5	1
X4	Extrato de Levedura (g/l)	0	1	2
X5	Sulfato de Manganês (g/l)	0	0,002	0,004
X6	pH	8,0	8,5	9,0

6.2.4 Etapa de otimização das variáveis significativas – Planejamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR)

Para determinar as condições que maximizam a resistência térmica dos esporos durante sua produção, foi utilizado um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR), fatorial completo 2^2 (duas variáveis estudadas em dois níveis), incluindo 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios.

Com base nos resultados anteriores, a formulação do meio de cultura estabelecida foi: extrato de levedura, 2 g.l^{-1} ; extrato de carne, 1 g.l^{-1} ; taxa de inoculação, 1%. As variáveis independentes estudadas nesta etapa foram concentração de sulfato de manganês e pH. A matriz de experimentos está apresentada na Tabela 6, os valores reais dos níveis estudados se encontram na Tabela 7.

TABELA 6 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS DO DELINEAMENTO DCCR.

Ensaio	Níveis	
	(1) pH	(2) $[\text{MnSO}_4]$
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
PC1	0	0
PC2	0	0
PC3	0	0

TABELA 7– NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
(1) pH	7,5	7,8	8,5	9,2	9,5
(2) MnSO ₄ (g/l)	0	0,0015	0,005	0,0085	0,01

Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo de segunda ordem de acordo com a equação 1, que descreve a superfície de resposta obtida.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Onde y representa a variável resposta, b representa os coeficientes de regressão, e x os valores codificados para as variáveis independentes.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa de avaliação das variáveis que influenciam o processo de produção de esporos e resistência térmica, foi realizado um *screening* das variáveis independentes que possuem influência significativa na termorresistência dos esporos durante sua produção. A matriz dos experimentos com os valores reais se encontram na Tabela 8, os resultados dos experimentos do planejamento experimental se encontram na Tabela 9.

Os esporos produzidos nos experimentos 14 e 16 foram os que apresentaram maior resistência térmica, com valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 3,5 minutos e 3,4 minutos e valores de U_{sk} de 16,2 minutos e 15,9 minutos, respectivamente. Ambos não contêm manganês e fosfato de potássio em sua formulação e possuem a taxa de inoculação 1%. Os esporos produzidos nos experimentos 4 e 7 foram os que apresentaram menor resistência térmica, com valores de $D_{121}^{\circ C}$ de 1,3 minutos e valores de U_{sk} de 6,0 minutos e 6,1 minutos, respectivamente.

A Tabela 10 apresenta os valores dos efeitos de todas as variáveis, foi utilizado um intervalo de confiança de 90%, sendo então consideradas estatisticamente significativas as variáveis que apresentaram p-valor menor do que 0,1.

TABELA 8 – MATRIZ DOS EXPERIMENTOS DO PRIMEIRO DELINEAMENTO COM VALORES REAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.

Ensaio	Peptona (g.l ⁻¹)	Triptona (g.l ⁻¹)	Ext. de Carne (g.l ⁻¹)	Ext. de Levedura (g.l ⁻¹)	MnSO ₄ (g.l ⁻¹)	MgSO ₄ (g.l ⁻¹)	CaCl ₂ (g.l ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g.l ⁻¹)	pH	Taxa de Inoculação (% v/v)
1	8	1	1	2	0,1	0	0	0,1	8,5	1
2	8	5	1	2	0	0,1	0	0	8,5	5
3	8	5	5	2	0	0	0,08	0	6,5	5
4	8	5	5	8	0	0	0	0,1	6,5	1
5	2	5	5	8	0,1	0	0	0	8,5	1
6	8	1	5	8	0,1	0,1	0	0	6,5	5
7	2	5	1	8	0,1	0,1	0,08	0	6,5	1
8	8	1	5	2	0,1	0,1	0,08	0,1	6,5	1
9	8	5	1	8	0	0,1	0,08	0,1	8,5	1
10	2	5	5	2	0,1	0	0,08	0,1	8,5	5
11	2	1	5	8	0	0,1	0	0,1	8,5	5
12	8	1	1	8	0,1	0	0,08	0	8,5	5
13	2	5	1	2	0,1	0,1	0	0,1	6,5	5
14	2	1	5	8	0	0,1	0,08	0	8,5	1
15	2	1	1	8	0	0	0,08	0,1	6,5	5
16	2	1	1	2	0	0	0	0	6,5	1

TABELA 9 – RESULTADOS DO PRIMEIRO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN E PONTOS CENTRAIS.

Ensaio	Esporos produzidos (UFC/ml)	D ₁₂₁ ⁰ _c (min)	U _{sk} (min)
1	3,5.10 ⁶	1,9 ± 0,3	8,7 ± 0,8
2	3,5.10 ⁶	2,9 ± 0,2	13,5 ± 1,2
3	3,0.10 ⁶	1,84 ± 0,1	8,5 ± 0,5
4	1,9.10 ⁷	1,3 ± 0,003	6,0 ± 0,01
5	6,8.10 ⁶	1,8 ± 0,2	8,6 ± 0,8
6	1,0.10 ⁷	1,4 ± 0,1	6,0 ± 0,5
7	2,5.10 ⁷	1,3 ± 0,2	6,1 ± 0,8
8	1,8.10 ⁷	2,3 ± 0,1	10,8 ± 0,7
9	7,9.10 ⁶	2,4 ± 0,2	11,0 ± 1,1
10	2,8.10 ⁶	2,9 ± 0,2	13,4 ± 0,9
11	6,6.10 ⁶	1,9 ± 0,2	13,5 ± 0,9
12	8,0.10 ⁶	1,9 ± 0,2	8,7 ± 0,8
13	6,4.10 ⁶	1,9 ± 0,1	8,5 ± 0,7
14	1,3.10 ⁷	3,5 ± 0,1	16,2 ± 0,5
15	1,3.10 ⁶	2,3 ± 0,2	10,8 ± 0,9
16	1,1.10 ⁷	3,4 ± 0,2	15,9 ± 1,2
PC1	1,2.10 ⁷	2,3 ± 0,2	13,4 ± 0,9
PC2	1,0.10 ⁷	2,4 ± 0,04	11,1 ± 0,2

TABELA 10 – PRIMEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PB DE 16 ENSAIOS: EFEITOS ESTIMADOS A 90% DE CONFIANÇA.

	Efeito	Erro padrão	t (7)	p-valor
Média	2,290103	0,103406	22,14675	0,000000
(1) Peptona	-0,514769	0,219578	-2,34435	0,051514
(2) Triptona	-0,395231	0,219578	-1,79995	0,114892
(3) Ext. de Carne	0,002269	0,219578	0,01033	0,992044
(4) Ext. de Levedura	-0,639769	0,219578	-2,91363	0,022544
(5) MnSO ₄	-0,652269	0,219578	-2,97055	0,020791
(6) MgSO ₄	0,174769	0,219578	0,79593	0,452215
(7) CaCl ₂	0,130231	0,219578	0,59310	0,571773
(8) KH ₂ PO ₄	-0,001848	0,236625	-0,00781	0,993986
(9) pH	0,575231	0,219578	2,61971	0,034424
(10) Taxa de Inoculação	0,017731	0,219578	0,08075	0,937901

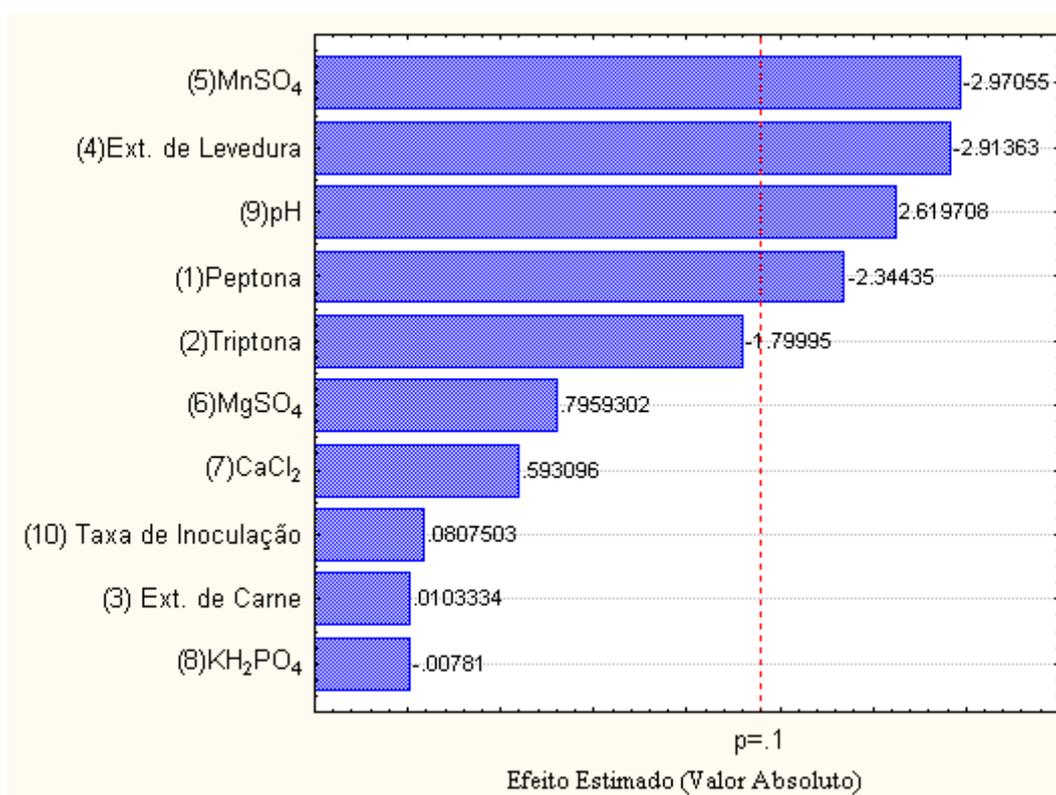


FIGURA 1- GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DO PRIMEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A 90% DE CONFIANÇA.

Nas condições estudadas, a peptona, o extrato de levedura, o sulfato de manganês e o pH apresentaram efeitos estatisticamente significativos. A adição de peptona e extrato de levedura em até 8 g.l⁻¹ no meio de esporulação influenciaram negativamente a resistência ao calor dos esporos produzidos, indicando que para a obtenção de esporos mais termorresistentes suas concentrações no meio devem ser diminuídas. Quando elevado de 6,5 para 8,5, o pH do meio apresentou um efeito

positivo na resistência térmica dos esporos. A adição de MnSO_4 na concentração de $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ influenciou negativamente a resistência térmica, e a adição de MgSO_4 , CaCl_2 , KH_2PO_4 nas concentrações de $0,1 \text{ g.l}^{-1}$, $0,08 \text{ g.l}^{-1}$ e $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ respectivamente, não apresentaram influência estatisticamente significativa, o que não era esperado. Sua adição no meio de cultura tem por finalidade fornecer cátions que seriam absorvidos pelo esporo durante a sua formação, conferindo-lhe maior resistência. Frente a este resultado, os sais MgSO_4 , CaCl_2 e KH_2PO_4 foram retirados da formulação do meio na próxima etapa, e para o MnSO_4 , sua adição foi estudada em uma concentração inferior.

Como o aumento da concentração de extrato de levedura e peptona no meio de esporulação causou uma redução na resistência ao calor úmido dos esporos formados, foi necessário estudar intervalos menores de concentrações destes nutrientes na próxima etapa. Por não apresentarem resultado estatisticamente significativo a 90% de confiança nas concentrações estudadas, optou-se por verificar no próximo delineamento concentrações menores de extrato de carne e triptona. Optou-se também por verificar a ausência de triptona na formulação, devido sua influência na resistência térmica ter se mostrado negativa (apesar de não significativa). O aumento da taxa de inoculação não influenciou o resultado na faixa estudada, portanto para os próximos experimentos foi mantido no mínimo (1%).

Os resultados do segundo delineamento do tipo Plackett-Burnman estão na Tabela 11. A formulação que forneceu maior produção de esporos foi o experimento 7 ($1,3 \cdot 10^7 \text{ UFC.ml}^{-1}$), cuja composição foi extrato de levedura, $0,5 \text{ g.l}^{-1}$; peptona, 2 g.l^{-1} ; triptona, 1 g.l^{-1} ; extrato de carne, 1 g.l^{-1} ; pH 8,5. Os demais experimentos apresentaram produção de esporos em torno de 10^6 UFC.ml^{-1} .

Os experimentos que produziram esporos mais termorresistentes foram o 7 e 11, com valores de com valores de $D_{121}^{\circ\text{C}}$ de 5,1 minutos e 5 minutos, e valores de U_{sk} de 17,8 minutos e 18,2 minutos, respectivamente. Em seguida, os experimentos 4 e 6 foram os que produziram esporos mais termorresistentes, com valores de $D_{121}^{\circ\text{C}}$ de 4,3 minutos, e valores de U_{sk} de 15,9 minutos e 15,8 minutos, respectivamente. Os quatro experimentos citados apresentaram ausência de manganês em sua formulação e pH 8,5.

TABELA 11 – RESULTADOS DO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Ensaio	Ext. de Levedura (g.l ⁻¹)	Peptona (g.l ⁻¹)	Triptona (g.l ⁻¹)	Ext. de Carne (g.l ⁻¹)	MnSO ₄ (g.l ⁻¹)	pH	Esporos Produzidos (UFC.ml ⁻¹)	D ₁₂₁ ⁰ _C (min)	U _{sk} (min)
1	2	0,5	1	0,3	0	7,0	4,7.10 ⁶	2,1 ± 0,1	8,6 ± 0,8
2	2	2	0	1	0	7,0	2,7.10 ⁶	2,6±0,3	11 ± 1,0
3	0,5	2	1	0,3	0,05	7,0	5,4.10 ⁶	2,4±0,2	8,6 ± 0,8
4	2	0,5	1	1	0	8,5	7,8.10 ⁶	4,3 ± 0,1	15,9 ± 0,5
5	2	2	0	1	0,05	7,0	2,3.10 ⁶	2,5 ± 0,2	11 ± 0,7
6	2	2	1	0,3	0,05	8,5	3,5.10 ⁶	4,3 ± 0,4	15,8 ± 1,3
7	0,5	2	1	1	0	8,5	1,3.10 ⁷	5,1± 0,4	17,8 ± 1,3
8	0,5	0,5	1	1	0,05	7,0	4,3.10 ⁶	3,0 ± 0,3	10,9 ± 1,1
9	0,5	0,5	0	1	0,05	8,5	1,4.10 ⁶	2,8 ± 0,1	11,0 ± 0,5
10	2	0,5	0	0,3	0,05	8,5	4,9.10 ⁶	2,1 ± 0,1	8,8 ± 0,8
11	0,5	2	0	0,3	0	8,5	2,8.10 ⁶	5,0 ± 0,2	18,2 ± 0,5
12	0,5	0,5	0	0,3	0	7,0	5,8.10 ⁶	3,6± 0,3	13,3 ± 1,2
PC1	1,25	1,25	0,5	0,65	0,025	7,7	3,0.10 ⁶	2,7 ± 0,2	11,1 ± 0,8
PC2	1,25	1,25	0,5	0,65	0,025	7,7	6,5.10 ⁶	2,9 ± 0,2	11,0 ± 0,9
PC3	1,25	1,25	0,5	0,65	0,025	7,7	3,7.10 ⁶	2,7 ± 0,2	10,8 ± 0,8

No primeiro delineamento experimental Plackett-Burman os valores de D₁₂₁⁰_C obtidos foram de 1,3 minutos a 3,5 minutos, e no segundo delineamento os valores oscilaram entre 2,1 minutos a 5,1 minutos, havendo claramente um aumento da resistência térmica dos esporos produzidos trabalhando-se as variáveis em novas faixas de concentração. Para o segundo delineamento experimental, as concentrações máximas de peptona e extrato de levedura foram reduzidas de 8 g.l⁻¹ para 2 g.l⁻¹, a de extrato de carne e triptona de 5 g.l⁻¹ para 1 g.l⁻¹, a concentração de MnSO₄ reduzida de 0,1 para 0,05, os sais MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄ retirados da formulação e o pH mantido em 8,5.

A Tabela 12 apresenta os efeitos a 90% de confiança e o p-valor das variáveis independentes.

Como podemos observar no diagrama de Pareto (Figura 2), as concentrações reduzidas de peptona, extrato de levedura e extrato de carne não apresentaram influência estatisticamente significativa, assim como a adição de triptona, visto que foi estudada também sua ausência na formulação.

TABELA 12- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A 90% DE CONFIANÇA.

	Efeitos	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Média	3,207333	0,177151	18,10505	0,000000
(1)Ext. de Levedura	-0,648333	0,396122	-1,63670	0,140330
(2)Peptona	0,688333	0,396122	1,73768	0,120469
(3)Triptona	0,431667	0,396122	1,08973	0,307565
(4)Ext. de Carne	0,105000	0,396122	0,26507	0,797658
(5)MnSO ₄	-0,915000	0,396122	-2,30989	0,049697
(6)pH	1,218333	0,396122	3,07565	0,015217

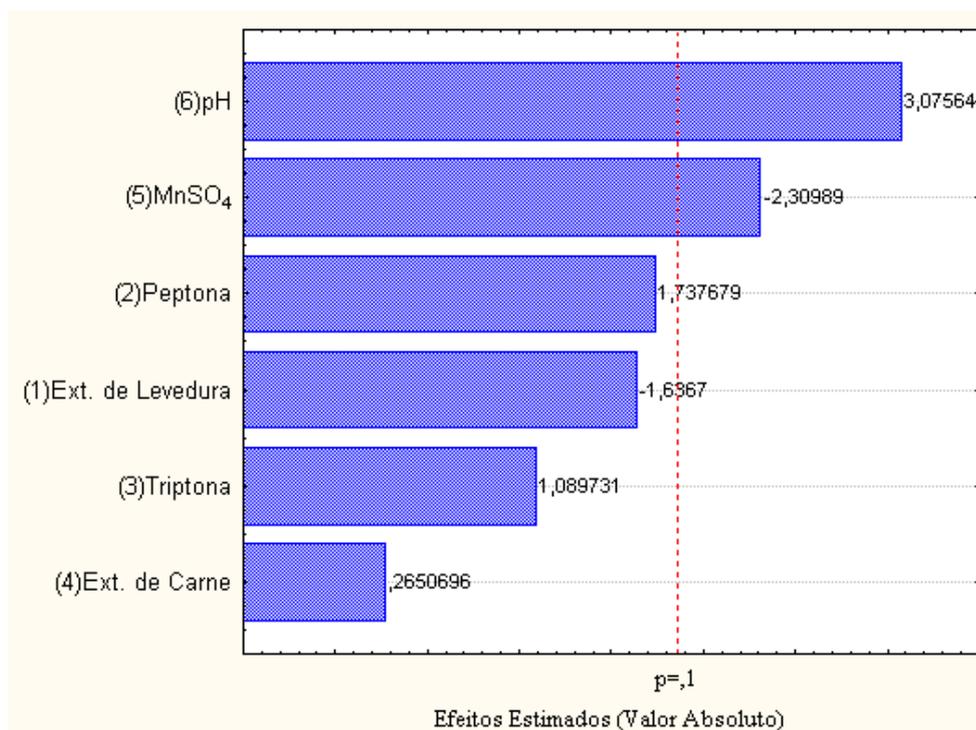


FIGURA 2 – DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO SEGUNDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL A 90% DE CONFIANÇA.

Mesmo com as novas formulações dos meios de cultura (apresentando menores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio e sem adição de alguns sais inorgânicos), o aumento do pH para 8,5 continuou influenciando positivamente a resistência ao calor úmido dos esporos durante a sua produção. A adição de MgSO₄ continuou influenciando negativamente a resistência térmica dos esporos produzidos, mesmo tendo sido adicionado na metade da concentração do experimento anterior (concentração reduzida de 0,1 g.l⁻¹ a 0,05g.l⁻¹). Fez-se necessário diminuir ainda mais sua concentração na próxima etapa.

Diante dos resultados anteriores, optou-se por um terceiro delineamento experimental testando a ausência de todas as fontes de carbono e nitrogênio e sulfato de manganês, na tentativa de avaliar quais os nutrientes indispensáveis para

a produção de esporos termorresistentes. Nesta etapa foram avaliados os efeitos da formulação do meio de cultura (concentrações de fontes de carbono e nitrogênio, pH e concentração de sulfato de manganês) sobre duas variáveis resposta, a resistência térmica e a produção de esporos. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13- RESULTADOS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Ensaio	Peptona (g.l ⁻¹)	Triptona (g.l ⁻¹)	Ext. De Carne (g.l ⁻¹)	Ext. de Levedura (g.l ⁻¹)	MnSO ₄ (g.l ⁻¹)	pH	Esporos Produzidos (UFC.ml ⁻¹)	D _{121°c} (min)	U _{sk} (min)
1	2	0	1	0	0	8	6,9.10 ⁶	4,5 ± 0,2	18,6 ± 1,0
2	2	1	0	2	0	8	9,7.10 ⁶	4,7 ± 0,3	20,7 ± 1,2
3	0	1	1	0	0,004	8	6,3.10 ⁶	3,9 ± 0,2	16,1 ± 0,8
4	2	0	1	2	0	9	9,4.10 ⁶	3,2 ± 0,2	13,6 ± 1,0
5	2	1	0	2	0,004	8	9,7.10 ⁶	4,5 ± 0,2	18,4 ± 1,0
6	2	1	1	0	0,004	9	4,1.10 ⁶	3,2 ± 0,2	13,6 ± 1,0
7	0	1	1	2	0	9	1,2.10 ⁷	4,4 ± 0,2	16,0 ± 0,9
8	0	0	1	2	0,004	8	9,9.10 ⁶	5,2 ± 0,3	20,7 ± 1,1
9	0	0	0	2	0,004	9	7,4.10 ⁶	5,3 ± 0,2	20,9 ± 1,0
10	2	0	0	0	0,004	9	4,3.10 ⁶	3,6 ± 0,2	13,7 ± 0,7
11	0	1	0	0	0	9	4,2.10 ⁶	5,4 ± 0,3	20,9 ± 1,2
12	0	0	0	0	0	8	2,2.10 ⁶	3,5 ± 0,2	13,6 ± 0,9
PC1	1	0,5	0,5	1	0,002	8,5	5,4.10 ⁶	4,2 ± 0,3	18,3 ± 1,1
PC2	1	0,5	0,5	1	0,002	8,5	5,7.10 ⁶	3,8 ± 0,2	16,1 ± 0,8
PC3	1	0,5	0,5	1	0,002	8,5	3,9.10 ⁶	4,4 ± 0,3	18,5 ± 1,1

O experimento 7 foi o que apresentou maior produção de esporos (1,2.10⁷ UFC.ml⁻¹), cuja formulação do meio foi triptona, 1g.l⁻¹; extrato de carne, 1 g.l⁻¹; extrato de levedura 2 g.l⁻¹; pH 9,0. Os demais experimentos apresentaram resultados em torno de 10⁶ UFC.ml⁻¹.

É interessante ressaltar que no experimento 12, utilizando apenas água destilada e ágar (ajustados a pH 8), sem nenhuma fonte de nutrientes, ocorreu a formação de esporos, e estes apresentaram valores de D_{121°c} de 3,5 minutos e U_{sk} de 13,6 minutos, com parâmetros de resistência térmica aceitáveis para sua

utilização em indicador biológico para esterilização a vapor ($D_{121}^{\circ C}$ acima de 1,5 minutos e de U_{sk} entre 9 e 15 minutos). Isso mostra que a formação de esporos pode ocorrer na ausência de nutrientes, apesar da produção mais baixa ($2,2 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹).

A Tabela 14 e a Figura 3 mostram os efeitos das variáveis no rendimento da produção de esporos.

TABELA 14- EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT-BURMAN A 90% DE CONFIANÇA PARA O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS.

	Efeitos	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Média	6632667	493157	13,44941	0,000001
(1)Peptona	630000	1102732	0,57131	0,583480
(2)Triptona	1363333	1102732	1,23632	0,251403
(3)Ext. de Carne	2230000	1102732	2,02225	0,077787
(4)Ext. de Levedura	5396667	1102732	4,89391	0,001203
(5)MnSO ₄	-170000	1102732	-0,15416	0,881300
(6)pH	-170000	1102732	-0,15416	0,881300

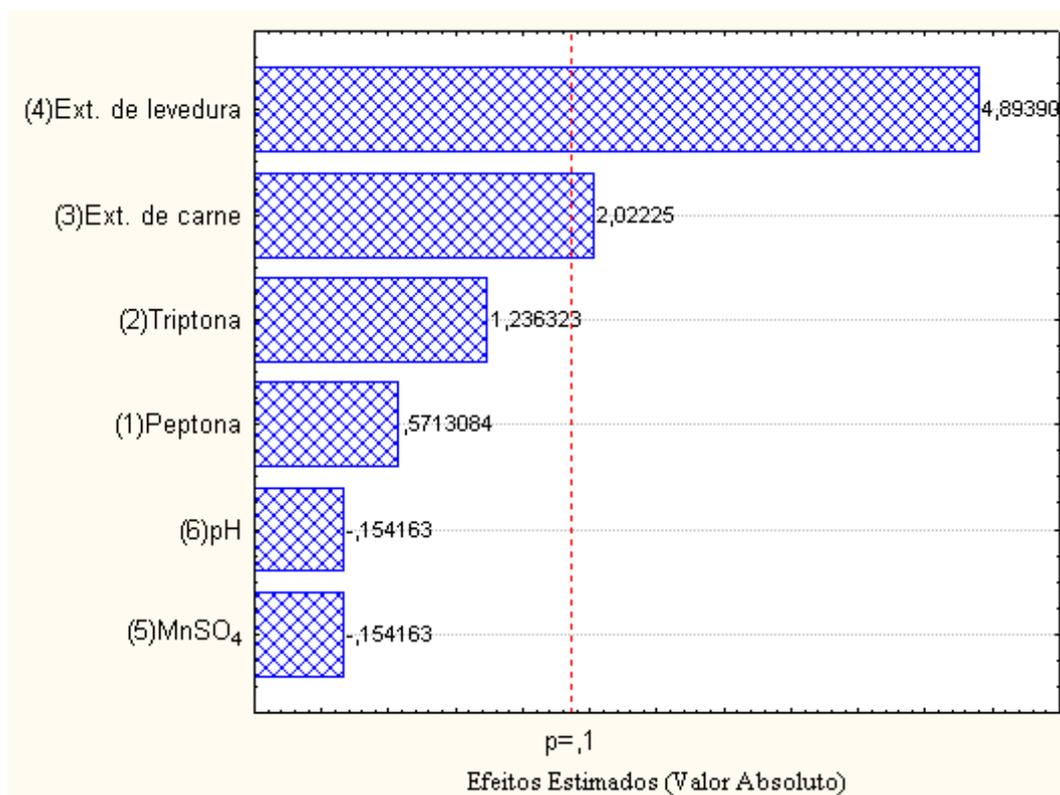


FIGURA 3 – DIAGRAMA DE PARETO PARA O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN.

Para a produção de esporos as variáveis estatisticamente significativas a 90% de confiança foram o extrato de levedura e extrato de carne (apresentaram p-valor

menor do que 0,1), ambas apresentando efeito positivo. A adição de peptona na concentração de 2 g.l⁻¹, de triptona na concentração de 1 g.l⁻¹ e de sulfato de manganês na concentração de 0,004 g.l⁻¹ não apresentaram influência estatisticamente significativa na produção de esporos, portanto pode-se concluir que dentro da formulação estudada, estas fontes nutricionais não são indispensáveis na formação de esporos. Com base neste resultado, para a próxima etapa a formulação do meio de cultura teve suas fontes de nutrientes fixadas nas seguintes concentrações: extrato de levedura, 2 g.l⁻¹ e extrato de carne, 1g.l⁻¹, e a taxa de inoculação continuou 1% como nos experimentos anteriores. O aumento do pH de 8,0 para 9,0 também não apresentou influência estatisticamente significativa na produção de esporos.

Os efeitos estimados das variáveis sobre a resistência térmica dos esporos produzidos estão apresentados na Tabela 15 e Figura 4.

TABELA 15 - EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT-BURMAN A 90% DE CONFIANÇA PARA A RESISTÊNCIA TÉRMICA.

	Efeitos	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Média	4,298000	0,203169	21,15479	0,000000
(1)Peptona	-0,761667	0,454300	-1,67657	0,132151
(2)Triptona	0,045000	0,454300	0,09905	0,923533
(3)Ext. de Carne	-0,478333	0,454300	-1,05290	0,323146
(4)Ext. de Levedura	0,631667	0,454300	1,39042	0,201861
(5)MnSO ₄	0,088333	0,454300	0,19444	0,850680
(6)pH	-0,128333	0,454300	-0,28249	0,784742

Nas faixas estudadas nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa na resistência térmica dos esporos durante a sua produção. O sulfato de manganês quando adicionado até 0,004 g.l⁻¹ não influenciou negativamente a resistência térmica, mas também não foi estatisticamente significativa nesta etapa. O pH quando elevado de 7,0 a 8,5 favorece a formação de esporos termorresistentes, mas quando ajustado a 9,0 não apresentou influência estatisticamente significativa.

Os resultados do planejamento experimental do tipo DCCR estão apresentados na Tabela 16

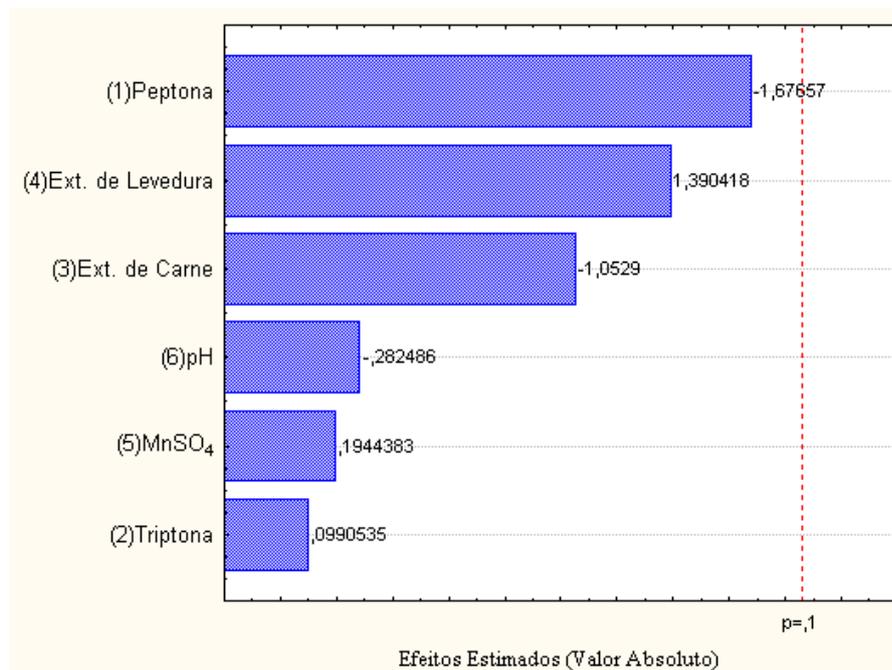


FIGURA 4 – DIAGRAMA DE PARETO PARA A RESISTÊNCIA TÉRMICA DO TERCEIRO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN.

TABELA 16 – RESULTADO DOS ENSAIOS DO DELINEAMENTO DCCR.

Ensaio	pH	MnSO ₄ (g/l)	Esporos Viáveis (UFC/ml)	D ₁₂₁ ⁰ C (min)	U _{sk} (min)
1	7,5	0,0015	6,8.10 ⁶	4,7	21,0
2	7,5	0,0085	3,8.10 ⁶	4,0	18,5
3	9,2	0,0015	4,0.10 ⁶	4,1	15,9
4	9,2	0,0085	5,9.10 ⁶	4,6	20,9
5	7,5	0,005	7,9.10 ⁶	4,1	18,5
6	9,5	0,005	5,1.10 ⁶	3,4	13,2
7	8,5	0	7,3.10 ⁶	4,2	15,8
8	8,5	0,01	3,8.10 ⁶	3,6	13,5
PC1	8,5	0,005	2,4.10 ⁶	5,3	20,9
PC2	8,5	0,005	4,6.10 ⁶	5,4	21,0
PC3	8,5	0,005	1,1.10 ⁶	5,3	21,0

Todos os experimentos apresentaram produção de esporos em torno de 10⁶ UFC.ml⁻¹, sendo que o que apresentou maior produção foi o experimento 5, cuja formulação foi a estabelecida anteriormente (extrato de levedura, 2 g.l⁻¹ e extrato de carne, 1g.l⁻¹), a concentração de sulfato de manganês foi de 0,005 g.l⁻¹, e o pH 7,5. Mesmo com esta grande redução de concentração de nutrientes no meio de cultura, quando comparada com as formulações do primeiro delineamento, e retirada de alguns sais inorgânicos da formulação, a produção de esporos não foi inferior a 10⁶ UFC.ml⁻¹ (exceto no experimento 12 do terceiro delineamento, onde houve ausência de todos os nutrientes). Isso mostra que para se produzir esporos em meio

geleificado com ágar, não são necessárias grandes concentrações de nutrientes no meio de cultura, logo, este não é um parâmetro crítico para a esporulação.

Os pontos centrais (pH 8,5 e $0,005 \text{ g.l}^{-1}$ de sulfato de manganês) forneceram os esporos mais termorresistentes, com valores de $D_{121^\circ\text{C}}$ em torno de 5,3 minutos, e U_{sk} em torno de 21 minutos, sendo também os mais termorresistentes obtidos neste trabalho. Os esporos com menor termorresistência foram obtidos no experimento 6, a formulação com o maior pH (9,5), cujo valor de $D_{121^\circ\text{C}}$ dos esporos produzidos foi de 3,4 minutos e de U_{sk} foi de 13,2 minutos.

Podemos observar que com os três planejamentos experimentais Plackett-Burman e a etapa de otimização, atingiu-se um aumento significativo na resistência dos esporos produzidos. Comparando com os resultados obtidos no primeiro delineamento, cujos valores de $D_{121^\circ\text{C}}$ variaram de 1,3 minutos a 3,5 minutos, os esporos obtidos nesta etapa de otimização são visivelmente mais resistentes ao calor, com valores de $D_{121^\circ\text{C}}$ entre 3,4 minutos e 5,3 minutos.

A Figura 5 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a resistência térmica dos esporos a 90% de confiança.

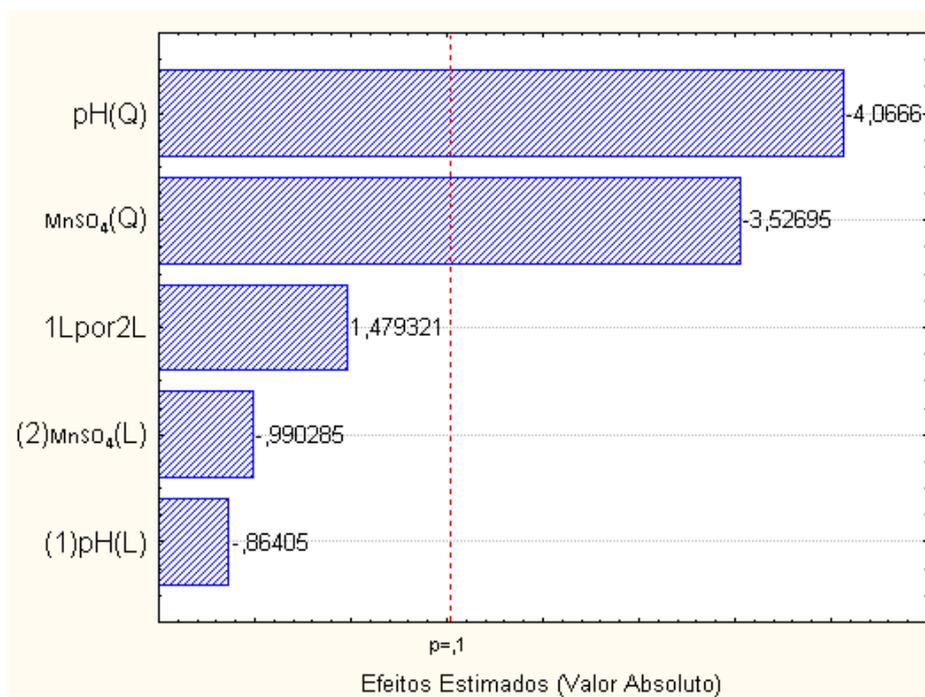


FIGURA 5 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS ESTIMADOS PARA A OTIMIZAÇÃO A 90% DE CONFIANÇA.

Nas faixas estudadas a concentração de sulfato de manganês (desde a sua ausência até a adição de $0,01 \text{ g.l}^{-1}$) e o pH (de 7,5 a 9,5) quadráticos apresentaram efeitos negativos estatisticamente significativos no processo em um intervalo de 90% de confiança. Analisando juntamente aos resultados anteriores (três planejamentos experimentais Plackett-Burman) é possível concluir que o pH inicial do meio de esporulação até 8,5 influencia positivamente na resistência térmica dos esporos formados, quando aumentado de 8,5 para 9,0, não possui influência estatisticamente significativa, e quando ajustado para 9,5 influencia negativamente. A superfície de resposta traçada a partir dos dados experimentais do planejamento experimental DCCR se encontra na Figura 6.

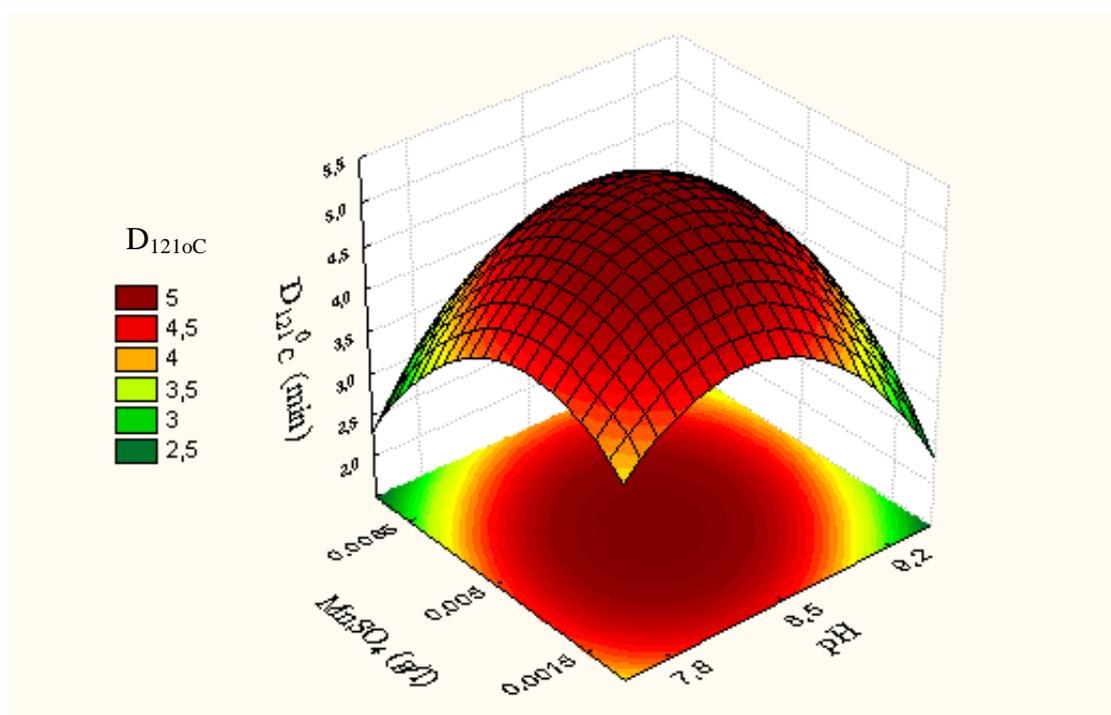


FIGURA 6– SUPERFÍCIE DE RESPOSTA – OTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A RESISTÊNCIA TÉRMICA.

Na superfície de resposta podemos observar dois pontos onde os menores valores do tempo de redução decimal podem ser obtidos ($D_{121}^{\circ\text{C}}$ de 2,5 minutos a 3 minutos): nos meios de cultura com as concentrações mais altas de sulfato de manganês (de $0,0085 \text{ g.l}^{-1}$ a $0,01 \text{ g.l}^{-1}$) e menores valores de pH (de 7,5 a 7,8); nos meios de cultura com menores concentrações de sulfato de manganês (de zero a $0,0015 \text{ g.l}^{-1}$) e maiores valores de pH (9,2 a 9,5). Em geral, as extremidades do gráfico, representadas pelos valores máximos e mínimos de ambas as variáveis, apresentam os menores valores de resistência térmica. As formulações que

maximizam a termorresistência dos esporos produzidos se encontram na região central, com pH 8,5 e sulfato de manganês $0,005 \text{ g.l}^{-1}$, e os valores de $D_{121}^{\circ\text{C}}$ obtidos estão em torno de 5 minutos.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função de resposta com os dados experimentais. O modelo obtido que descreve a superfície de resposta está representado na equação 2, onde x_1 representa os valores codificados do pH e x_2 da concentração de sulfato de manganês. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi de 0,84, o que significa que este explica 84% da variabilidade dos resultados.

$$y = 5,3 + 0,11770815280171 * x_1 - 0,659375 * x_1^2 - 0,13490485194281 * x_2 + 0,571875 * x_2^2 - 0,285 * x_1x_2 \quad (2)$$

A composição do meio de esporulação demonstrou exercer grande influência na resistência dos esporos de *G. stearothermophilus*, como já foi demonstrado em outros estudos (PENNA *et al.*, 2000; PENNA *et al.*, 2003). Os resultados dos três primeiros delineamentos mostram que quanto menor a concentração de nutrientes no meio de esporulação, maior a resistência ao calor úmido dos esporos formados. Diminuindo as concentrações de extrato de levedura e peptona no meio foi possível obter esporos mais termorresistentes. Porém, resultados opostos foram encontrados por Penna *et al.* (2000), trabalho no qual o aumento das concentrações de extrato de levedura e peptona no meio de esporulação contribuiu para o aumento da termorresistência de esporos de *G. stearothermophilus*. Estes resultados opostos pode ser devido à utilização de diferentes formulações dos meios de cultura, Penna *et al.* (2000) utilizou uma formulação contendo glucose, ácido glutâmico, extrato de levedura, peptona, cloreto de sódio, sulfato de manganês, fosfato de amônio, fosfato de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de manganês e sulfato ferroso, a qual é distinta do presente trabalho. Isso mostra que, determinados componentes do meio podem apresentar diferentes efeitos na termorresistência do microrganismo dentro de diferentes formulações, reforçando a importância de metodologia estatística que avalie a interação entre as variáveis neste tipo de estudo.

Foram obtidos valores de $D_{121}^{\circ\text{C}}$ entre 1,3 minutos e 5,4 minutos. O menor valor foi obtido em um experimento utilizando as concentrações máximas de

nutrientes, a ausência de sais inorgânicos (exceto de fosfato de potássio) e baixo pH (6,5). O valor máximo foi obtido em um meio pobre em nutrientes e pH alcalino. O maior valor obtido neste trabalho é superior a outros valores encontrados na literatura utilizando meios complexos industrializados. Penna *et al.* (2003), variando todos os componentes do meio de esporulação, alcançou um valor máximo de 2,86 minutos para *G. stearothermophilus* em suspensão, e de 3,46 minutos para esporos preparados em suporte de papel. Feeherry *et al.* (1987) reportou um valor máximo de 3,33 minutos para esporos de *G. stearothermophilus* produzidos em meio complexo e ativados termicamente (a 100°C durante 15 minutos). Smith *et al.* (1982) obtiveram valores de 1,85 a 4,51 minutos para esporos fornecidos comercialmente, utilizando o método da fração negativa e TSB adicionado de púrpura de bromocresol como meio de aquecimento e recuperação.

Neste trabalho, esporulações realizadas em pHs mais alcalinos, até 8,5, forneceram esporos mais termorresistentes do que em pHs ácidos. O efeito do pH durante a esporulação na resistência térmica de esporos bacterianos é controverso. Friedsen e Anderson (1974) (citado por MAZAS *et al.*, 1997) não encontraram diferenças no valor de D de esporos de *G. stearothermophilus* produzidos em meios com pH inicial 5,0 e 6,5. Porém, esta variação é muito pequena para determinar a influência do pH na resistência ao calor destes esporos. E assim como Yazdany e Lashkari (1975), também verificaram que apesar da variação do pH inicial do meio, no momento da esporulação o pH era o mesmo (em torno de 6,3-7,0).

Yazdany e Lashkari (1975) verificaram o efeito do pH sobre a esporulação de duas linhagens de *G. stearothermophilus*. A percentagem de esporulação foi máxima com o pH inicial do meio entre 7,0 e 8,7. Porém, estes autores não determinaram a resistência térmica dos microrganismos obtidos. Craven (1990) observou que o aumento do pH do meio de esporulação acarretava um aumento no valor do tempo de redução decimal de esporos de *Clostridium perfringens*.

Resultados similares foram obtidos por Mazas *et al.* (1997) com *B. cereus*. Seus resultados mostram que o pH inicial do meio de esporulação não tamponado afetou cepas de maneira diferente. Para *B. cereus* ATCC 4342, os valores do tempo de redução decimal diminuíram em função do pH (de 7,5 a 5,5). Em contraste, a resistência ao calor da cepa ATCC 7004 não foi afetada pelo pH do meio de esporulação nestas condições. Porém, quando utilizando o meio de esporulação tamponado o valor de D diminuiu com o pH para as três linhagens estudadas.

O mecanismo pelo qual o pH no momento da esporulação pode afetar a resistência térmica dos esporos formados não é bem conhecido. Khim *et al.*, (1990) demonstrou que esporos de *Clostridium* contendo ferro e cobre são mais sensíveis ao calor. Mazas *et al.* (1997) sugeriu que esporos de *Bacillus* também podem ser afetados por este mecanismo, pHs alcalinos estariam precipitando estes metais na forma de hidróxido tornando-os indisponíveis ao microrganismo durante sua esporulação, impedindo que estes esporos se tornem sensíveis ao calor.

O pH alcalino no meio de esporulação também pode estar favorecendo uma maior mineralização dos esporos, aumentando assim sua termorresistência. Quando esporos já formados são submetidos a pHs ácidos e levemente aquecidos (em temperaturas em torno de 60⁰C) sofrem perda de minerais (como cálcio, manganês, magnésio, potássio e sódio) e perdem sua termorresistência, e quando aquecidos sob pHs alcalinos em torno de 8, são capazes de reabsorver estes minerais e se converterem em formas mais termorresistentes (BENDER e MARQUIS, 1985; MARQUIS e BENDER, 1985; BEAMAN e GERHARDT, 1986).

Palop *et al.* (1990) sugerem que, além da desmineralização, pode haver outros mecanismos envolvidos na perda de termorresistência de esporos submetidos a meios ácidos, pois segundo Gould e Dring (1975), meios mais ácidos podem acarretar na protonização de grupos carboxil do córtex, levando a uma reidratação do protoplasto e, conseqüentemente, a uma menor resistência ao calor.

Os relatos encontrados na literatura com relação a necessidade e o efeito de diferentes cátions divalentes sobre o crescimento e a esporulação de espécies do gênero *Bacillus* são conflitantes. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a adição de íons Mg²⁺, Ca²⁺, e K⁺ ao meio de esporulação nas concentrações estudadas não apresentaram efeito significativo na resistência térmica dos esporos. Resultados similares foram obtidos por Yamazaki *et al.* (1997) para *Alicyclobacillus acidoterrestris* onde a adição de íons divalentes ao meio de esporulação não apresentou influência na resistência dos esporos obtidos. Porém, Cazemier *et al.* (2001) obteve resultados opostos para *B. subtilis*, pois esporos preparados em ágar nutriente suplementado com íons, dentre eles Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, e K⁺, apresentaram maior resistência ao calor. Para Amaha e Ordal (1957) a adição de cálcio e manganês também acarretou em um aumento na resistência ao calor de *B. coagulans*, porém, assim como neste trabalho, a adição de magnésio não apresentou efeito aparente.

Charney *et al.* (1951) relataram a necessidade específica de manganês na esporulação do gênero *Bacillus*. Rabinovitch e Silva (1973) verificaram que íons divalentes são essenciais na esporulação endotrófica de *Bacillus licheniformis*. A adição de um agente sequestrante de metais em um meio mineral sem fonte de carbono, impediu a esporulação endotrófica do microrganismo porém, quando as células foram previamente saturadas com excesso de Mn^{+2} , a esporulação ocorreu.

Cheung *et al.* (1982), apesar de não terem verificado a influência do manganês na resistência térmica, demonstraram que a taxa de esporulação de *G. stearothermophilus* é influenciada pela concentração de manganês no meio. Demonstram que, em concentrações acima de 3 ppm, este íon pode apresentar um efeito tóxico sobre as células, sugerindo que o excesso de manganês dentro da célula poderia estar inibindo o fluxo de cálcio em *G. stearothermophilus* e também síntese de RNA e proteínas. Nos primeiros delineamentos as concentrações utilizadas equivalem a 100 ppm e 50 ppm, logo, a esporulação pode estar sendo prejudicada pelo mesmo mecanismo.

Rowe *et al.* (1975) afirmou que *G. stearothermophilus* necessita de quantidades traço de manganês para o seu desenvolvimento, não sendo necessária sua adição ao meio de cultura. Meios complexos comerciais possuem traços de íons metálicos, e seu conteúdo varia entre diferentes marcas e até mesmo entre diferentes lotes da mesma marca (BOVALLIUS e ZACHARIAS, 1971). Grant e Pramer (1962) determinaram a composição centesimal do extrato de levedura a partir de uma análise de 5 lotes de meios comerciais. Os resultados mostraram que este meio industrializado pode apresentar uma média de $1270 \mu g \cdot g^{-1}$ de peso seco de Mg^{2+} e $2,3 \mu g \cdot g^{-1}$ de peso seco de Mn^{2+} . Logo, pode ser que o manganês e outros íons metálicos sejam necessários em quantidades traço para a resistência térmica de esporos de *G. stearothermophilus* durante sua esporulação, porém as fontes de nutrientes industrializadas utilizadas neste trabalho já podem estar fornecendo-os em as quantidades suficientes.

6.4 CONCLUSÃO

A partir de uma sequência de três planejamentos experimentais Plackett-Burman e uma etapa de otimização (planejamento DCCR), foi demonstrada a

influência da composição do meio de esporulação sobre a resistência térmica de esporos de *G. stearothermophilus*.

Na primeira etapa foi demonstrado que a adição dos sais inorgânicos $MgSO_4$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 ao meio de cultura não influenciou a resistência térmica dos esporos na formulação estudada. Os resultados estatísticos apontaram a necessidade de reduzir as concentrações de $MnSO_4$, peptona e extrato de levedura do meio. O aumento do pH do meio em até 8,5 demonstrou maximizar a resistência térmica dos esporos produzidos.

A segunda etapa demonstrou que a concentração de sulfato de manganês de $0,05\text{ g.l}^{-1}$ ainda estava em excesso, prejudicando a termorresistência dos esporos. Na terceira etapa foi demonstrado que a peptona e a triptona não influenciavam estatisticamente a produção de esporos dentro da formulação estudada portanto, foram retiradas do meio de cultura.

Na etapa de otimização foi demonstrado que o aumento do pH em até 9,5 influencia negativamente a resistência térmica dos esporos produzidos. A formulação do meio de cultura que maximiza a resistência térmica dos esporos foi: extrato de levedura, 2 g.l^{-1} ; extrato de carne, 1 g.l^{-1} ; $MnSO_4$, $0,005\text{ g.l}^{-1}$, pH 8,5. A otimização forneceu esporos com o maior valor de $D_{121}^{\circ C}$ deste trabalho : 5,4 minutos. Quando comparado com o menor valor obtido de 1,3 minutos (no primeiro planejamento Plackett-Burman), isso representa um aumento de mais de 4 vezes na resistência térmica.

Em geral foi possível concluir que, meios de cultura com menores concentrações de nutrientes forneceram esporos mais resistentes ao calor úmido, quando estes foram utilizados no preparo de indicadores biológicos. A variável que apresentou maior influência no processo foi o pH, sendo que valores de pH alcalinos, em torno de 8,5, contribuem para uma maior resistência dos esporos formados.

Partindo-se da formulação do meio utilizado pelo CPPI na produção do Esteriteste, foram retirados cinco componentes do meio de cultura (peptona, triptona, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e fosfato de potássio), sem alterar significativamente a quantidade de esporos produzidos (acima de $1,0 \cdot 10^6\text{ UFC.ml}^{-1}$). Este meio desenvolvido poderia substituir o meio utilizado atualmente na produção de Esteriteste, e ainda, como demonstrou o estudo, a resistência térmica dos esporos produzidos poderia ser manipulada pela alteração do pH. Este resultado

possui possibilidade de aplicação imediata na produção de IBs pelo CPPI. Portanto, sugere-se a determinação do pH que forneça esporos com a termorresistência desejada, e a validação deste meio para utilização na produção de Esteriteste. Este meio poderia também ser utilizado no desenvolvimento de esporos com menor termorresistência, para a produção de um IB contendo maior número de esporos (10^6 UFC/IB), para a utilização na validação de processos de esterilização, que assim o exige.

REFERÊNCIAS

AMAHA, M; ORDAL, J.Z. Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. **Journal of Bacteriology**, v. 74, p.596-604, 1957

BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p.1242-1246, 1986.

BENDER, G.R.; MARQUIS, R.E. Spore heat resistance and specific mineralization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1415–1421, 1985.

BOVALLIUS, A.; ZACHARIAS, B. Variations in the metal content of some commercial media and their effect on microbial growth. **Applied Microbiology**, v. 22, n.3, p. 260-262, 1971.

CAZEMIER, A. E.; WAGENAARS, S. F. M.; STEEG, P.F. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 761-770, 2001.

CHARNEY, J.; FISHER, W.P.; HEGARTY, C.P. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. **Journal of Bacteriology**. v. 62, n.2, p.145–148. 1951

CHEUNG, H. Y.; VITKOVIC, L.; BROWN, M.R.W. Toxic effect of manganese on growth and sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 2345-2402, 1982.

CRAVEN, S.E. The effect of the pH of the sporulation environment on the heat resistance of *Clostridium perfringens* spores. **Current Microbiology**, v. 22, p.233-237, 1990.

FEEHERRY, F.E.; MUNSEY, D.T.; ROWLEY, A.D.B. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 365-370, 1987.

GOULD, G. W.; DRING, G. J. Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. **Nature**, v. 258, p. 402–405, 1975.

KIHM, D.J.; HUTTON, M.T.; HANLIN, J.H.; JOHNSON, E.A. Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B Spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 681-685, 1990

LOSHON, C.A.; MELLY, E.; SETLOW, B.; SETLOW, P. Analysis of the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n.6, p. 1051-1058, 2001.

MARQUIS, R.E.; BENDER G.R. Mineralization and Heat Resistance of Bacterial Spores. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n.2, p. 789-791, 1985.

MARQUIS, R.E.; SIM, J.; SHIN, S.Y. Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 76, n. 4 , p.40-48, 1994.

MAZAS, M.; LÓPEZ, M.; GONZÁLEZ, I.; BERNARDO, A.; MARTÍN, R. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n.5, p. 331-334, 1997.

MELLY, E.; GENEST, P.C.; GILMORE, M.E.; LITTLE, S.; POPHAM, D.L. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n.6, p.1105-1115, 2002.

MERKEL, G.J.; PERRY, J.J. Effect of growth substrate on thermal death of thermophilic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n.6, p.626-629, 1977.

MINH, H.N.T.; PERRIER-CORNET, J-M.; GERVAIS, P. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n.1, p. 107–114, 2008.

PALOP, A.; SALA, F.J.; CONDON, S. Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1316–1319, 1999.

PENNA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. A.; ISHII, M. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 106, n. 1-3, p.287-294, 2003.

PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A.; TAQUEDA, M.E.S.; ISHII, M. The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 54, n. 5, p.398-412, 2000.

RABINOVITCH, L; SILVA, S.M da. Estudos sobre a esporulação de uma amostra de *Bacillus* – IV – Outras evidências sobre a atividade do íon Mn^{2+} na esporulação endotrófica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 71, n.1-2, p.149-156, 1973.

ROWE, J. J.; GOLDBERG, I. D.; AMELUNTEN, R. E. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v.124, n. 1, p.279-284, 1975.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 172-180, 2007.

SMITH, G.M.; KOPELMAN, M.; JONES, A.; PFLUG, I.J. Effect of environmental conditions during heating on commercial spore strip performance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n.1, p. 12-18, 1982

TENNEN, R.; SETLOW, B.; DAVIS, K.L.; LOSHON, C.A.; SETLOW, P. Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n.2, p.330-338, 2000.

YAMAZAKI, K.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; SHINANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n.2, p. 153–156, 1997.

YAZDANY, S.; LASHKARI, K.B. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v.30, n.1, p.1-3, 1975.

7 ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

7.1 INTRODUÇÃO

A dormência metabólica e as propriedades de resistência dos esporos bacterianos são cruciais para o papel ecológico dos esporos como estruturas de sobrevivência, podendo sobreviver por longos períodos. A dormência e a resistência ao calor são impostas ao núcleo por uma série de mecanismos (JOHNSTONE, 1994; ERRIGTON, 1993).

Mesmo na ausência de processos metabólicos o esporo deve ser capaz de manter um mecanismo de alerta sensorial monitorando o ambiente externo, sendo capaz de desencadear o processo de germinação em condições ambientais favoráveis. Na presença de determinados nutrientes ou moléculas, o esporo é capaz de sair do estado de dormência. Estes germinantes agem sobre receptores de proteínas na membrana interna provocando mudanças que iniciam o metabolismo, levando a replicação do DNA, ao crescimento vegetativo e, conseqüentemente, a perda de resistência ao calor (JOHNSTONE, 1994; SETLOW, 2003; MOIR 2006).

Eventos não frequentes de germinação podem ocorrer na ausência de germinantes específicos, e até mesmo em água destilada. Isso ocorre por meio de uma ativação aleatória de enzimas responsáveis pela hidrólise do córtex ou canais de transporte de água ou íons, processos estes que podem desencadear a germinação (PAIDHUNGAT e SETLOW, 2000). Isso pode acarretar na perda gradual de viabilidade e termorresistência de esporos armazenados.

A dormência e a manutenção da resistência são fundamentais durante o armazenamento de esporos bacterianos utilizados em indicadores biológicos. As condições de preparo e manutenção são muito importantes para se atingir uma boa qualidade do produto final, pois podem interferir na viabilidade e resistência dos esporos. Eles podem ser armazenados de diversas maneiras: congelados, sob refrigeração, liofilizados, em suportes como tiras de papel, em suspensão em água, tampão fosfato, acetato de cálcio e outros. (EVANS e CURRAN, 1960; ODLAUG *et al.*, 1981; REICH, 1981; PENNA *et al.*, 2000)

Reich e Morien (1982) reportaram a perda de resistência ao calor úmido de indicadores biológicos contendo *G. stearothermophilus* armazenados sob condições

ambiente e congelados. Alpin e Hodges (1979) demonstraram que esporos provenientes de meio definido sofreram um aumento da resistência ao calor durante três meses de armazenamento em suspensão aquosa a 4°C e 22°C, e esporos provenientes de meio complexo não apresentaram variação.

Penna *et al.* (2002) demonstraram que as condições de armazenamento de esporos de *G. stearothermophilus* como temperatura, umidade relativa e método de secagem, podem influenciar a viabilidade dos esporos e o valor de $D_{121^{\circ}\text{C}}$ do indicador biológico para esterilização a vapor. A maior perda de viabilidade se deu em esporos fixados em suporte armazenados a 33°C com 32% de umidade relativa.

Evans e Curran (1960) testaram a viabilidade de esporos armazenados em tampão fosfato em diferentes pHs e temperaturas, durante um período de três anos. O pH 8 forneceu a melhor estabilidade para esporos de *G. stearothermophilus* em todas as temperaturas.

Reich (1981) estudou os efeitos das condições de armazenamento de *G. stearothermophilus* sobre sua viabilidade e resistência ao calor úmido por um período de dois anos. Esporos em suspensão em água destilada mantidos a 4°C não apresentaram mudança em sua viabilidade, porém apresentaram uma perda significativa na resistência térmica, enquanto congelados apresentaram perda significativa na viabilidade. Esporos armazenados em acetato de cálcio 0,02 M pH 9,7 apresentaram a melhor estabilidade durante os dois anos.

O objetivo deste capítulo foi verificar a influência da suspensão e o armazenamento de esporos de *G. stearothermophilus* em água deionizada ou acetato de cálcio em sua viabilidade e termorresistência.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram produzidos seis lotes de esporos com o meio de esporulação padronizado pelo CPPI (PARANÁ, 2005). O inóculo foi produzido como descrito no item 3.2.2, o cultivo e a recuperação dos esporos foram realizados de acordo com o item 3.2.3. Porém, três lotes foram lavados, re-suspendidos e armazenados em água destilada pH 7,0 e outros três em solução de acetato de cálcio 0,02M pH 9,7. As suspensões de esporos obtidas foram armazenadas sob refrigeração ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) até sua utilização.

A quantificação dos esporos foi realizada de acordo com o item 3.2.4. Para verificar a resistência térmica das suspensões produzidas, estas foram utilizadas no preparo de indicadores biológicos (item 3.2.5) que foram submetidos ao teste de resistência térmica (3.2.6). Foram realizados três testes com 1, 2 e 3 meses de armazenamento. Os indicadores biológicos foram preparados logo antes do teste (24 a 48 h) para assegurar que seu armazenamento não interferisse no resultado. A viabilidade dos esporos em suspensão foi avaliada com 1 e 3 meses de armazenamento, para verificar possíveis alterações neste período.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros de termorresistência dos esporos armazenados em água deionizada pH 7,0 e em solução de acetato de cálcio 0,02M pH 9,7, os quais foram testados durante três meses estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS IBS PRODUZIDOS COM ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA DEIONIZADA E SOLUÇÃO DE ACETATO DE CÁLCIO

Tempo de armazenamento (meses)	Suspensão em água deionizada		Suspensão em acetato de cálcio	
	U_{sk} (min)	$D_{121^{\circ}C}$ (min)	U_{sk} (min)	$D_{121^{\circ}C}$ (min)
1	11,2 ± 0,8	2,5 ± 0,2	13,6 ± 0,8	3,0 ± 0,2
	11,2 ± 0,5	2,7 ± 0,1	13,7 ± 0,9	3,1 ± 0,2
	11,2 ± 0,2	2,6 ± 0,04	13,7 ± 0,91	3,1 ± 0,2
Média ± σ	11,2 ± 0,03	2,6 ± 0,1	13,6 ± 0,02	3,1 ± 0,05
2	8,6 ± 0,8	2,0 ± 0,5	11,1 ± 0,8	2,2 ± 0,2
	8,7 ± 0,7	2,0 ± 0,1	11,1 ± 0,8	2,5 ± 0,2
	8,6 ± 0,8	2,2 ± 0,2	11,1 ± 1,0	2,6 ± 0,2
Média ± σ	8,7 ± 0,04	2,1 ± 0,1	11,1 ± 0,02	2,5 ± 0,2
3	11,0 ± 0,5	2,4 ± 0,1	13,5 ± 0,7	3,0 ± 0,1
	11,1 ± 0,8	2,7 ± 0,2	13,4 ± 1,0	3,0 ± 0,2
	8,8 ± 0,2	2,0 ± 0,5	13,5 ± 1,0	3,1 ± 0,2
Média ± σ	10,3 ± 1,3	2,4 ± 0,3	13,5 ± 0,1	3,0 ± 0,05
Média total ± σ	10,1 ± 1,3	2,4 ± 0,3	12,8 ± 1,2	2,9 ± 0,3

A Figura 1 apresenta a plotagem *Box-and-Whisker* dos valores do tempo de redução decimal a 121^oC de todos os experimentos realizados. Os valores de $D_{121^{\circ}C}$ de esporos armazenados em água deionizada variaram de 2,0 minutos a 2,7 minutos, e de esporos armazenados em acetato de cálcio variaram de 2,2 minutos a

3,1 minutos. Apesar de alguns valores se sobreporem, é possível observar que as médias dos valores de $D_{121}^{\circ C}$ obtidos nos três meses de experimento, assim como a média total dos esporos armazenados em acetato de cálcio é superior à dos armazenados em água deionizada. O mesmo ocorre com os valores de U_{sk} , logo, o acetato de cálcio fornece uma maior resistência aos esporos desde a sua preparação.

A redução dos valores obtidos no segundo mês de armazenamento não pode ser atribuída à perda de resistência do microrganismo, é mais provável que esteja associada às variações provenientes da técnica de quantificação de microrganismos viáveis (que influencia nos valores de N_0 e D_{1210C}) e do equipamento utilizado no teste.

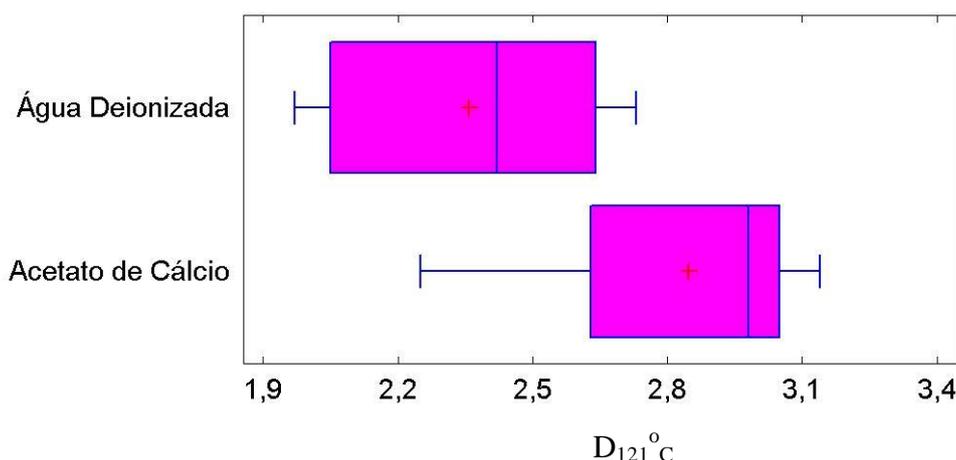


FIGURA 1 – PLOTAGEM *BOX-AND-WISKER* DOS VALORES DE $D_{121}^{\circ C}$ DE ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA DEIONIZADA E ACETATO DE CÁLCIO.

A análise de variância dos valores de $D_{121}^{\circ C}$ dos esporos armazenados em água deionizada e acetato de cálcio apresentou um p-valor menor do que 0,5, demonstrando que a 95% de confiança a diferença entre os valores de ambos é estatisticamente significativa (Tabela 2).

TABELA 2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TERMORRESISTÊNCIA DOS ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA E ACETATO DE CÁLCIO.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	gl	Média quadrada	F	p-valor
Entre grupos	1,08045	1	1,08045	11,79	0,0034
Dentro dos grupos	1,46571	16	0,0916069		
Total corrigido	2,54616	5			

A viabilidade das suspensões de esporos, realizada pela contagem de esporos viáveis das mesmas, foi feita depois de 1 e 3 meses de armazenamento. Os resultados estão na Tabela 3:

TABELA 3 –VIABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS ARMAZENADAS EM ÁGUA DEIONIZADA E ACETATO DE CÁLCIO.

Tempo de armazenamento (meses)	Suspensão em água deionizada (UFC.ml ⁻¹)	Suspensão em acetato de cálcio (UFC.ml ⁻¹)
1	1,2.10 ⁷	1,4.10 ⁷
	1,6.10 ⁷	1,6.10 ⁷
	1,4.10 ⁷	1,5.10 ⁷
Média ± σ	1,4.10⁷ ± 2,0.10⁶	1,5.10⁷ ± 1,0.10⁶
3	2,0.10 ⁷	1,8.10 ⁷
	2,5.10 ⁷	2,1.10 ⁷
	1,7.10 ⁷	2,8.10 ⁷
Média ± σ	2,1.10⁷ ± 4,0.10⁶	2,2.10⁷ ± 5,1.10⁶
Média total ± σ	1,710⁷ ± 4,6.10⁶	1,9.10⁷ ± 5,2.10⁶

A análise de variância da viabilidade dos esporos armazenados em água deionizada e acetato de cálcio apresentou um p-valor maior do que 0,5, demonstrando que a 95% de confiança não existe uma diferença significativa entre ambos (Tabela 4). Portanto, o diluente de armazenamento dos esporos não interferiu na viabilidade, e também não foi possível notar alteração significativa durante os três meses de armazenamento.

TABELA 4 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VIABILIDADE DOS ESPOROS ARMAZENADOS EM ÁGUA E ACETATO DE CÁLCIO.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	gl	Média quadrada	F	p-valor
Entre grupos	5,33333.10 ¹²	1	5,33333.10 ¹²	0,22	0,6493
Dentro dos grupos	2,42667.10 ¹⁴	10	2,42667.10 ¹³		
Total corrigido	2,48.10 ¹⁴	11			

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Reich (1981), que demonstrou que esporos de *G. stearotherophilus* suspendidos em acetato de cálcio apresentaram valores de D_{121°C} maiores do que os suspendidos em água. Porém, para este mesmo autor, esporos suspendidos em água destilada demonstraram perda de viabilidade e termorresistência com três meses de armazenamento, o que não foi verificado neste estudo.

Os valores de tempo de redução decimal dos esporos em suspensão de acetato de cálcio obtidos neste trabalho (média de 2,9 minutos) são superiores aos obtidos por Reich (1981) e Penna *et al.* (2000) para esporos armazenados sob as mesmas condições, tendo obtido valores máximos de $D_{121}^{\circ C}$ de 1,7 minutos e 2 minutos, respectivamente. Porém, outros fatores podem ter contribuído para esta diferença, como as condições de esporulação e realização do teste de resistência.

Diversos autores investigaram a influência da troca iônica na resistência de esporos de *Bacillus*, demonstrando que esporos tratados em suspensões contendo íons divalentes em pHs alcalinos sofriam remineralização e, portanto, apresentavam maior resistência (BENDER e MARQUIS, 1985; MARQUIS e BENDER, 1985; BEAMAN e GERHARDT, 1986; YAMAZAKI *et al.*, 1977). Esporos com altos níveis de cálcio são os mais resistentes (BENDER e MARQUIS, 1985). Segundo Gould e Dring (1975), meios mais ácidos podem acarretar na protonização de grupos carboxil do córtex, levando a uma reidratação do protoplasto e, conseqüentemente, a uma menor resistência ao calor. Portanto, o armazenamento dos esporos em meio alcalino pode estar favorecendo sua resistência térmica.

Com relação à estabilidade dos esporos armazenados de ambas as formas, não foi possível afirmar que ocorreram mudanças significativas ao longo dos três meses de estudo. Não foi possível observar um claro declínio dos valores com relação ao tempo, e a variação dos resultados pode ser devido aos erros do próprio método. Para avaliação da estabilidade das suspensões de esporos se faz necessário um acompanhamento por um tempo maior, de no mínimo um ano.

7.4 CONCLUSÃO

A utilização de solução de acetato de cálcio 0,02M pH 9,7 na recuperação e no armazenamento de esporos de *G. stearothermophilus* confere uma maior resistência ao calor úmido à população microbiana quando comparada à água deionizada (valor médio de $D_{121}^{\circ C}$ de 2,3 minutos em água deionizada e 2,9 minutos em acetato de cálcio) . Porém, com relação à viabilidade, ambos os diluentes apresentam resultados semelhantes. O estudo deve ser realizado por um período maior, de no mínimo um ano, para avaliar a influência destes diluentes na estabilidade das suspensões de esporos durante seu armazenamento.

REFERÊNCIAS

ALPIN, S.J.; HODGES, N.A. Short communication: Changes in heat resistance during storage of *Bacillus stearothermophilus* spores from complex and chemically defined media. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 46,623-626, 1979.

BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p.1242-1246, 1986.

BENDER, G.R.; MARQUIS, R.E. Spore heat resistance and specific mineralization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1415–1421, 1985

ERRINGTON, J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 57, n.1, p.1–33, 1993.

EVANS, F.R.; CURRAN, H.R. Influence of preheating, pH, and holding temperature upon viability of bacterial spores stored for long periods in buffer substrates. **Journal of Bacteriology**, v. 79, n.3, p.361-368, 1960.

GOULD, G. W.; DRING, G. J. Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. **Nature**, v. 258, p. 402–405, 1975.

JOHNSTONE, K. The trigger mechanism of spore germination: current concepts. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 76, p. 17–24, 1994.

MARQUIS, R.E.; BENDER G.R. Mineralization and Heat Resistance of Bacterial Spores. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n.2, p. 789-791, 1985.

MOIR, A. How do spores germinate? Review article. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 526–530, 2006.

ODLAUG, T. E.; CAPUTO, R.A.; GRAHAM, G. S. Heat resistance and population stability of lyophilized *Bacillus Subtilis* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p.1374- 1377, 1981.

PAIDHUNGAT, M. e SETLOW, P. Role of Ger Proteins in Nutrient and Nonnutrient Triggering of Spore Germination in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. V. 182, n.9, p. 2513–2519, 2000.

PENNA, T.C.V.; ISHII, M, MACHOSHVILI, I.A.; MARQUES, M. The Effect of Bioindicator Preparation and Storage on Thermal Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, n.1-9, p.525-538, 2002.

PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A.; TAQUEDA, M.E.S.; ISHII, M. The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 54, n. 5, 2000.

SETLOW, P. Spore germination. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 550-556, 2003

REICH, R.R. *Bacillus stearothermophilus* spores suspension: effect of storage conditions and time on viability and moist heat resistance. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 35, n.2, p. 74- 80, 1981.

REICH, R. R.; MORIEN, L. L. Influence of environmental storage relative humidity on biological indicator resistance, viability, and moisture content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 609-614, 1982.

YAMAZAKI, K.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; SHINANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n.2, p. 153–156, 1997

8 MEIO DE RECUPERAÇÃO

8.1 INTRODUÇÃO

A composição do meio no qual a suspensão bacteriana é submetida ao ciclo de esterilização influencia na resistência térmica da população e no número de sobreviventes, assim como o meio utilizado para o posterior crescimento dos esporos danificados pelo calor (YOKOYA e YORK, 1965; MALLIDIS e SCHOLEFIELD, 1986; LÓPEZ *et al.*, 1997).

Esporos termorresistentes podem não ser totalmente mortos ou inativados durante um processo térmico, mas podem ser apenas injuriados de forma sub-letal. Esporos danificados pelo calor apresentam comportamento distinto em diferentes meios de recuperação, podendo apresentar maior sensibilidade a compostos como ácidos orgânicos, cloreto de sódio ou nitrito (CAZEMIER *et al.* 2001). O efeito sub-letal sobre os esporos pode ocorrer em proteínas e enzimas de seu sistema de germinação ou de crescimento das células vegetativas (MARQUIS *et al.*, 1994). Quando o maior sítio de dano é no sistema de germinação, o esporo se torna superdormente. O subsequente tratamento destes esporos com álcali ou cultivo em meio com lisozima os torna capazes de germinar novamente, enquanto para outros esporos, o dano pode não resultar em superdormência, sendo este tratamento ineficiente (ALDERTON *et al.*, 1974)

Esporos danificados pelo calor apresentam maior contagem de sobreviventes se cultivados em meios complexos, quando comparados com meio mínimo. Estas células aparentam defeitos que aumentam a sua necessidade nutricional, mas não defeitos genéticos (MARQUIS *et al.*, 1994)

No caso de indicadores biológicos autocontidos, onde os esporos estão em suspensão no meio de recuperação, sua composição influencia tanto na redução da população durante o ciclo de esterilização, quanto na recuperação dos sobreviventes.

O meio de recuperação do indicador biológico deve fornecer um crescimento adequado dos microrganismos sobreviventes ao ciclo de esterilização, mesmo quando danificados por este. O meio normalmente é composto por água, extratos ou hidrolisados protéicos, carboidratos, minerais e um indicador de pH.

O crescimento de *G. stearothermophilus* na presença de quantidade suficiente de carboidratos ocasiona a acidificação do meio de cultura e, conseqüente, alteração da coloração do indicador biológico, proporcionando a fácil visualização do resultado positivo, sendo assim importante a presença de açúcares no meio de recuperação. Porém, devido a presença destes açúcares, quando esterilizado pelo calor, o meio de cultura está sujeito a sofrer as reações de Maillard, cujos produtos ácidos podem causar alteração de cor no IB, resultando em uma coloração caramelo, que pode gerar uma interpretação duvidosa do resultado do produto.

O cálcio também é um componente indispensável no meio de recuperação, pois é necessário para a germinação de esporos danificados pelo calor (DE VRIES, 2004). Níveis apropriados de cálcio no meio de recuperação permitem uma determinação mais consistente do valor do tempo de redução decimal de esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (SASAKI *et al.*, 2000). A adição de amido na formulação pode levar a um aumento do número de esporos recuperados e um aumento no valor do tempo de redução decimal (MALLIDIS e SCHOLEFIELD, 1986; LÓPEZ *et al.*, 1997). Ele apresenta a mesma função do carvão ativado, adsorvendo compostos inibidores da germinação e desenvolvimento das células (ADAMS, 1979 citado por MALLIDIS e SCHOLEFIELD, 1986)

O púrpura de bromocresol (PBC), ou 5',5"-dibromo-o-cresolsulftaleína, é um ácido fraco indicador de pH comumente usado para detecção de crescimento microbiano, pois pode detectar mudanças de pH em líquidos de maneira rápida e precisa. Em pH em torno de 5,2 possui coloração amarela e em pH em torno de 6,8 coloração violeta.

O efeito inibitório de corantes sobre microrganismos é bem conhecido, e estes podem ser utilizados na diferenciação microbiana e em meios seletivos. Fung e Miller (1973) verificaram que o púrpura de bromocresol diluído até 1 g.l⁻¹ e adicionado a placas de ágar de soja Tripticaseína (TSA) permitiu o crescimento de microrganismos Gram-negativos, porém inibiu Gram-positivos. Smith *et al.* (1982) demonstrou que a adição de púrpura de bromocresol na concentração de 0,0015% ao meio de recuperação formulado com TSB, não causou alterações nos valores de $D_{121}^{\circ C}$ e U_{sk} .

Um meio de recuperação contendo hidrolisado de proteínas e glicerol pode apresentar estabilidade na coloração e pH quando comparado antes e após a

exposição ao calor (KAISER, 1999). O glicerol é um polialcool atóxico comumente utilizado na indústria de alimentos devido às suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes. É obtido como subproduto da produção industrial de sabão e biodiesel (ARRUDA *et al.*, 2007). É geralmente utilizado como agente crioprotetor em microrganismos mantendo a estabilidade da parede celular durante o congelamento e conservação (SIMIONE, 1998). O glicerol também pode ser assimilado por alguns microrganismos como fonte de carbono (BURKE e TEMPEST, 1990).

Esta etapa do trabalho visou determinar a concentração ideal de púrpura de bromocresol e avaliar a influência da adição de glicerol no meio de recuperação sobre a estabilidade de sua coloração e pH.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Determinação da concentração ideal de púrpura de bromocresol

Com a finalidade de verificar a melhor concentração do indicador de pH púrpura de bromocresol na detecção da germinação de esporos de *G. stearothermophilus* no meio de recuperação, foram preparados indicadores biológicos com diferentes concentrações do mesmo por meio de diluições sucessivas. Foram realizados dois testes, o primeiro reproduzindo o indicador biológico antes do uso (autoclavação) e o segundo o reproduzindo após o uso. Para o primeiro teste, o meio de recuperação (PARANÁ, 2003) foi preparado, esterilizado em autoclave a 121^oC durante 15 minutos e envasado em frasco-ampola contendo 3 ml cada. Para o segundo teste foi feito o mesmo, porém após realizadas as diluições, os frascos foram selados com lacres de alumínio e esterilizados novamente durante 15 minutos, para reproduzir a situação do meio de recuperação do indicador biológico após o uso.

As diluições foram realizadas de acordo com a Figura 1. Partiu-se de um indicador biológico sem esporos, contendo 6 ml do caldo de revelação com púrpura de bromocresol na concentração de 1 g.l⁻¹ e foram transferidos 3 ml para outro indicador biológico contendo 3 ml de caldo de revelação sem púrpura de

bromocresol, diluindo assim a concentração deste pela metade. Desta maneira foram feitas oito diluições sucessivas.

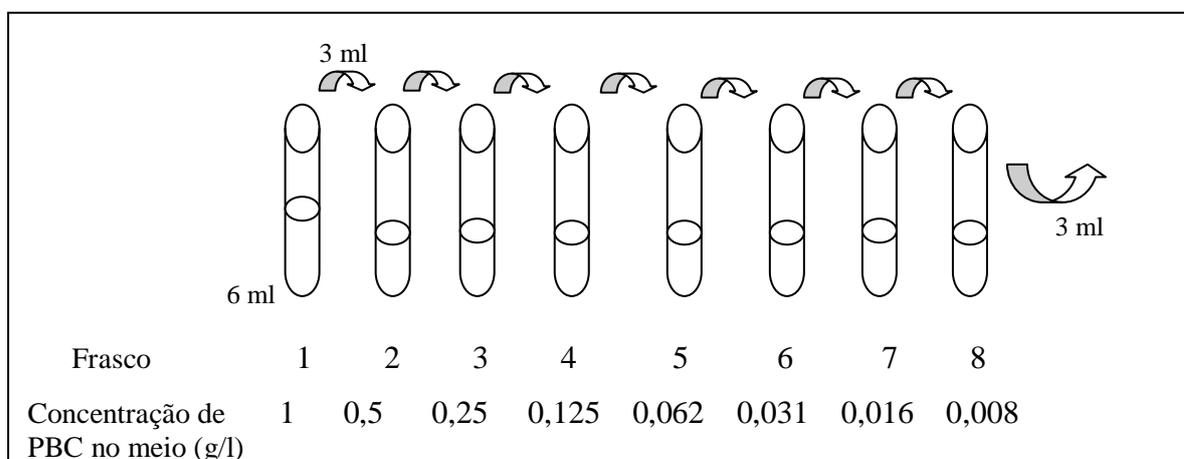


FIGURA 1 – ESQUEMA DAS DILUIÇÕES DO PBC PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO.

Para avaliar a capacidade de germinação destes meios preparados com diferentes concentrações de PBC, foram realizados dois experimentos (Figura 2). No experimento 1 as diluições foram inoculadas com suspensão de esporos em quantidade suficiente para se obter 10^3 esporos/IB, seladas com lacre de alumínio e incubadas a 57°C durante 48 horas. No experimento 2, as diluições foram seladas com lacre de alumínio e esterilizadas novamente durante 15 minutos antes da inoculação, para simular o teste do indicador biológico. Este experimento visou verificar se um novo ciclo de esterilização do meio de cultura durante a utilização do produto pode alterar o ponto de viragem do púrpura de bromocresol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para cada experimento foi realizado um controle sem a inoculação de esporos, com a finalidade de verificar se a incubação poderia acarretar em qualquer mudança de coloração que não fosse proveniente do crescimento microbiano. Para confirmar a germinação dos esporos foi realizada coloração de Gram do sedimento de todas as diluições após centrifugação.

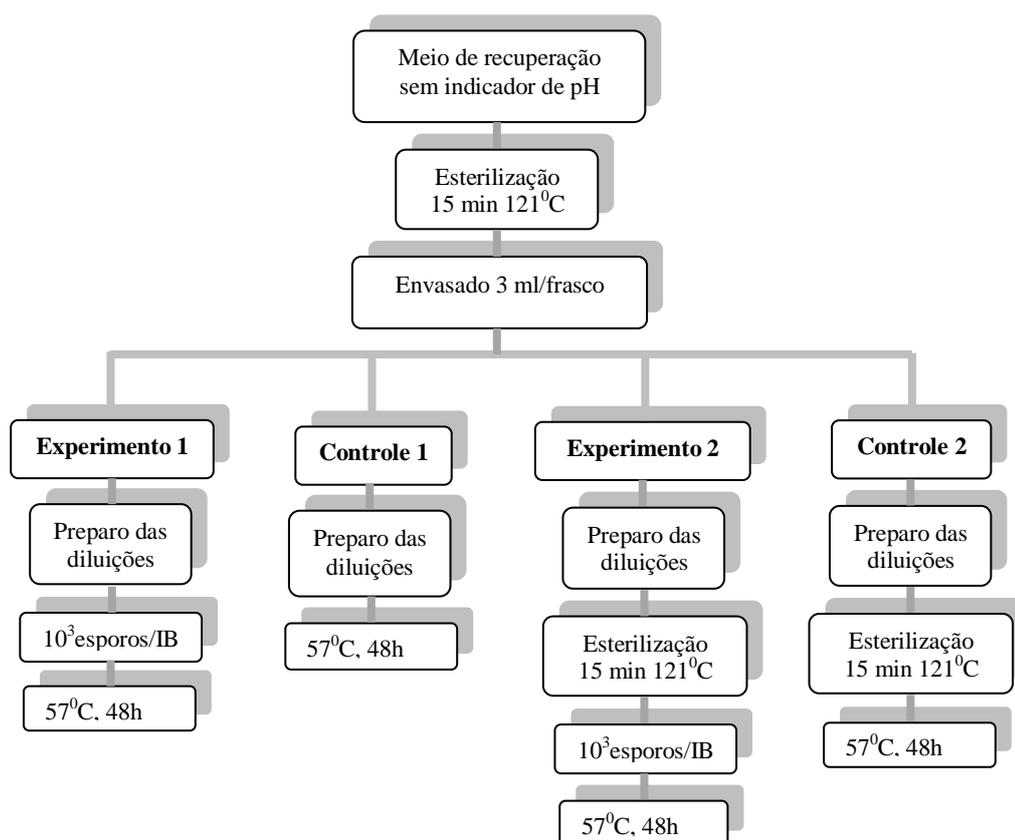


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE PBC.

8.2.2 Adição de glicerol ao meio de recuperação

Foram formulados sete meios de cultura contendo glicerol em sua formulação e comparados com os dois meios de recuperação utilizados neste trabalho, o meio padronizado pelo CPPI (PARANÁ, 2003), e o meio a base de vinhaça de soja formulado por Dlugokenski (2008), cujas composições estão descritas no item 3.2.5. A formulação detalhada dos meios consta na Tabela 1.

O meio 1 refere-se ao meio utilizado na produção do indicador biológico Esteriteste (Paraná, 2003), nos meios 2 e 3 testou-se a adição de glicerol a este meio nas concentrações de 1,25% e 2%, respectivamente (KAISER, 1999). O meio 4 refere-se ao meio a base de vinhaça de soja (DLUGOKENSKI, 2008), o meio 5 e 6 adicionado de glicerol, sendo o meio 6 com ausência do extrato de leveduras. Os meios 8 e 9 foram formulados para conter apenas o glicerol e o amido como fonte de nutrientes. Nos meios 7 e 9 testou-se a adição de sal e fostato de potássio, tendo em vista que o primeiro possui a capacidade de modular a força osmótica do meio

de cultura e o segundo, além de prover fosfato aos processos metabólicos do microrganismo, proporciona uma certa capacidade de tamponamento ao meio (KAISER, 1999).

TABELA 1 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE RECUPERAÇÃO PARA TESTE DE ADIÇÃO DE GLICEROL NO MEIO DE CULTURA.

Meio	Formulação
1	TSB, 3%; amido solúvel, 0,1%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
2	TSB, 3%; amido solúvel, 0,1%; glicerol, 1,25%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
3	TSB, 3%; amido solúvel, 0,1%; glicerol, 2%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
4	Vinhaça de soja, 1,5%; extrato de levedura, 0,8%; %; amido solúvel, 0,1%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
5	Vinhaça de soja, 1,5%; extrato de levedura, 0,8%; amido solúvel, 0,1%; glicerol, 2%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
6	Vinhaça de soja, 1,5%; amido solúvel, 0,1%; glicerol, 2%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
7	Vinhaça de soja, 1,5%; amido solúvel, 0,1%; glicerol, 2%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; NaCl, 0,4%; K ₂ HPO ₄ , 0,15%; púrpura de bromocresol 0,001%.
8	Amido solúvel, 0,1%; glicerol, 2%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; púrpura de bromocresol 0,001%.
9	Amido solúvel, 0,1%; glicerol, 2%; CaCl ₂ .6H ₂ O, 0,018 %; NaCl, 0,4%; K ₂ HPO ₄ , 0,15%; púrpura de bromocresol 0,001%.

Os indicadores biológicos para esterilização a vapor, preparados com os diferentes meios citados, foram submetidos ao teste de viabilidade (descrito no item 3.2.7). Os IB que apresentaram viabilidade satisfatória foram submetidos ao teste de tempo de morte e tempo de sobrevivência, no qual dez amostras de cada meio foram submetidas a um ciclo de esterilização de cinco minutos e outras dez a um ciclo de quinze minutos, esperando-se dez amostras positivas e dez negativas, respectivamente. Para verificar se a adição de glicerol ao meio de recuperação promove uma melhor estabilidade da coloração após o uso do indicador biológico, os meios que apresentaram resultados satisfatórios tiveram sua coloração comparada após um ciclo de esterilização de vinte minutos e um ciclo de uma hora a 121°C, e um ciclo de uma hora a 127°C.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na determinação da concentração ideal de púrpura de bromocresol, a coloração das diluições antes e após a incubação podem ser observadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Após a incubação, uma tímida mudança na coloração pode ser percebida na terceira diluição ($0,25 \text{ g.l}^{-1}$). A quarta diluição ($0,125 \text{ g.l}^{-1}$) apresentou uma mudança de coloração mais visível. Apenas na quinta diluição ($0,062 \text{ g.l}^{-1}$) observou-se uma mudança acentuada da coloração púrpura para o amarelo (Figura 3).

Não foram observadas diferenças de coloração nos IBs dos experimentos um e dois, o que significa que o ponto de viragem do púrpura de bromocresol (concentração $0,125 \text{ g.l}^{-1}$ a $0,062 \text{ g.l}^{-1}$) é o mesmo para o meio esterilizado uma vez e duas vezes.

O controle da germinação pela coloração de Gram demonstrou, em todas as laminas, presença de bacilos Gram-positivos, inclusive nas três primeiras diluições. Este resultado mostra que a adição de púrpura de bromocresol no meio de recuperação em até 1 g.l^{-1} não inibe completamente a germinação dos esporos, porém, este resultado não é quantitativo, não permitindo avaliar se existe algum grau de inibição do crescimento do microrganismo. A adição do indicador de pH de 1 g.l^{-1} a $0,25 \text{ g.l}^{-1}$ impede a mudança de coloração do indicador biológico para amarelo, gerando um resultado falso-negativo. Sua adição na faixa de concentração de $0,125 \text{ g.l}^{-1}$ a $0,062 \text{ g.l}^{-1}$ impede que o meio se torne completamente amarelo após a incubação, podendo gerar uma interpretação duvidosa do teste. Os resultados mostram que a concentração ideal de púrpura de bromocresol no meio de recuperação se encontra na faixa de $0,031 \text{ g.l}^{-1}$ a $0,016 \text{ g.l}^{-1}$, fornecendo uma coloração adequada de um resultado positivo do indicador biológico, de maneira clara e objetiva. Diluições maiores não seriam ideais, visto que na oitava diluição o indicador biológico apresenta uma coloração púrpura muito fraca após a preparação. No indicador biológico Esteriteste a concentração utilizada é de $0,01 \text{ g.l}^{-1}$, estando dentro desta faixa (PARANÁ, 2003).

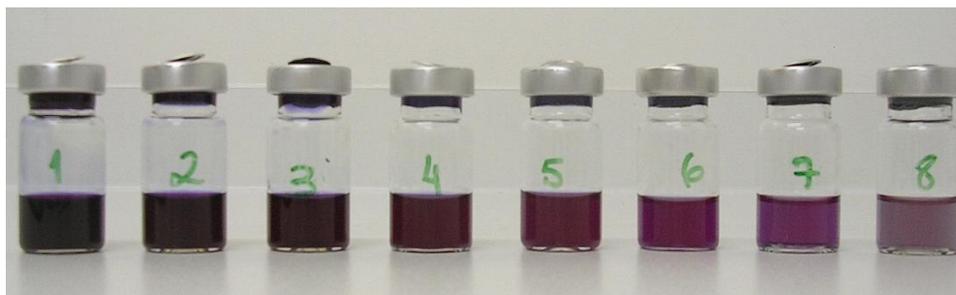


FIGURA 3 – IBs PREPARADOS COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE PBC



FIGURA 4 – IBs PREPARADOS COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE PBC APÓS 24H DE INCUBAÇÃO (RESULTADO DO EXPERIMENTO 1).

O resultado do teste de viabilidade dos IBs preparados com os meios de recuperação adicionados de glicerol estão na Tabela 2. O meio 7 foi descartado antes do teste de viabilidade, pois após a esterilização já apresentou uma coloração amarelada, o que impossibilitaria a leitura do teste. Os IB preparados com os meios de 1 ao 6 apresentaram resultados satisfatórios, 20% das amostras do meio 9 apresentaram mudança de coloração para amarelo, porém sem turbidez. A ausência de viabilidade nas amostras 8 e 9 pode ser atribuída a falta de uma fonte de nitrogênio na formulação.

TABELA 2- TESTE DE VIABILIDADE DOS IB PREPARADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO CONTENDO GLICEROL.

Meio	Número de amostras positivas/negativas	Resultado
1	10/0	Satisfatório
2	10/0	Satisfatório
3	10/0	Satisfatório
4	10/0	Satisfatório
5	10/0	Satisfatório
6	10/0	Satisfatório
8	0/10	Insatisfatório
9	2/8	Insatisfatório

Todos os meios, que apresentaram 100% de viabilidade, após submetidos ao teste do tempo de morte e tempo de sobrevivência, apresentaram resultados satisfatórios (Tabela 3).

TABELA 3 - TESTE DE INTERVALO DE SOBREVIDA/MORTE DOS IB PREPARADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL

Meio	Ciclo de esterilização de 5 min (Número de amostras positivas)	Ciclo de esterilização de 15 min (Número de amostras positivas)	Resultado
1	10	0	Satisfatório
2	10	0	Satisfatório
3	10	0	Satisfatório
4	10	0	Satisfatório
5	10	0	Satisfatório
6	10	0	Satisfatório

Os meios 1 ao 6 tiveram a coloração do resultado negativo (violeta) comparada nas seguintes situações: após o seu preparo; após um ciclo de esterilização de vinte minutos a 121°C; após um ciclo de esterilização de uma hora a 121°C e após um ciclo de esterilização de uma hora a 127°C (figuras 5, 6, 7 e 8 respectivamente). Depois de submetidos a uma hora de esterilização todos os meios apresentaram um desbotamento visível em relação a sua coloração inicial (após o preparo), adquirindo também uma coloração avermelhada. Depois de submetidos a um ciclo de 20 minutos a 121°C o único meio que não apresentou desbotamento foi o meio 6, formulado a base de vinhaça de soja e adicionado de glicerol.

Os meios formulados com TSB com e sem a adição de glicerol (meios 1,2 e 3) não sofreram alteração de pH após a esterilização durante o seu preparo, os meios a base de vinhaça de soja com e sem a adição de glicerol (meios 4, 5 e 6) apresentaram uma queda de 0,1 unidades. Após o teste de 20 minutos a 121°C todos os meios apresentaram uma queda de pH em 0,5 unidades. É possível concluir que a adição de glicerol não influenciou os pHs dos meios. Ao observar todos os testes, em geral a adição de glicerol aos meios 2, 3, 5 e 6 não forneceu melhor resultado quando comparado aos meios sem glicerol (1 e 4).

Os IBs formulados com os meios 4, 5 e 6 mantiveram a coloração inicial após 60 minutos de exposição a 121°C. Porém, apenas o meio 6 (formulação contendo vinhaça de soja e glicerol) apresentou menor desbotamento, mantendo a coloração violeta em todos os testes. Como não foi estudada uma formulação semelhante ao

meio 6, sem a adição de glicerol, não é possível afirmar que o mesmo proporcionou coloração estável

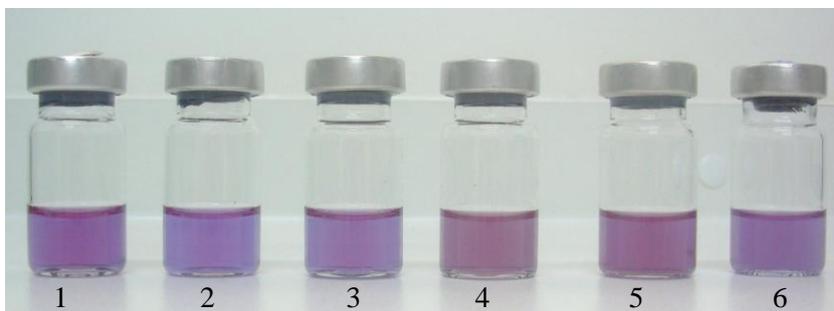


FIGURA 5 – IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS O PREPARO.

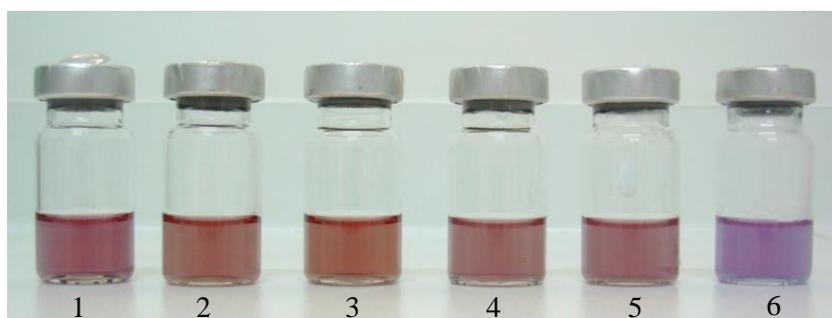


FIGURA 6- IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS ESTERILIZAÇÃO DE 20 MIN A 121⁰C.

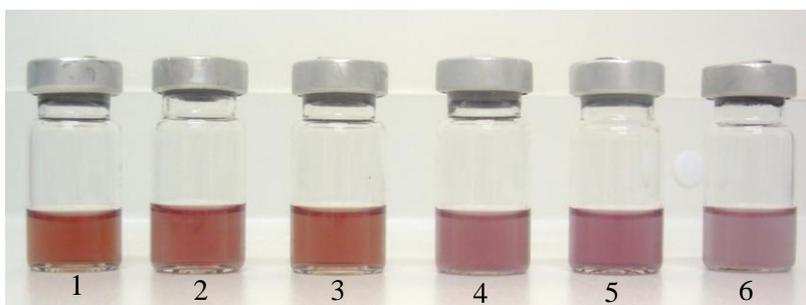


FIGURA 7 – IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS ESTERILIZAÇÃO DE 60 MIN A 121⁰C.

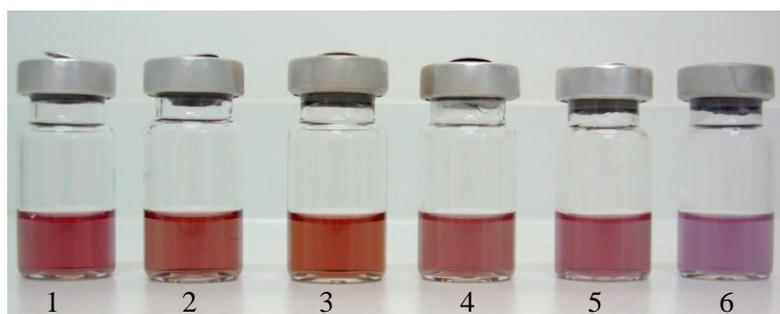


FIGURA 8 – IBS FORMULADOS COM MEIOS DE RECUPERAÇÃO ADICIONADOS DE GLICEROL APÓS ESTERILIZAÇÃO DE 60 MIN A 127⁰C.

Sua formulação apresenta como fonte de carbono a vinhaça de soja diluída que possui baixa concentração de carboidratos (entre 4,7 % e 11,8%), e não apresenta extrato de levedura em sua composição, resultando um meio com baixa concentração de carboidratos e proteínas, minimizando a reação entre os componentes do meio de cultura e proporcionando uma maior estabilidade na coloração. Os carboidratos presentes no meio de cultura reagem com aminoácidos, peptídeos e proteínas formando outros compostos e destruindo nutrientes essenciais ao crescimento microbiano. Estas reações dependem das concentrações de carboidrato e proteína, do pH inicial e do tipo de carboidrato presente (KAISER, 1999). Portanto, a estabilidade da sua coloração pode ser devido a baixa concentração de carboidratos no meio.

Este resultado demonstra que meios com baixas concentrações de carboidratos podem apresentar maior estabilidade de coloração após sua submissão ao ciclo de esterilização. Frente a isso se faz necessário a realização de pesquisas futuras visando uma nova formulação para o meio de recuperação do indicador biológico com concentrações menores de carboidratos, mas que ainda sejam capazes de proporcionar o crescimento dos microrganismos que sobrevivem ao processo de esterilização.

8.4 CONCLUSÃO

A concentração do indicador de pH púrpura de bromocresol entre 0,031 g.l⁻¹ a 0,016 g.l⁻¹, fornece uma coloração adequada ao indicador biológico, permitindo a germinação dos esporos sobreviventes e a mudança de coloração para amarelo.

De um modo geral, a adição de glicerol ao meio de recuperação na produção de IB não apresentou melhora na estabilidade da coloração ou do pH. Entretanto, a diminuição da concentração de carboidratos e proteínas no meio pode vir a resultar em um menor desbotamento do meio de recuperação após o uso do indicador biológico. Mais estudos devem ser realizados para se chegar a uma formulação com coloração mais estável e que mantenha as características desejadas de viabilidade e resistência térmica do produto quando submetidos a ciclos prolongados de esterilização ou temperaturas mais elevadas.

REFERENCIAS

- ALDERTON, G.; CHEN, J.K.; ITO, K. Effect of lysozyme on the recovery of heated *Clostridium botulinum* spores. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 3., p. 613-615, 1974.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R. de C. L. B.; FELIPE, M. das G. de A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, p. 52 a 63, 2007.
- BURKE, R. M.; TEMPEST, D. W. Growth of *Bacillus stearothermophilus* on glycerol in chemostat culture: expression of an unusual phenotype. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n.7, p. 1381-1385, 1990.
- CAZEMIER, A. E.; WAGENAARS, S. F. M.; STEEG, P.F. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 761-770, 2001.
- DE VRIES, Y.P. Minireview- The role of calcium in bacterial spore germination. **Microbes and Environments**, v. 19, n.3. p. 199-202, 2004.
- FUNG, D. Y. C.; MILLER, R. D. Effect of dyes on bacterial growth. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 793-799, 1973.
- KAISER, J. J. Culture media containing glycerol that are pH and color stable when heat sterilized. United States Patent 5968807. Rochester, NY. Outubro de 1999.
- LÓPEZ, M.; GONZÁLEZ, I.; MAZAS, M.; GONZÁLEZ, J.; MATIN, R.; BERNARDO, A. Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 32, n. 4, p. 305-311, 1997.
- MALLIDIS, C.G.; SCHOLEFIELD, J. Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, n.6, p. 517-523, V. 61, 517-523, 1986.
- MARQUIS, R.E.; SIM, J.; SHIN, S.Y. Molecular mechanism of resistance to heat and oxidative damage. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v.76, p. 40-48, 1994.
- SMITH, G. M.; KOPELMAN, M.; JONES, A; PFLUG, I. J. Effect of Environmental Conditions During Heating on Commercial Spore Strip Performance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 12-18, 1982.
- SASAKI, K.; SHINTANI, H.; ITOH, J.; KAMOGAWA, T.; KAJIHARA, Y. Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC7953 spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.12, p. 5509-5513, 2000.

SIMIONE, F. P. Cryopreservation manual. American Type Culture Collection (ATCC). Nalge Nunc International Corp. 15 p. 1998. Acesso em: 15 de abril de 2010. Disponível em:< <http://www.nalgenelabware.com/techdata/Technical/cryo.pdf>>

YOKOYA, F. e YORK, G. K. Effect of Several Environmental Conditions on the "Thermal Death Rate" of Endospores of Aerobic, Thermophilic Bacteria. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 993-999, 1965

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho realizou estudos em diferentes etapas da produção de indicador biológico para esterilização a vapor. Para que o IB obtenha um desempenho adequado quando utilizado pelo usuário, o produto como um todo (esporos e meio de recuperação) deve possuir características específicas. A principal etapa para a obtenção de um indicador biológico padronizado é a obtenção de esporos termorresistentes em quantidade suficiente para a realização do processo de produção.

Na figura 1 está representado um fluxograma com as principais etapas de produção do indicador biológico para a esterilização, e ao lado as contribuições deste trabalho para o processo.

Na etapa do preparo do inóculo foi proposto um novo meio de cultura contendo melaço de soja como fonte de carbono, um sub-produto da indústria de proteína concentrada de soja, esta matéria-prima possui baixo custo e existe disponibilidade no Estado do Paraná, devido ao grande volume processamento de soja neste Estado.

Na etapa de esporulação foi reduzido o tempo de incubação do meio padrão utilizado no CPPI de 12 para 1 dia. Também foi proposta a utilização de um meio de cultura formulado a base de vinhaça de soja. A vinhaça de soja é um resíduo da produção de etanol a partir da soja, cujo aproveitamento contribui para a menor geração de resíduos industriais e diminuição de problemas ambientais.

O estudo comparativo entre os diluentes usados na recuperação e armazenamento da suspensão de esporos foi proposto a utilização de solução de acetato de cálcio 0,02 M pH 9,7, que proporciona uma maior resistência térmica aos esporos obtidos.

Também foi determinada a concentração ideal do indicador de pH púrpura de bromocresol (entre $0,031 \text{ g.l}^{-1}$ e $0,016 \text{ g.l}^{-1}$) e realizado um estudo das variáveis que interferem na resistência térmica dos esporos durante a sua esporulação. Nesta última etapa os resultados demonstraram que o pH é a variável que exerce maior influência na resistência térmica dos esporos durante a sua esporulação. Concluiu-se também que meios de cultura com baixas concentrações de nutrientes fornecem esporos mais termorresistentes.

Foi estimado o custo dos meios produção de um lote de suspensão de esporos de *G. stearothermophilus* utilizando os meios padronizados pelo CPPI, e os meios desenvolvidos neste trabalho (Tabela 1). Considerou-se o volume de meio utilizado por lote de 1,6 litros (equivalente a 4 garrafas de Roux). O preço dos meios de cultura foi estimado com base em uma média de preços de diversas marcas encontradas no mercado. A utilização do meio desenvolvido utilizando matérias primas industrializadas (meio desenvolvido 1) ocasionaria uma redução de 27,9% de custos com matéria prima para os meios de produção. É possível a aplicação imediata deste meio na produção de Esteriteste, após sua validação. A utilização dos meios desenvolvidos neste trabalho utilizando melaço e vinhaça de soja (meio desenvolvido 2) causariam uma redução de 20,9% nos custos com matéria prima para os meios de produção. Vale ressaltar que a descrição da utilização de melaço e vinhaça de soja no cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* é inédita na literatura.

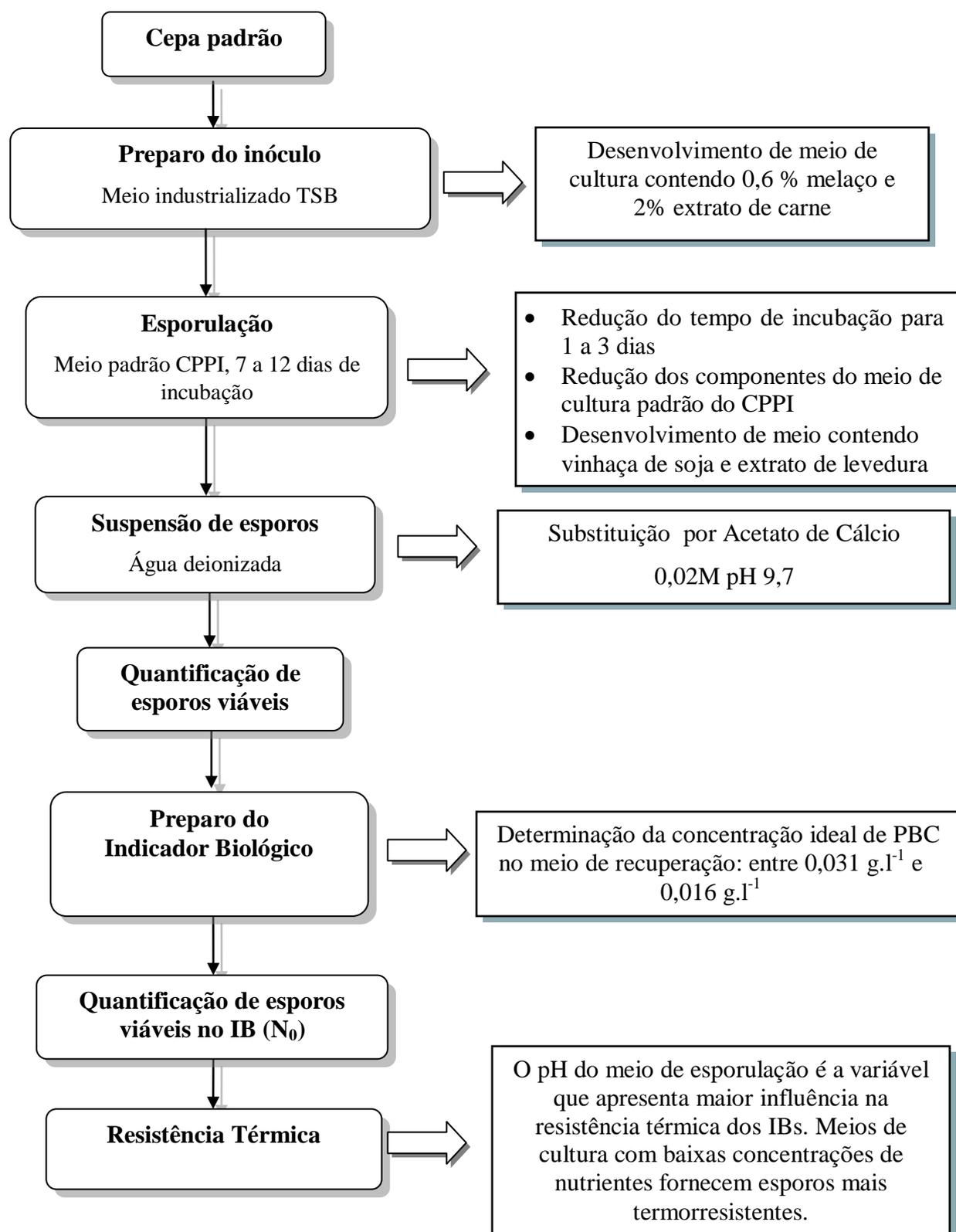


FIGURA 1 – FLUXOGRAMA COM AS PRINCIPAIS ETAPAS DE PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO E AS CONTRIBUIÇÕES DESTE TRABALHO PARA O PROCESSO.

TABELA 1 – CUSTO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE UM LOTE DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus*.

Matéria Prima	Preço*/kg (R\$)	Meio controle		Meio desenvolvido (1)		Meio desenvolvido (2)	
		g/lote	custo/lote (R\$)	g/lote	custo/lote (R\$)	g/lote	custo/lote (R\$)
Meio de Esporulação							
Extrato de Levedura	375	8	3	3,2	1,2	12,8	4,8
Peptona	563	4,8	2,7	-	-	-	-
Triptona	464	8	3,7	-	-	-	-
Extrato de Carne	115	4,8	0,552	1,6	1,184	-	-
Sulfato de Manganês	28	0,0608	0,0017	0,008	0,000224	-	-
Sulfato de Magnésio	23	0,08	0,0018	-	-	-	-
Cloreto de Cálcio	70	0,0544	0,0038	-	-	-	-
Fosfato de Potássio	30	0,08	0,0018	-	-	-	-
Ágar	493	32	15,8	32	15,8	32	15,8
Vinhaça de Soja	-	-	-	-	-	15	0
Inóculo							
TSB	188	2,25	0,42	2,25	0,42	-	-
Extrato de Carne	115	-	-	-	-	1,5	0,17
Melaço de Soja**	-	-	-	-	-	0,37	0
Custo Total			25,8		18,6		20,6

(1) Meio desenvolvido no capítulo 6, utilizando matéria prima industrializada. (2) Meios desenvolvidos nos capítulos 4 (inóculo) e 5 (esporulação). Preços obtidos a partir da média de orçamentos concedidos por empresas fornecedoras de insumos para laboratórios. Valores do ano de 2010.

** A vinhaça de soja é um resíduo e o melaço um sub-produto da indústria da soja, portanto é possível adquiri-las sem nenhum custo.

10 CONCLUSÕES

A primeira etapa de produção de esporos termorresistentes é o preparo do inóculo. Peptona, extrato de carne e triptona se mostraram fontes de nitrogênio adequadas para a formulação do meio de cultura. Uma formulação contendo 0,6% de melaço de soja e 2% de extrato de carne, que apresentou um crescimento médio de $4,5 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹, foi desenvolvida e aprovada para a utilização como inóculo na produção de esporos de *G. stearothermophilus*. Concluindo que o melaço de soja pode ser utilizado como matéria prima de baixo custo na formulação de meio de cultura para a produção de inoculo do *G. stearothermophilus*

No estudo da produção de esporos, concluiu-se que a técnica de fermentação em estado sólido não é adequada para a esporulação de *G. stearothermophilus*, pois nenhuma das matérias primas que foram testadas como suporte forneceu resultados satisfatórios. Dos meios industrializados testados o meio padronizado pelo CPPI na produção de Esteriteste (SELLA, 1995), foi o que apresentou melhor resultado, produzindo suspensões de esporos com concentrações cerca de 10^7 UFC.ml⁻¹, e valores de $D_{121^\circ\text{C}}$ de 3,3 minutos e U_{sk} de 13,6 minutos após apenas 24 horas de incubação.

Demonstrando a possibilidade da redução do tempo de esporulação de 12 dias para 24 horas. Também foi desenvolvido um novo meio de esporulação com formulação de vinhaça de soja, 1,5%; extrato de levedura, 0,8%; ágar, 2%. Os esporos produzidos, quando utilizados no preparo de um indicador biológico com meio de recuperação a base de vinhaça de soja, apresentaram valores de $D_{121^\circ\text{C}}$ e U_{sk} dentro dos parâmetros preconizados pela Farmacopéia Americana USP 29. Com isso desenvolveu-se um IB formulado com sub-produtos da soja que atende os pré-requisitos de produção. Concluindo que a utilização destes sub-produtos como matéria prima de baixo custo na produção de indicadores biológicos para esterilização é viável e que este produto atende a todos os requisitos e exigências normativas e legais.

Esta produção, ocasionaria uma redução de 20,9% nos custos com matéria prima para os meios de produção, quando comparado ao indicador biológico produzido com matéria prima industrializada.

No estudo da influência do processo de esporulação na resistência térmica dos esporos produzidos, concluiu-se que a adição dos sais inorgânicos MgSO₄,

CaCl₂, KH₂PO₄ ao meio de cultura influencia significativamente a resistência térmica dos esporos na formulação estudada e que meios de cultura com menores concentrações de nutrientes fornecem esporos mais resistentes ao calor úmido. A variável que apresentou maior influência no processo foi o pH, sendo que pHs alcalinos em torno de 8,5 contribuem para uma maior resistência dos esporos formados.

O estudo da suspensão e do armazenamento dos esporos em água deionizada e acetato de cálcio, demonstrou que o acetato de cálcio 0,02M pH 9,7 conferiu uma maior resistência ao calor úmido aos esporos de *G. stearothermophilus* quando comparada à água deionizada (valor médio de D_{121°C} de 2,3 minutos em água deionizada e 2,9 minutos em acetato de cálcio). Porém, com relação à viabilidade, ambos os diluentes apresentam resultados semelhantes. Concluindo-se que a adição de sais, a concentração de nutrientes, o pH do meio de esporulação, a solução de recuperação e armazenamento dos esporos exercem influência na resistência térmica destes ao calor úmido sob pressão. Essas variáveis devem ser levadas em consideração na produção de um IB que atenda aos parâmetros normativos e legais estabelecidos.

Foram estudados também alguns aspectos do meio de recuperação do indicador biológico. A concentração ideal do indicador de pH púrpura de bromocresol, foi determinada entre 0,031 g.l⁻¹ a 0,016 g.l⁻¹. A adição de glicerol não demonstrou qualquer influência nestas características do IB porém, a partir dos experimentos realizados foi possível verificar que a diminuição da concentração de carboidratos e proteínas no meio pode vir a resultar em um menor desbotamento do meio de recuperação após o uso do indicador biológico. Mais estudos devem ser realizados para a formulação de um meio de cultura que apresente menor desbotamento após o uso.

11 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, podem ser sugeridos ainda alguns experimentos a serem desenvolvidos:

- Realizar um estudo de estabilidade, no mínimo, um ano para avaliar a influência da água deionizada e da solução de acetato de cálcio na viabilidade e na resistência térmica dos esporos durante o seu armazenamento;
- Realizar mais estudos com o meio de recuperação do indicador biológico, para se chegar a uma formulação com coloração mais estável e que mantenha as características desejadas de viabilidade e resistência térmica do produto quando submetidos a ciclos prolongados de esterilização ou maiores temperaturas;
- Realizar análises do conteúdo de íons de esporos produzidos em diferentes meios de cultura (principalmente com diferentes pHs) para verificar se essa é a causa da variação da resistência térmica dos mesmos;
- Desenvolver um meio de cultura para produção de esporos que possibilite o desenvolvimento de um IB específico para validação de autoclaves.