SANDRA REGINA BARROSO RUÍZ SELLA

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DE *Bacillus atrophaeus*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Área de Concentração: Saúde Animal e Humana. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr.Carlos Ricardo Soccol
Co-orientadoras:
Profª Drª Adriane B.P. Medeiros
Profª Drª Luciana P. S. Vandenberghe

CURITIBA
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos
Setor de Tecnologia

UFPR

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Universidade Federal do Parana
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos

Aos três dias do mês de julho de 2008, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Vigésima Primeira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Animal e Humana. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós–Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Leon Rabinovitch (Fiocruz-RJ), José Rodriguèz Leon (Cuba), Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, e Carlos Ricardo Soccol (UFPR – orientador da dissertação).

Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando à candidata **Sandra Regina Barroso Ruiz Sella** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: "Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Esporos Termorresistentes do *Bacillus atrophalus*". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a argüição, a banca composta pelos professores Dr Leon Rabinovitch , Dr José Rodriguèz Leon, Drª Adriane Bianchi Pedroni Medeiros e Dr Carlos Ricardo Soccol, declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96), atribuindo LOUVOR pela qualidade do trabalho desenvolvido.

Curitiba, 03 de Julho de 2008.

Prof Dr Leon Rabinovitch

Prof Dr José Rodriguèz Leon

Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

Profª Drª Adriane B P Medeiros

AGRADECIMENTOS

Ao Governo do Estado do Paraná, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior e Secretaria de Estado da Saúde, pelo reconhecimento da importância do investimento na melhoria contínua da qualificação técnica e científica de seus profissionais, como garantia da oferta dos insumos essenciais à saúde e da redução da dependência internacional destes produtos.

À Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, representado pelo seu coordenador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, por aceitar a incumbência de fornecer conhecimentos específicos em resposta às demandas dos serviços públicos de saúde, transformando o saber em uma ferramenta para o beneficio direto da sociedade.

À Direção do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Dr.Rubens Gusso, pelo esforço e dedicação para que este nosso "sonho" em formar mestres e doutores no CPPI fosse concretizado.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, Prof. Dra. Luciana P. S. Vandenberghe e Prof. Dra Adriane B. P. Medeiros, pela orientação, pelas idéias, ensinamentos, críticas, sugestões, correções e principalmente pelo respeito e amizade.

Aos professores Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski, Dr.José Hermenio C. Lima Filho, Msc.Luiz Alberto Júnior Letti, Dr. Júlio Carvalho, Dra. Vanete Thomaz-Soccol, entre outros, por todos os ensinamentos, incentivo e apoio.

À IMCOPA e à COCAMAR- Cianorte pelo fornecimento das matérias-primas, e aos colegas Suzan, Marcos e Rafael por sempre disponibilizá-las.

Ao Fundo Paraná- SETI pelo financiamento da segunda parte deste trabalho.

Aos colegas de laboratório e de curso (Michele, Mitiyo, Cristine, Gisele, Daniel, Andréia, Silvana, Gessiel, Luiz Gustavo, Soraia, Sacha, Marlene, Suzan, entre outros) pelas dicas e contribuições.

A José Carlos Pereira Comink pelas orientações e apoio nas análises estatísticas.

A todos os amigos e funcionários do CPPI que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho, em especial à Neide e à Dirce pelo apoio nas

análises físico-químicas e pela revisão ortográfica deste trabalho; à Eva, Fátima, Shirley e Elizete que sempre se dispuseram a auxiliar na colocação de lacres, rotulagem, preparo de materiais, etc; Wilma pelo total apoio e empréstimo de equipamentos; Júlia, pela paciência com as "contaminações"; Regiane, Maria Inês, Shirley, Rosana e Adalgisa pelo incentivo; Bia, Rubens Gomes, Jô, Edeméia e Rosangela por agilizarem as compras e o fornecimento de materiais, João Carlos pelas discussões e revisões.

Ao grande "time" da Seção de Insumos do CPPI: Elza R. Mendes, Neuza de Araújo, Sonilda Soares, a amiga e companheira Regina F. Dlugokenski e os estagiários Cristiane Furie, Ana Paula, Regis, Wagner, Belquis e Kátia que tiveram grande participação e sem os quais todo este trabalho não teria sido realizado.

À Giovani pelo auxílio e suporte doméstico.

À minha família, Nélio, Bruno e Rúbia e minha mãe Rosemarie, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

A Deus por me permitir mais este aprendizado.

RESUMO

A esterilização é de fundamental importância no controle das infecções dos serviços de saúde. Falhas nesse processo podem levar à transmissão de doenças infecciosas. Para assegurar a eficiência da esterilização, as principais instituições normativas mundiais de saúde recomendam o uso rotineiro de Indicadores Biológicos (IB) para seu monitoramento, no Brasil esta é uma exigência legal. Os consultórios odontológicos, na sua grande maioria, utilizam o calor seco como principal método de esterilização. Pesquisas demonstram que a maioria destes serviços não atende a esta exigência devido ao alto custo e à dificuldade de aquisição destes IB. Esporos do *Bacillus atrophaeus* são recomendados como IB para esterilização por calor seco devido à sua alta resistência térmica. Na primeira etapa deste trabalho, utilizando meios de cultura sintéticos, foram investigados aspectos de rendimento de produção e de resistência térmica dos esporos, em função da composição dos meios de cultura do inóculo, meios de esporulação e recuperação, bem como do material do suporte. O tempo de incubação do inóculo foi padronizado em 18 horas; o meio constituído de extrato de levedura, 0,8%; caldo nutriente, 0,4%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005%; $CaCl_2.6H_2O$, 0,005% e ágar, 3,0%, foi o que apresentou a melhor relação produtividade x facilidade no preparo. O IB embalado em frasco com papelote como suporte apresentou maior resistência térmica e permitiu melhor visualização do produto. Objetivando uma maior estabilidade do produto, a solução de acetato de cálcio 0,02M foi escolhida como diluente. A concentração 0,0015% de azul de bromotimol, com a adição de 0,1% de amido no meio de recuperação, forneceram um $D_{160ºC}$, em média, 7,0% maior e um $U_{sk,160ºC}$, em média, 5,4% maior. Um lote experimental da suspensão de esporos e um lote experimental do IB foram produzidos, e os resultados ($U_{sk,160ºC}$ = 37,4 ± 1,5 min e $D_{160ºC}$ = 5,5 ± 0,3 min) atenderam aos critérios de qualidade preconizados pelas normas internacionais. Na segunda parte, foi desenvolvida metodologia de produção de esporos termorresistentes utilizando resíduos e subprodutos agroindustriais da soja e da cana-de-açúcar como substrato. Realizou-se a seleção das matérias-primas, da técnica de cultivo, do reator e a otimização das variáveis físicas, químicas e nutricionais do cultivo. No preparo do inóculo, o melaço de soja a 4,0%, adicionado de peptona a 4,0%, proporcionou biomassa entre 8,4 x 10^7 a 2,1 x 10^{10} UFC.mL^{-1}. A fermentação em estado sólido (FES) foi otimizada: bagaço de cana como suporte (1,0 mm como tamanho médio da partícula); melaço de soja a 2,0% e sais estimuladores da esporulação como substrato; 3% como taxa do inóculo (10^7 UFC.g^{-1} de matéria seca); umidade inicial de 93%; pH 8,0; água como diluente, tempo de incubação de 7 dias e saco plástico como reator, fornecendo 10^{10} UFC.g^{-1} de massa seca. Resultando em um acréscimo de até 3 log e propiciando uma redução de 50% do tempo de incubação em relação à produção em ágar. A análise da resistência térmica dos esporos produzidos forneceu um $D_{160ºC}$ = 5,2 ± 0,2 min, superior ao preconizado pela USP ($D_{160ºC}$ = 3,0 min).

Palavras-chave: *Bacillus atrophaeus*. Indicador Biológico. Esterilização. Esporos. Fermentação em estado sólido. Melaço de soja. Bagaço de cana.

ABSTRACT

Effective sterilization is important in avoiding cross-infections and the transmission of infectious diseases. The Health Services' current guidelines on infection control practices recommend regular biological monitoring of sterilizers for it is a legal requirement. Most dental and medical facilities still use dry heat sterilizers as a current practice. Researches have shown that only few dental offices apply biological monitoring of sterilization for its high cost is a hindrance to its widespread use. For dry heat sterilization, more specifically, *Bacillus atrophaeus* spores are recommended due to its high thermal resistance to this process. Aiming at developing a cost-effective product, in the first stage of this research, aspects of their production effectiveness and spore thermal resistance, different compositions of sporulation and recovery synthetics culture media, and the support spore material were evaluated. The inoculum incubation time was standardized as 18 hours, and the best cost/productivity relation sporulation medium was: yeast extract, 0.8%; nutrient broth, 0.4%; $MnSO_4.4H_2O$, 0.005%; $CaCl_2.6H2O$, 0.005% and agar, 3.0%. The inoculated strips put into sterile glass vial showed higher thermal resistance and allowed better product visualization. Calcium acetate solution 0.02 M was chosen as a diluent's in order to maintain the product's stability. Recovery medium with bromotimol blue, 0.0015 % and starch, 0.1%, provided a 7.0% higher $D_{160ºC}$ and a 5.4% higher $U_{sk,160ºC}$, on average. An experimental spore suspension batch was produced and the obtained results ($U_{sk,160ºC}$ = 37.4 ± 1.5 min and $D_{160ºC}$ = 5.5 ± 0.3 min) met the international quality standard criteria. In the second part, a methodology for thermal resistant spore production using soybean and sugar cane by-products was developed. Different substrates, fermentation techniques, and reactors were evaluated and chemical, physical, and nutrition characteristics of the culture were optimized. An optimized inoculum medium containing 4.0% soybean molasses and 4.0% casein peptone was similar in performance to a synthetic control medium resulting in 8.4 x 10^7 to 2.1 x 10^{10} $CFU.mL^{-1}$ of biomass. The SSF using sugar cane bagasse as support and soybean molasses 2.0%, supplemented with sporulation inductor salts, was the best technique and its variable optimum values were: particle size, 1.0 mm - mean; inoculum's size, 3% (10^7 $CFU.g^{-1}$ dry matter), moisture content, 93%; initial substrate pH, 8.0; water as a solution base, plastic bag as a reactor, and seven days as incubation time. The high-yield spore production was about 3 log higher as compared to the control agar medium, and 1 log increase over the first SSF study. The dry-heat resistance analysis gave a $D_{160ºC}$-value result (5.2 ± 0.2 min), higher than the one recommended by the USP ($D_{160ºC}$ = 3.0 min).

Key words: *Bacillus atrophaeus*. Bioindicator. Sterilization. Spores. Solid-state fermentation. Soybean molasses. Sugar cane bagasse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CICLO DE ESTERILIZAÇÃO EM ESTUFA SEM CIRCULAÇÃO DE AR..... 37
FIGURA 2 - CICLO DE ESTERILIZAÇÃO EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR..... 38
FIGURA 3 - DIFERENTES FORMAS DE APRESENTAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO..... 39
FIGURA 4 - DESENVOLVIMENTO DA TAXONOMIA DO GRUPO DO *Bacillus subtilis* 1980-2001..... 41
FIGURA 5 - FORMAS VEGETATIVAS DO *Bacillus atrophaeus* CORADAS PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM..... 42
FIGURA 6 - FORMAS VEGETATIVAS, ENDOSPOROS (ESPORÂNGIOS) E ESPOROS LIVRES DO *Bacillus atrophaeus* CORADOS POR SAFRANINA E VERDE MALAQUITA..... 42
FIGURA 7 - COLÔNIAS DO *Bacillus subtilis* - DIFERENTES EXPRESSÕES FENOTIPICAS 43
FIGURA 8 - FORMAÇÃO DE ESPOROS NAS BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus*..... 45
QUADRO 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESPOROS E DAS CÉLULAS VEGETATIVAS..... 45
FIGURA 9 - MICROFOTOGRAFIA DE UM ENDOSPORO DO *Bacillus subtilis* MOSTRANDO SUA ESTUTURA..... 47
FIGURA 10 - ULTRA-IMAGENS DEMONSTRANDO A FORMA E A SUPERFÍCIE DO ESPORO DO *Bacillus atrophaeus* (a) ESPORO HIDRATADO; (b) SUPERFÍCIE HIDRATADA; (c) SUPERFÍCIE DESIDRATADA..... 47
FIGURA 11 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO DIPICOLÍNICO (ÁCIDO PIRIDINA-2,6-DICARBOXÍLICO)..... 48
FIGURA 12 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA e "*D*" (TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL)..... 49
FIGURA 13 - GERMINAÇÃO DO ESPORO DE BACTÉRIA DO GÊNERO *Bacillus*..... 51
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS..... 53
FIGURA 15 - PREPARO DO INÓCULO: (A) REPIQUE ÚNICO; (B) DOIS REPIQUES..... 55
FIGURA 16 - CURVA DE CRESCIMENTO DO *Bacillus atrophaeus* EM TSB..... 58
FIGURA 17 - LOG FASE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Bacillus atrophaeus*..... 59
FIGURA 18 - BOX E WISKER PLOT DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO DO *Bacillus atrophaeus*..... 60
FIGURA 19 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A DETERMINAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO SUPORTE E DA EMBALAGEM NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DO IB..... 61

FIGURA 20 - INDICADOR BIOLÓGICO COMERCIAL UTILIZADO COMO REFERÊNCIA..... 65
FIGURA 21 - INDICADORES BIOLÓGICOS EM DIFERENTES SUPORTES E EMBALAGENS: PAPEL EM FRASCO; VIDRO E PAPEL EM ENVELOPE..... 67
FIGURA 22 - BOX E WISKER PLOT DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES SUPORTES E EMBALAGENS. 69
FIGURA 23 - LEI DE FOURIE DE TRANSMISSÃO DO CALOR..... 69
FIGURA 24 - INDICADOR BIOLÓGICO INOCULADO NO PAPEL E ACONDICIONADO EM FRASCO E INOCULADO NO FRASCO..... 70
FIGURA 25 - BOX E WISKER PLOT DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES DILUENTES..... 71
FIGURA 26 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA RECUPERAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR..... 74
FIGURA 27 - MEIO DE RECUPERAÇÃO, CONTENDO ESPOROS, COM DIFERENTES pH: (A) ANTES DA INCUBAÇÃO; (B) APÓS INCUBAÇÃO..... 79
FIGURA 28 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER (LSD) PARA O TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL(*D*) E O TEMPO DE MÉDIO MORTE (U_{SK}) FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE BROMOTIMOL NO MEIO DE RECUPERAÇÃO..... 80
FIGURA 29 - INTERFERÊNCIA DO AMIDO E DO INDICADOR DE pH NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO: (A) TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL-*D*; (B) TEMPO MÉDIO DE MORTE-U_{SK}. MEIO 1: PURPURA DE BROMOCRESOL+AMIDO; MEIO 2: AZUL DE BROMOTIMOL SEM AMIDO; MEIO 3: AZUL DE BROMOTIMOL+AMIDO..... 82
FIGURA 30 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CONTAGEM TOTAL DE ESPOROS VIÁVEIS..... 84
FIGURA 31 - BOX-E-WHISKER PLOT DA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DO *Bacillus atrophaeus*: (A) SUSPENSÃO DE ESPOROS; (B) INDICADOR BIOLÓGICO 89
FIGURA 32 - RELAÇÃO: CONTAGEM DE COLÔNIAS SEM TRATAMENTO TÉRMICO/ APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, DO *Bacillus atrophaeus*, POR TEMPO DE PRODUÇÃO: (1)13 DIAS; (2) 22 DIAS; (3) 330DIAS..... 90
FIGURA 33 - CONTAGEM DE COLÔNIAS: (A) *POUR-PLATE*; (B)SEMEADURA EM SUPERFÍCIE..... 92
FIGURA 34 - INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO:PRIMEIRO LOTE EXPERIMENTAL..... 98
FIGURA 35 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*..... 99

FIGURA 36 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO..... 100

FIGURA 37 - (A) PREPARO DAS FITAS; (B) INOCULAÇÃO NOS PAPELOTES; (C) ENVASE DO MEIO DE RECUPERAÇÃO; (D) ENVASE DOS PAPELOTES INOCULADOS; (E) COLOCAÇÃO DE LACRES; (F) PRODUTO EM QUARENTENA (AGUARDANDO LIBERAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE)..... 101
FIGURA 38 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL DE CANA-DE-AÇÚCAR..... 107
FIGURA 39 - BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR..... 108
FIGURA 40 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL DE SOJA. 113
QUADRO 2 - COMPARAÇÃO ENTRE A FERMENTAÇÃO SUBMERSA E A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO..... 119
FIGURA 41 - FAIXA DA A_w PARA O CRESCIMENTO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS..... 121
FIGURA 42 - BIORREATOR DE 40 L PARA CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO, COM SISTEMA DE MONITORAMENTO E CONTROLE DE PROCESSO..... 124
FIGURA 43 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES EM ÁGAR ENRIQUECIDO COM SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: (A) PRIMEIRA ETAPA; (B) SEGUNDA ETAPA..... 128
FIGURA 44 - DIFERENTES MEIOS DE ESPORULAÇÃO: (A) REFERÊNCIA; (B,D) COM MELAÇO DE SOJA; (C,E) COM VINHAÇA DE SOJA.... 130
FIGURA 45 - MELAÇO DE SOJA..... 132
FIGURA 46 - ESPORULAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (1) REFERÊNCIA; (2) MELAÇO DE SOJA COM FÓSFORO E MANGANÊS; (3) MELAÇO DE SOJA 2% COM SAIS ESTIMULADORES DA ESPORULAÇÃO..... 134
FIGURA 47 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER DA CONTAGEM DE COLÔNIAS DE SUSPENSÕES DE ESPOROS DO B*acillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (1) TSA-REFERÊNCIA; (2) MELAÇO DE SOJA E TRIPTONA; (3) MELAÇO DE SOJA 2%; (4) VINHAÇA DE SOJA E EXTRATO DE LEVEDURA (5) MELAÇO DE SOJA E PEPTONA DE CASEÍNA..... 135
FIGURA 48 - BOX E WISKER PLOT DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO *Bacillus atrophaeus* OBTIDAS NOS MEIOS: REFERÊNCIA (TSA) E ÁGAR MELAÇO 2,0% 137
FIGURA 49 - RESISTÊNCIA TÉRMICA AO CALOR SECO, 160ºC (D e U_{sk}) DOS ESPOROS OBTIDOS COM OS MEIOS: (1) REFERÊNCIA-TSA; (2) MELAÇO DE SOJA COM FÓSFORO E MANGANÊS; (3) MELAÇO DE SOJA 2,0% COM SAIS..... 138
FIGURA 50 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS..... 140

.

FIGURA 51 - SECAGEM DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR EM ESTUFA... 144
FIGURA 52 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM FRASCO ERLENMEYER COM DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS..... 145

FIGURA 53 - BAGAÇO DE CANA LAVADO, SECO E TAMIZADO PARA USO EM FES..... 147
FIGURA 54 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM DIFERENTES SUBSTRATOS E TAMANHOS DE PARTÍCULA, 9 E 14 DIAS DE INCUBAÇÃO: (1) SUBSTRATOS INDUSTRIALIZADOS; (4) MELAÇO DE SOJA 2,0% COM SAIS ESTIMULADORES..... 150
FIGURA 55 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES..... 152
FIGURA 56 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*..... 160
FIGURA 57 - PERFIS DE DESEJABILIDADE EM TERMOS DAS VARIÁVEIS CODIFICADAS NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* EM VALORES ÓTIMOS..... 160
FIGURA 58 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS DA PARTÍCULA E DO pH NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 162
FIGURA 59 - PERFIS DE DESEJABILIDADE EM TERMOS DAS VARIÁVEIS CODIFICADAS,TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E Ph, NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* EM VALORES ÓTIMOS..... 163
FIGURA 60 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTORNO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS EM FUNÇÃO DA UMIDADE E DO pH..... 164
FIGURA 61 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* COM: (1) CLORETO DE CÁLCIO/ ÁGUA DEST.; (2) CARBONATO DE CÁLCIO/ ÁGUA DEST.; (3) FOSFATO DE CÁLCIO/ ÁGUA DEST.; (4) CLORETO DE CÁLCIO/ TAMPÃO; (5) CARBONATO DE CÁLCIO/ TAMPÃO; (6) FOSFATO DE CÁLCIO/ TAMPÃO..... 166
FIGURA 62 - RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PREPARADOS COM DIFERENTES MÉTODOS: (1) FES; (2) ESPORULAÇÃO EM ÁGAR..... 167
FIGURA 63 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA O DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO INÓCULO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS..... 169
FIGURA 64 - CRESCIMENTO DO *Bacillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (TSB-referência); (1) MELAÇO DE SOJA E PEPTONA; (2) VINHAÇA DE SOJA E EXTRATO DE CARNE; (3) VINHAÇA DE CANA E EXTRATO DE LEVEDURA; (4) MELAÇO DE SOJA 1/50 ; (5) MELAÇO DE SOJA 1/60; (6) VINHAÇA DE CANA; (7) VINHAÇA DE SOJA..... 175

FIGURA 65 - BOX E WISKER PLOT DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO DO *Bacillus atrophaeus* CULTIVADO EM RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS..... 176
FIGURA 66 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER PARA BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus* (EM % DE MELAÇO DE SOJA E PEPTONA) : m1 (4/4); m2 (4/1); m3 (1/4); m4 (1/1); m5 (2,5/2,5-=pto central)..... 177
FIGURA 67 - GRÁFICO DE PARETO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus,* EM FUNÇÃO DO TESTE *t*..... 178
FIGURA 68 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO DE CULTIVO NA BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus*..... 178
FIGURA 69 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE INÓCULO: (1, 2, 3) MELAÇO DE SOJA MAIS PEPTONA; (4) TSB; (5) TSB/ÁGAR (REFERÊNCIA)..... 180
FIGURA 70 - RESISTÊNCIA TÉRMICA (D_{160^oC}) DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PRODUZIDOS POR FES A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE INÓCULO: (1, 2, 3) MELAÇO DE SOJA MAIS PEPTONA; (4) TSB; (5)TSB/ÁGAR (REFERÊNCIA)..... 181
FIGURA 71 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO, DO TIPO DE REATOR, DO MEIO DO INÓCULO E DA CONCENTRAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA NA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS POR FES: (A) PRIMEIRA ETAPA; (B) SEGUNDA ETAPA..... 183
FIGURA 72 - COLUNAS DE RAIMBAULT PREENCHIDAS COM O SUBSTRATO INOCULADO..... 185
FIGURA 73 - SISTEMA DE FES EM COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA..... 186
FIGURA 74 - GRÁFICO DE PARETO DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* 193
FIGURA 75 - PRINCIPAIS EFEITOS DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* 194
FIGURA 76 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* : AERAÇÃO X UMIDADE..... 196
FIGURA 77 - FES EM FRASCO ERLENMEYER E EM SACO PLÁSTICO AUTOCLAVÁVEL..... 197
FIGURA 78 - GRÁFICO DE PARETO DA INFLUÊNCIA DO REATOR, SUBSTRATO, MEIO DO INÓCULO E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*..... 198
FIGURA 79 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* : (A) EM FRASCO ERLENMEYER COM INÓCULO EM TSB; (B) EM FRASCO ERLENMEYER COM INÓCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA;(C) EM SACO DE POLIETILENO COM INÓCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA..... 202
FIGURA 80 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* x CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS: (A) EM FRASCO ERLENMEYER COM INOCULO EM TSB; (B) EM FRASCO ERLENMEYER COM INOCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA; (C) EM SACO DE POLIETILENO COM INOCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA..... 203

FIGURA 81 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus,* FORMAÇÃO DE: BIOMASSA, ESPOROS, CÉLULAS VEGETATIVAS E CONSUMO DE CARBOIDRATOS..... 205
FIGURA 82 - COLÔNIAS DO *Bacillus atrophaeus* EM TSA: (A) INOCULADO COM ESPOROS PRODUZIDOS EM ÁGAR DE ESPORULAÇÃO; (B) INOCULADO COM ESPOROS PRODUZIDOS POR FES; (C) EM TSA ADICIONADO DE MAIS 2% DE ÁGAR BACTERIOLÓGICO E INOCULADO COM ESPOROS PRODUZIDOS POR FES..... 206
FIGURA 83 - OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE CÉLULAS DIFERENTES COLÔNIAS DO: *Bacillus subtilis* (A) CÉLULAS ISOLADAS; (B) CÉLULAS EM CADEIA; *Bacillus atrophaeus* (C) CÉLULAS ISOLADAS; (D) CÉLULAS EM CADEIA..... 207
FIGURA 84 - CULTIVOS DE 72 HORAS DO *Bacillus atrophaeus* EM TSB INOCULADO COM SUSPENSÃO DE ESPOROS PRODUZIDOS: (A) EM ÁGAR; (B) POR FES 208

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TIPO DE ESTERILIZADORES DISPONÍVEIS NOS SERVIÇOS PÚBLICOS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, EM MARÇO 2007 30

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS RECOMENDADAS E OBSERVADAS DA POPULAÇÃO E RESISTÊNCIA TÉRMICA DO IB PARA CALOR SECO (160ºC) 50

TABELA 3 - PRODUÇÃO DE CÉLULAS VEGETATIVAS DO *Bacillus atrophaeus* PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO COM; REPIQUE ÚNICO E DOIS REPIQUES 59

TABELA 4 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SINTÉTICOS 61

TABELA 5 - TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL (*D*) E TEMPO MÉDIO DE MORTE (U_{sk}) POR SUPORTE / EMBALAGEM E DILUENTE DOS ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* 67

TABELA 6 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES DILUENTES, SUPORTES E EMBALAGENS 68

TABELA 7 - TESTE *t*-STUDENT DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES APRESENTAÇÕES 68

TABELA 8 - TESTE *t*-STUDENT E TESTE F DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM SUSPENSÕES DE ESPOROS EM DIFERENTES DILUENTES 70

TABELA 9 - INDICADORES BIOLÓGICOS UTILIZADOS NOS TESTES PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE RECUPERAÇÃO 75

TABELA 10 - VIABILIDADE DOS ESPOROS DO *Bacillus Atrophaeus* APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE BROMOTIMOL E EM DIFERENTES pH 78

TABELA 11 - INTERFERÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AZUL DE BROMOTIMOL NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Bacillus .atrophaeus* 79

TABELA 12 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* RECUPERADOS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE BROMOTIMOL 79

TABELA 13 - TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL (*D*) E TEMPO MÉDIO DE MORTE (U_{SK}) x MEIOS DE RECUPERAÇÃO: (1)CPPI; (2) AZUL DE BROMOTIMOL; (3) AZUL DE BROMOTIMOL+AMIDO 80

TABELA 14 - TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL (*D*) E TEMPO MÉDIO DE MORTE (U_{SK}) X MEIOS DE RECUPERAÇÃO: (1)PURPURA DE BROMOCRESOL +AMIDO; (2) AZUL DE BROMOTIMOL; (3) AZUL DE BROMOTIMOL+AMIDO..... 81
TABELA 15 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*, SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, PELO MÉTODO DE *POUR PLATE*..... 87
TABELA 16 - CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS INDICADORES BIOLÓGICOS, SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, PELO MÉTODO DE *POUR-PLATE*..... 88
TABELA 17 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*, COM DIFERENTES TEMPOS DE PRODUÇÃO, SEM E APÓS CHOQUE TÉRMICO..... 90
TABELA 18 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus,* POR SEMEADURA ATRAVÉS DE: *POUR-PLATE* E MICROGOTAS EM SUPERFÍCIE..... 91
TABELA 19 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA ÚMIDA..... 109
TABELA 20 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA SECA..... 110
TABELA 21 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MATERIAL ORGÂNICO: BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR..... 111
TABELA 22 - COMPOSIÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR..... 112
TABELA 23 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO MELAÇO DE SOJA..... 113
TABELA 24 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DA VINHAÇA DE SOJA..... 114
TABELA 25 - DIFERENTES COMPOSIÇÕES DOS MEIOS CONTENDO RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* EM ÁGAR..... 129
TABELA 26 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MELAÇO DE SOJA E DA VINHAÇA DE SOJA..... 133
TABELA 27 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS CONTENDO SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM ÁGAR..... 133
TABELA 28 - CONTAGEM DE COLÔNIAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (1) TSA-REFERÊNCIA; (2) MELAÇO DE SOJA E TRIPTONA; (3) MELAÇO DE SOJA 2%; (4) VINHAÇA SOJA E EXTRATO DE LEVEDURA; (5) MELAÇO DE SOJA E PEPTONA DE CASEÍNA, POR SEMEADURA EM SUPERFÍCIE..... 135
TABELA 29 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DO *Bacillus atrophaeus* NOS MEIOS: TSA E ÁGAR MELAÇO..... 136
TABELA 30 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA SEM AGITAÇÃO..... 146
TABELA 31 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM AGITAÇÃO..... 147
TABELA 32 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA SECA..... 148

TABELA 33 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FES COM DIFERENTES SUBSTRATOS..... 149
TABELA 34 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA 1.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 154
TABELA 35 - DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONADO $2^{(5-2)}$ - 1.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 154
TABELA 36 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA 2.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 155
TABELA 37 - DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 - 2.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 155
TABELA 38 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 155
TABELA 39 - BOX-BEHNKEN DESING 3^2 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 156
TABELA 40 - DELINEAMENTO DOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA FONTE DE CÁLCIO E DO DILUENTE DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 156
TABELA 41 - RESULTADOS DA 1.ª AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES 158
TABELA 42 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS DE DIFERENTES VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 159
TABELA 43 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E DO pH NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 161
TABELA 44 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS DA PARTÍCULA E DO pH NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 161
TABELA 45 - RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DO pH E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES.... 163
TABELA 46 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O pH E UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 164
TABELA 47 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA FONTE DE CÁLCIO E DO DILUENTE DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 165
TABELA 48 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A FONTE DE CÁLCIO E DO DILUENTE..... 165
TABELA 49 - CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NOS COMPONENTES E SUPLEMENTOS DOS MEIOS DE CULTURA (SUBSTRATOS)..... 170
TABELA 50 - FORMULAÇÕES TESTADAS PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO DO *Bacillus atrophaeus*..... 170

TABELA 51 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO..... 172
TABELA 52 - DELINEAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL $2^{(2-0)}$ - OTIMIZAÇÃO DO INÓCULO..... 172
TABELA 53 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO..... 172
TABELA 54 - DELINEAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL 2^2 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO..... 173
TABELA 55 - RESULTADOS, EM UFC.mL $^{-1}$, DA OTIMIZAÇÃO DO INÓCULO. 177
TABELA 56 - CONCENTRAÇÃO DA PEPTONA DE CASEÍNA x BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus*..... 178
TABELA 57 - PRODUTIVIDADE E RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE INÓCULO..... 179
TABELA 58 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE FONTE DE $D_{160ºC}$..... 180
TABELA 59 - VALORES UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO FATORIAL DO 1º ENSAIO DA FES EM COLUNA..... 187
TABELA 60 - DELINEAMENTO FATORIAL DO 1.º ENSAIO DA FES EM COLUNA..... 187
TABELA 61 - VALORES UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO FATORIAL DO 2.º ENSAIO DA FES EM COLUNA..... 188
TABELA 62 - DELINEAMENTO FATORIAL DO 2º ENSAIO DA FES EM COLUNA..... 188
TABELA 63 - PARÂMETROS DO DELINEAMENTO FATORIAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA % DE MELAÇO E DO TEMPO, POR MEIO DO INÓCULO E REATOR NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 189
TABELA 64 - DELINEAMENTO DOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EFEITO DA % DE MELAÇO E DO TEMPO, POR MEIO DO INÓCULO E REATOR NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES..... 189
TABELA 65 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM COLUNA: PRIMEIRO ENSAIO..... 193
TABELA 66 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM ERLENMEYER: PRIMEIRO ENSAIO..... 194
TABELA 67 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM COLUNA: SEGUNDO ENSAIO..... 195
TABELA 68 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O EFEITO DA AERAÇÃO E DA UMIDADE: SEGUNDO ENSAIO..... 195
TABELA 69 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM ERLENMEYER: SEGUNDO ENSAIO..... 196
TABELA 70 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES COM VARIAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPO DE INCUBAÇÃO ,POR MEIO DO INÓCULO E TIPO DE REATOR..... 197

TABELA 71 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O EFEITO DA VARIAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPO DE INCUBAÇÃO ,POR MEIO DO INÓCULO E TIPO DE REATOR..... 198
TABELA 72 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES COM VARIAÇÃO DO REATOR: ALTERAÇÃO DO pH,CONSUMO DE CARBOIDRATOS E UMIDADE..... 199
TABELA 73 - 1ª CINÉTICA DE ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus:* BIOMASSA TOTAL, ESPOROS, CÉLULAS VEGETATIVAS E CARBOIDRATOS..... 200
TABELA 74 - 2ª CINÉTICA DE ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus:* UMIDADE, ATIVIDADE DE ÁGUA, BIOMASSA TOTAL, ESPOROS, CÉLULAS VEGETATIVAS E CARBOIDRATOS..... 200
TABELA 75 - 3ª CINÉTICA DE ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus*: UMIDADE, ATIVIDADE DE ÁGUA, BIOMASSA TOTAL, ESPOROS, CÉLULAS VEGETATIVAS E CARBOIDRATOS..... 201
TABELA 76 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus:* VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL (r_X); VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DE ESPOROS (r_P); VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DE CÉLULAS VEGETATIVAS (r_C) E VELOCIDADE DE CONSUMO DE CARBOIDRATOS(r_S)..... 204
TABELA 77 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS POR FES E POR CULTIVO EM ÁGAR PARA ESPORULAÇÃO, PARA CONFECÇÃO DE 200.000 UNIDADES DE IB..... 211

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
1.1 OBJETIVO GERAL 32
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33
1ª PARTE
2 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA USO NA ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO UTILIZANDO MEIOS DE CULTIVO INDUSTRIALIZADOS 34
2.1 REVISÃO DE LITERATURA 34
2.1.1 Esterilização 34
2.1.1.1 Esterilização pelo calor seco 35
2.1.1.2 Mecanismo de ação da esterilização pelo calor seco 36
2.1.1.3 Monitoramento biológico 38
2.1.1.4 Indicador biológico para esterilização 39
2.1.2 O gênero *Bacillus* 40
2.1.3 *Bacillus atrophaeus* 42
2.1.4 Fisiologia da esporulação 43
2.1.5 Estrutura e propriedades dos esporos 45
2.1.6 Resistência térmica 46
2.1.7 Germinação 50
2.2 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO COM MEIOS INDUSTRIALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* 52
2.2.1 Introdução 52
2.2.2 Material e métodos 53
2.2.2.1 Microrganismo 54
2.2.2.2 Determinação da fase logarítmica de crescimento 54
2.2.2.3 Preparo do inóculo 55
2.2.2.3.1 Dois repiques 55
2.2.2.3.2 Repique único 56
2.2.2.4 Meios de esporulação 56
2.2.2.5 Monitoramento da esporulação 57
2.2.2.6 Preparo da suspensão de esporos 57
2.2.2.7 Quantificação 57
2.2.3 Resultados e discussões 57
2.3 INTERFERÊNCIA DO SUPORTE E DA EMBALAGEM NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DO INDICADOR BIOLÓGICO 62
2.3.1 Introdução 62
2.3.2 Material e métodos 63
2.3.2.1 Microrganismo 63
2.3.2.2 Inóculo 63
2.3.2.3 Suspensão de esporos 64
2.3.2.4 Indicadores biológicos 64
2.3.2.5 Meio de recuperação 65
2.3.2.6 Resistência térmica 66
2.3.3 Resultados e discussões 66

2.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO PARA RECUPERAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR 72
2.4.1 Introdução 72
2.4.2 Material e métodos 74
2.4.2.1 Microrganismo 74
2.4.2.2 Determinação da concentração inibidora mínima do azul de bromotimol 74
2.4.2.3 Indicadores biológicos 75
2.4.2.4 Interferência da concentração de azul de bromotimol 76
2.4.2.5 Interferência do amido 76
2.4.2.6 Contagem do número de células viáveis 76
2.4.2.7 Resistência térmica 76
2.4.3 Resultados e discussões 77
2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CONTAGEM TOTAL DE ESPOROS VIÁVEIS EM INDICADORES BIOLÓGICOS, PARA SUBSTITUIÇÃO DA METODOLOGIA OFICIAL (USP) 83
2.5.1 Introdução 83
2.5.2 Material e métodos 84
2.5.2.1 Inóculo 84
2.5.2.2 Esporulação 85
2.5.2.3 Preparo dos indicadores biológicos 85
2.5.2.4 Contagem total do número de esporos viáveis 86
2.5.2.5 Choque térmico 86
2.5.3 Resultados e discussões 86
2.6 PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO 93
2.6.1 Introdução 93
2.6.2 Material e métodos 94
2.6.2.1 Elaboração dos documentos 94
2.6.2.2 Produção do primeiro lote experimental 94
2.6.2.3 Validação do tempo de incubação para leitura 94
2.6.2.4 Estudo de estabilidade 95
2.6.3 Resultados e discussões 95
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 102
2.8 CONCLUSÃO 102
2ª PARTE
3.0 DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DO *Bacillus atrophaeus* UTILIZANDO SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS 106
3.1 REVISÃO DE LITERATURA 106
3.1.1 Subprodutos e resíduos agroindustriais 106
3.1.2 Resíduos da produção do álcool de cana-de-açúcar 107
3.1.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar 108
3.1.2.2 Vinhaça de cana 111
3.1.3 Subprodutos e resíduos do processamento da soja 112
3.1.4 Fermentação em estado sólido (FES) 114
3.1.4.1 Conceito 114
3.1.4.2 Histórico 115
3.1.4.3 Aplicações 115
3.1.4.4 Características 116
3.1.4.5 Microrganismos 116

3.1.4.6 Suporte e substrato..... 117
3.1.4.7 Vantagens..... 118
3.1.4.8 Parâmetros..... 118
3.1.4.8.1 Fontes de carbono e relação C /N..... 119
3.1.4.8.2 Temperatura..... 120
3.1.4.8.3 Umidade e atividade de água (A_w)..... 120
3.1.4.8.4 pH..... 121
3.1.4.8.5 Agitação e aeração..... 122
3.1.4.8.6 Tamanho da partícula..... 123
3.1.4.8.7 Tipos de reator 123
3.1.5 Cultivo de *Bacillus sp* em substratos complexos..... 124
3.1.6 Cultivo de *Bacillus sp* através de FES..... 125
3.2 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DO *Bacillus atrophaeus* EM AGAR ENRIQUECIDO COM SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS..... 127
3.2.1 Introdução..... 127
3.2.2 Material e métodos..... 128
3.2.2.1 Inóculo..... 129
3.2.2.2 Esporulação..... 129
3.2.2.3 Quantificação..... 130
3.2.2.4 Preparo do indicador biológico..... 131
3.2.2.5 Resistência térmica..... 131
3.2.2.6 Caracterização físico-química do melaço e da vinhaça de soja..... 131
3.2.3 Resultados e discussões..... 132
3.3 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* COM SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS..... 139
3.3.1 Introdução..... 139
3.3.2 Material e métodos..... 140
3.3.2.1 Microrganismo..... 140
3.3.2.2 Inóculo..... 140
3.3.2.3 Meio de esporulação de referência..... 141
3.3.2.4 Preparo da suspensão de esporos..... 141
3.3.2.5 Monitoramento da esporulação..... 141
3.3.2.6 Quantificação..... 142
3.3.2.7 Esporulação pela técnica de fermentação submersa..... 142
3.3.2.8 Esporulação pelo técnica de fermentação em estado sólido..... 143
3.3.2.9 Determinação da composição centesimal do bagaço de cana..... 145
3.3.3 Resultados e discussões..... 146
3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DO *Bacillus atrophaeus* 151
3.4.1 Introdução..... 151
3.4.2 Material e métodos..... 152
3.4.2.1 Microrganismo..... 152
3.4.2.2 Inóculo..... 152
3.4.2.3 Fermentação em estado sólido..... 153
3.4.2.4 Avaliação dos efeitos das variáveis independentes: primeira etapa..... 153
3.4.2.5 Avaliação dos efeitos das variáveis independentes: segunda etapa..... 154
3.4.2.6 Otimização: pH x umidade inicial..... 155
3.4.2.7 Efeito das fontes de cálcio e do diluente do substrato..... 156

3.4.2.8 Preparo da suspensão de esporos..... 156
3.4.2.9 Quantificação..... 157
3.4.2.10 Preparo do indicador biológico..... 157
3.4.2.11 Resistência térmica..... 157
3.4.3 Resultados e discussões..... 158
3.5 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INFLÊNCIA DO INÓCULO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS POR FES..... 168
3.5.1 Introdução..... 168
3.5.2 Material e métodos..... 169
3.5.2.1 Microrganismo..... 169
3.5.2.2 Meios de cultivo..... 170
3.5.2.3 Preparo do Inóculo..... 171
3.5.2.3.1 Primeiro ensaio (dois repiques)..... 171
3.5.2.3.2 Segundo ensaio (repique único)..... 171
3.5.2.3.3 Meio de referência..... 171
3.5.2.4 Otimização..... 172
3.5.2.5 Influência da concentração de peptona..... 172
3.5.2.6 Quantificação do crescimento..... 173
3.5.2.7 Esporulação..... 173
3.5.2.8 Preparo da suspensão de esporos..... 174
3.5.2.9 Preparo do indicador biológico..... 174
3.5.2.10 Resistência térmica..... 174
3.5.3 Resultados e discussões..... 175
3.6 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E DO TIPO DE REATOR NA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS POR FES..... 182
3.6.1 Introdução..... 182
3.6.2 Material e métodos..... 183
3.6.2.1 Fermentação em estado sólido..... 183
3.6.2.1.1 Colunas com aeração forçada..... 183
3.6.2.1.2 Efeito da umidade inicial e da aeração: primeiro ensaio..... 186
3.6.2.1.3 Efeito da umidade inicial e da aeração: segundo ensaio..... 187
3.6.2.2 Sacos de polietileno..... 188
3.6.2.3 Umidade e atividade de água (A_w)..... 190
3.6.2.4 pH..... 190
3.6.2.5 Cinética..... 190
3.6.2.6 Preparo da suspensão de esporos..... 191
3.6.2.7 Quantificação da biomassa..... 191
3.6.2.8 Dosagem de açúcares totais..... 191
3.6.3 Resultados e discussões..... 191
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 209
3.8 DIMENSIONAMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS..... 209
3.8.1 FES..... 209
3.8.2 Cultivo em ágar..... 210
3.9 CONCLUSÂO..... 211
4.0 PRODUÇÃO CIENTÍFICA..... 216
4.1 RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS..... 216
4.2 TRABALHOS COMPLETOS APRESENTADOS EM CONGRESSO..... 217
4.3 TRABALHOS PUBLICADOS..... 217
4.4 PROPRIEDADE INTELECTUAL..... 217

4.5 OUTROS..... 217
REFERÊNCIAS..... 218
ANEXOS..... 235

1.0 INTRODUÇÃO

A esterilização é conceituada como um processo validado para a obtenção de um produto ou artigo livre de todas as formas viáveis de microrganismos (ABNT, 2001). Embora os processos de esterilização tenham mudado consideravelmente desde os primeiros trabalhos feitos por Pasteur e Koch e sofisticados mecanismos tecnológicos tenham sido desenvolvidos para monitorar e assegurar a esterilização, o calor ainda é o agente mais utilizado para a eliminação de microrganismos de artigos médico-hospitalares, odontológicos e laboratoriais.

Estes produtos não podem ser considerados estéreis apenas por terem sido submetidos a um processo de esterilização com tempo e temperatura controlados, por não levar em consideração a carga microbiana (quantidade e características), o efeito do ambiente (presença de proteínas, pH e concentração de íons), a resistência térmica dos microrganismos presentes no material e também a distribuição homogênea e o acesso do agente esterilizante. Como o nível de esterilidade absoluta não pode ser garantido, considera-se que este é um conceito probabilístico. Estes produtos são considerados estéreis quando a probabilidade de sobrevivência de microrganismos viáveis esteja na ordem de 10^{-6}. Este nível de esterilidade recebe a designação de *Probability of a Non-Sterile Unit* (PNSU) ou, no âmbito industrial, de *Sterile Assurance Level* (SAL) (PFLUG, 1999; BLOCK, 2001).

Um programa de esterilidade assegurada envolve três ferramentas:

a) Controles mecânicos e eletrônicos de temperatura, que incluem desde a utilização de termômetro calibrado, com certificado rastreável pelo INMETRO, até o uso de termopares microprocessados, com emissão de gráficos em tempo real e sistema de alarme de alteração de temperatura;
a) Indicadores químicos, que incluem desde aqueles de uso externo, que diferem visualmente os artigos processados dos não processados, aos indicadores de multi-parâmetros;
b) Indicadores Biológicos (IB), para monitoramento do processo.

O monitoramento biológico dos processos de esterilização é um dos requisitos imprescindíveis no controle da infecção hospitalar. Esta já é uma prática exigida pelas autoridades sanitárias e inserida na rotina da grande maioria dos hospitais.

Indicador biológico de um processo de esterilização é um produto utilizado, principalmente pelos serviços de saúde e indústria de artigos médico-hospitalar, para acompanhar os itens a serem esterilizados por todo o processo e monitorar a adequação desta esterilização. Consiste em um número conhecido de microrganismos viáveis, geralmente esporos, com resistência determinada ao processo de esterilização, acondicionados em um suporte e com uma embalagem protetora. O posterior crescimento ou morte do microrganismo, após sua incubação em meio e temperatura determinados, indicará se as condições da esterilização foram adequadas (FDA, 2001).

A odontologia executa uma grande variedade de procedimentos, que incluem desde um simples exame até uma cirurgia mais complexa. Estes procedimentos implicam em contato dos instrumentais com secreções da cavidade oral, sangue, secreções respiratórias e aerossóis, resultando em possibilidade de contaminação cruzada. Entre as infecções que podem ser transmitidas são citadas: gripe, pneumonia, sinusite, faringite, tuberculose, varicela, rubéola, herpes, infecções gonocócicas (ulcerações nos lábios, gengivite e inflamação nas mucosas), sífilis (lesões na língua, mucosas e palato), tétano, AIDS e hepatites viróticas (MAYBAUM, 2004). A atividade do cirurgião-dentista expõe seus pacientes, sua equipe, ele próprio e seus familiares a um universo microbiano altamente agressivo. Apesar dos sérios riscos de contágio de doenças graves, grande parte dos profissionais ainda mostra-se resistente à adoção de medidas de controle de infecção (BORGES, 2004).

A esterilização é ponto crucial no controle de infecção do consultório (APCD, 2000). Todos os materiais e instrumentos críticos devem ser esterilizados. Os instrumentos cirúrgicos não são descartáveis e também o alto custo dos artigos descartáveis ainda são um impeditivo de sua ampla utilização, sendo assim uma técnica rigorosa de esterilização deve ser aplicada.

O calor seco é a forma de esterilização mais difundida e utilizada pelos dentistas. É também a técnica mais simples, por exigir menor investimento e manutenção, e eficaz, desde que utilizada corretamente, porém:

- Álvares Leite (1996) cita que a técnica de esterilização pelo calor seco é o método de esterilização mais utilizado pelos cirurgiões dentistas e que a maioria dos profissionais não respeita as normas técnicas;
- Conte *et al.* (1997) descrevem que, em Curitiba, o monitoramento da temperatura da estufa é feito pelo termômetro do próprio aparelho por 56,5%

dos ortodontistas, com tempo de exposição de uma hora, o que não garante a esterilização;

- Skaug *et al.* (1999) ao avaliar o resultado do monitoramento dos processos de esterilização de uma amostra referente a 9,1% dos consultórios odontológicos da Noruega verificou que 12% dos processos de esterilização pelo calor seco foram insatisfatórios, embora seja recomendo no país o uso regular de indicadores biológicos para monitorar a esterilização;
- Marin *et al.* (2001) demonstraram que 17,7% dos processos de esterilização pelo calor seco, realizados em consultórios odontológicos de San Luis Potosí, México, avaliados através de indicadores biológicos, apresentaram crescimento bacteriano. Concluindo que poucos cirurgiões dentistas verificam seu esterilizador através de indicadores biológicos e que existem falhas no processo de esterilização;
- Prado e Santos (2002) avaliaram 49 consultórios odontológicos no município de Taubaté, o teste de indicador biológico foi realizado em 50 equipamentos de esterilização, sendo 14 (28%) autoclaves e 36 (72%) estufas. Dentre os aparelhos avaliados, 6 (12%) estufas apresentaram resultado positivo, dado esse que se deveu mais a falhas humanas do que a ineficácia da estufa como método de esterilização;
- Acosta-Gío *et al.* (2003), concluíram que as estufas apresentam mais falhas que as autoclaves. Isso ocorre pelo fato da estufa não possibilitar registros confiáveis e possuir falta de delimitação exata do ponto frio, colocando o processo de esterilização em risco;
- Araújo *et al.* (2004) realizaram estudo com o intuito de avaliar o grau de esclarecimento dos cirurgiões-dentistas com relação ao controle de infecção na clínica odontológica. Foram distribuídos aleatoriamente 150 questionários, tendo sido devolvidos preenchidos 111. As perguntas, num total de 53, abrangiam utilização de barreiras de proteção individual, métodos de desinfecção e esterilização do instrumental odontológico e conhecimentos sobre doenças infecto-contagiosas. Demonstrou que o Forno de Pasteur é utilizado para esterilização do instrumental por 96% dos entrevistados, entretanto somente 41% destes, souberam citar corretamente o tempo e temperatura adequados;

- Cardoso e Gewehr (2004) efetuaram uma pesquisa diagnóstica em 50 consultórios odontológicos da cidade de Curitiba e verificaram que as obrigações e recomendações estabelecidas pela Vigilância Sanitária Municipal de Curitiba no que se refere à monitoração física, química e biológica para o controle de esterilização de estufas e autoclaves não estão sendo totalmente cumpridas. Concluíram que grande parte dos cirurgiões-dentistas não possui conhecimento sobre monitoração química interna e biológica, e muito menos em relação ao método de aplicação dos indicadores no processo de esterilização dos materiais odontológicos;
- Cardoso (2005) demonstrou que somente 9,1% dos consultórios odontológicos de Curitiba fazem monitoramento biológico da esterilização e que 50% dos processos avaliados apresentaram problemas.

O monitoramento biológico da esterilização pelo calor seco é indicado pela *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI, 2004). O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) e a *American Dental Association* (ADA) recomendam que "o correto funcionamento dos ciclos de esterilização deve ser verificado para cada equipamento pelo uso periódico de indicador biológico, no mínimo semanal" (CDC, 2003; ADA, 1996). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 1996), é necessário o monitoramento biológico semanal, identificação dos pacotes com fita termosensível e registro de temperatura em todas as esterilizações, nos consultórios odontológicos. No Manual de Orientações Gerais para Central de Esterilização a monitoração biológica é recomendada uma vez ao dia ou, no mínimo, semanalmente (BRASIL, 2001).

A Resolução nº 496/2005, da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, que estabelece condições para instalação e funcionamento de estabelecimentos de assistência odontológica, cita no seu artigo 50 que: "é necessário avaliar a eficácia do método de esterilização adotado, através do uso de indicadores físicos, químicos e biológicos" (PARANÁ, 2005).

A Lei Federal nº. 8078 (1990) estabelece que um dos direitos básicos do consumidor é a proteção da vida, saúde e segurança contra riscos provocados no fornecimento de produtos e serviços. De acordo com o Art. 4º § III do Código de Ética Odontológica de 1992, constitui um dos deveres do profissional "zelar pela saúde e pela dignidade do paciente" (CFO,1992). O cirurgião-dentista tem obrigação moral, ética e legal, não só de proporcionar atendimento odontológico, mas também

de impedir a infecção cruzada. A Resolução CFO 186/93 Art. 4º § II estabelece que o equipamento de esterilização, em consultório odontológico, deve oferecer total segurança à equipe de saúde e aos pacientes (CFO, 1993).

Apesar de todas as recomendações técnicas e exigências legais, os estudos citados demonstram que a maioria dos cirurgiões-dentistas não faz o teste biológico de esterilização. Isso se deve a falta de conhecimento das normas do Ministério da Saúde por parte do profissional, falta de fiscalização pelos órgãos públicos e falta de recursos práticos, como disponibilidade de laboratórios para cultivo e do indicador biológico. A dificuldade de aquisição do produto, seu alto custo, a indisponibilidade de laboratórios para cultivo e análise destes após o teste e a demora do resultado (7 a 10 dias) também são descritas como fatores dificultantes (PRADO; SANTOS, 2004; CARDOSO, 2005).

Apenas uma empresa nacional produz o indicador biológico para esterilização pelo calor seco, sob a forma de tiras embaladas em envelopes e acompanhadas de tubo de ensaio contendo meio de cultivo. Os produzidos em outros países não estão disponíveis no mercado nacional, o que restringe e dificulta a sua aquisição.

Embora no Estado do Paraná, a Secretaria de Estado da Saúde recomende a substituição gradual das estufas por autoclaves, levantamento realizado pelo CPPI, em 2007, através de questionário (TABELA 1), confirma que mais de 50% dos esterilizadores dos serviços públicos utilizam o processo de esterilização pelo calor seco. Devido ao alto custo, dificuldade de manuseio da autoclave e principalmente às características dos materiais odontológicos, esta situação tende a perdurar, principalmente nos municípios de médio e pequeno porte.

Cabe ao gestor do sistema público de saúde (Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde) investir na promoção da saúde da comunidade, fornecendo as condições que evitem a transmissão de doenças infecciosas, principalmente àquelas de importância epidemiológica, como a hepatite C, a AIDS, entre outras já citadas.

TABELA 1 - TIPOS DE ESTERILIZADORES DISPONÍVEIS NOS SERVIÇOS PÚBLICOS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, EM MARÇO DE 2007

Regional de Saúde	Município sede	Nº de autoclaves	Nº de estufas	Observações
1ª	Paranaguá	35	31	-
2ª	Curitiba e região metropolitana	117	88	Informação parcial
3ª	Ponta Grossa	47	32	-
4ª	Irati	-	-	Não informou
5ª	Guarapuava	1	1	Informação parcial
6ª	União da Vitória	22	14	-
7ª	Pato Branco	-	-	Não informou
8ª	Francisco Beltrão	-	-	Não informou
9ª	Foz o Iguaçu	-	-	Não informou
10ª	Cascavel	-	-	Não informou
11ª	Campo Mourão	7	12	-
12ª	Umuarama	35	60	-
13ª	Cianorte	38	33	-
14ª	Paranavaí	-	-	Não informou
15ª	Maringá	86	94	-
16ª	Apucarana	172	102	-
17ª	Londrina	54	92	-
18 ª	Cornélio Procópio	45	47	-
19ª	Jacarezinho	37	64	-
20ª	Toledo	35	74	-
21ª	Telêmaco Borba	2	2	Informação parcial
22ª	Ivaiporã	-	-	Não informou
TOTAL	**-**	**733**	**746**	**-**

FONTE: CPPI (2007)

O Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, órgão da Secretaria de Estado da Saúde, desde 1992 já vem produzindo indicadores biológicos para controle da esterilização a vapor (ESTERITESTE) e distribuindo a toda rede pública de saúde, o que viabilizou a implantação deste controle em todos os serviços públicos. Existindo assim um ambiente propício (conhecimento + infra-estrutura básica) para a diversificação desta linha de produção, bem como para atender à política institucional de ofertar produtos que atendam às necessidades da sociedade.

O custo comercial do produto é de 10 reais a unidade (aproximadamente 5 dólares, em 2007), considerando que cada teste utiliza três a cinco unidades, conforme o tamanho do equipamento, e com o uso no mínimo semanal, teremos um gasto de R$ 1.560,00 a R$ 2.600,00 por ano / equipamento. Pelos dados demonstrados na TABELA 1, onde apenas 60% dos entrevistados forneceram as informações solicitadas, pode-se estimar a existência de 900 estufas nos serviços

públicos estaduais, que gerariam um gasto mínimo de R$ 1.400.000,00 a 2.340.000,00 /ano só no controle biológico destes equipamentos.

A convergência destes fatos propicia a geração de um produto para viabilizar a implantação do controle de esterilização nos consultórios odontológicos da rede pública de saúde, com conseqüente redução dos riscos de transmissão de doenças aos pacientes e aos profissionais. Este produto poderá ser fornecido ao Ministério da Saúde, com retorno de recursos para aplicação na implementação da infra-estrutura de produção.

A obtenção de esporos termorresistentes para uso como indicador biológico para esterilização não é um processo de fácil padronização e reprodutibilidade. A bactéria necessita, para sua esporulação e formação de esporos resistentes ao calor, do controle de muitas variáveis. Os principais pontos a serem estudados são:

- Nutrientes constituintes do meio de esporulação;
- Tempo e temperatura da esporulação;
- Características do inóculo;
- Material de suporte e de embalagem;
- Meio de recuperação/ revelação.

A preparação de um indicador biológico requer, além da seleção do microrganismo, meios e condições de cultivo mais adequadas, uma série de procedimentos apropriados em atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BPF) ou *Good Manufactoring Pratics* (GMP) e à legislação nacional e internacional.

Este trabalho na sua primeira etapa apresenta o desenvolvimento e a otimização da tecnologia para a produção de IB para monitoração da esterilização pelo calor seco (estufas), utilizando meios de cultura industrializados desidratados, na maioria importados, o que permitiu a definição dos parâmetros ideais do processo e os padrões de qualidade do produto final. Os resultados obtidos foram utilizados como referência para o delineamento de um processo de produção que utilizou matérias primas regionais, tais como subprodutos e resíduos agroindustriais, em substituição aos meios de cultivo industrializados.

Na sua segunda fase apresenta o desenvolvimento de tecnologia inédita para a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais da soja e da cana-de-açúcar na produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* para uso como Indicador Biológico para esterilização pelo calor seco. A metodologia utilizada abrangeu a

seleção das matérias-prima e da técnica de cultivo, otimização das variáveis físicas, químicas e nutricionais do cultivo e a aplicação de processos validados, para atender às exigências da legislação sanitária vigente (Boas Práticas de Fabricação).

A aplicação industrial da nova tecnologia poderá possibilitar uma redução significativa dos custos de produção e ampliação da sua escala para atendimento das demandas do setor público de saúde em âmbito estadual e nacional.

A tecnologia gerada também poderá ser aplicada na produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* para a obtenção de novos produtos com outras aplicações, tais como:

a) indicador biológico para esterilização pelo calor úmido à temperatura inferior a 121°C, com aplicação na indústria de alimentos e de soluções parenterais (ISHII; PENNA, 2007);
b) indicador biológico para esterilização pelo óxido de etileno; plasma de peróxido de hidrogênio (NELSON; BERGER, 1999) e irradiação UV (ALEXANDRE; FARIA, 2003);
c) instrumento de determinação da eficiência do tratamento da água de consumo (GALE *et al.*,2002);
d) na verificação da integridade de embalagens flexíveis esterilizáveis (MASSAGUER; CARVALHO FILHO, 1997);
e) na avaliação da eficácia de anti-sépticos e esterilizantes químicos (BLAKISTONE *et al* .,1999; PENNA *et al.* , 2001).

Sua mais recente e pesquisada utilização é no desenvolvimento e validação de métodos de biossegurança contra armas biológicas, como substituto ao *Bacillus anthracis,* por possuir características físico-químicas e morfológicas semelhantes a este (WEBER *et al.*,2003).

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver bioprocesso para a produção de esporos termorresistentes do *Bacillus atrophaeus*, visando à produção de um indicador biológico para esterilização pelo calor seco dentro das exigências internacionais de qualidade e de baixo custo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Produzir indicador biológico para esterilização pelo calor seco para viabilizar a implantação do controle da esterilização nos consultórios odontológicos da rede pública de saúde ;
b) Definir os parâmetros ideais do processo e padrões de qualidade do produto final, para serem utilizados como referência no desenvolvimento de novas tecnologias de produção;
c) Desenvolver tecnologia de utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais na produção de esporos termorresistentes para a reduzir os custos de produção do indicador biológico e ampliar o atendimento à demanda do setor público de saúde estadual e nacional .

1ª PARTE

2 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA USO NA ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO UTILIZANDO MEIOS DE CULTIVO INDUSTRIALIZADOS

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Esterilização

O calor na forma de fogo foi o primeiro método de eliminação da vida para evitar a transmissão de doenças, porém, apenas no final do século XVII os microrganismos foram reconhecidos como causadores de doenças. Em 1878 Stenberg demonstrou que as bactérias morriam quando submetidas a uma temperatura de 62ºC a 70ºC por 10 minutos, e que, no entanto, as formas esporuladas requeriam uma exposição de 5 minutos a 100ºC. Em 1880 estudos comparativos entre os processos de esterilização a vapor e esterilização pelo calor seco foram desenvolvidos utilizando esporos do *Bacillus anthracis* (DALMASSO, 2003).

A esterilidade também é definida como a incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização, durante a conservação e utilização de um produto. A manutenção do nível de esterilidade conferido a um produto assegura o prolongamento da vida útil de prateleira e depende das operações de pré-esterilização, esterilização e pós-esterilização. Para garantir o nível de segurança e assegurar a efetividade do processo de esterilização, parâmetros físicos, químicos e matemáticos devem ser utilizados e validados. A RDC 210 da ANVISA (BRASIL, 2003) no item 17.11.1 cita: "A esterilização pode ser feita mediante a aplicação de calor seco ou úmido, agentes gasosos, por filtração esterilizante com subseqüente enchimento asséptico dos recipientes finais estéreis, ou através de irradiação com radiações ionizantes". Cada método tem suas aplicações e limitações particulares. A escolha do processo deve levar em consideração a segurança do trabalhador e do meio ambiente, o tempo do ciclo, a

compatibilidade com o material a ser processado, inclusive a embalagem, e a estabilidade do material.

Quando for possível e praticável, a escolha do método deve ser a esterilização por calor. Segundo Luqueta (2007), este processo apresenta as seguintes vantagens:

a) é um método seguro, uma vez que utiliza ar aquecido (no caso das estufas) ou vapor de água (no caso das autoclaves) como agente esterilizante;
b) o agente esterilizante não contamina o produto e não deixa resíduos tóxicos;
c) é química e biologicamente compatível com uma grande quantidade de materiais;
d) o processo de validação de sistemas térmicos é relativamente simples e amplamente difundido.

2.1.1.1 Esterilização pelo calor seco

Iniciada por Robert Koch em 1881, a esterilização pelo calor seco sempre foi caracterizada pelos adjetivos "lenta e problemática" (KOCH; WOLFFHUEGEL, 1881,citado por AAMI,2004). Certamente, a penetração do calor seco através do produto e das embalagens , como o papel, é muito mais lenta do que a penetração do calor úmido. A aplicação do calor seco em um forno é difícil de controlar, a densidade do ar decresce rapidamente com o aquecimento, provocando a estratificação da temperatura. O que gerou a seguinte afirmação: "O uso do calor seco é limitado à esterilização dos artigos que não podem suportar a ação corrosiva do vapor, substâncias anidras que podem ser alteradas pelo calor úmido ou que impeçam a sua ação bactericida, instrumentos de corte e produtos químicos secos tais como graxas, óleos e glicerina" (WALTER,1948).

Com a necessidade da padronização das condições para a esterilização pelo calor seco, em 1930 foi estabelecido o limite máximo de temperatura de 160ºC, devido às características dos metais que eram fabricados os instrumentos cirúrgicos na época. O tempo de exposição mínimo de 15 minutos foi determinado com base no tempo mínimo necessário para destruir 10^6 esporos bacterianos secos na areia aquecida a 135ºC-145ºC (MURRAY; HEADLEE, 1931). Em 1940, Oag descreveu um tempo de morte de nove minutos para esporos secos do *Bacillus anthracis*, acondicionados em frascos de vidro e aquecidos a 160ºC. Estes e outros estudos

comprovaram que calor seco pode ser um meio eficiente de esterilização se as condições da exposição forem cuidadosamente controladas (AAMI, 2004). Atualmente os padrões para a temperatura e o tempo de exposição legalmente aceitos são:

a) Farmacopéia Americana: 170ºC por 120 minutos (USP 24, 2000c);
b) Associação Americana de Odontologia: 160ºC por 120 minutos (ADA, 1996);
c) Ministério da Saúde: 121ºC durante 12 horas, 160ºC durante 2 horas ou 170/180ºC durante 1 hora (FANTINATO *et al.*, 1994; BRASIL, 1996).

Novos estudos têm demonstrado a efetividade dos métodos de esterilização na estufa à temperatura de 190 ºC por 6 minutos, embora poucas referências tenham sido apresentadas (SOUZA, 1999).

Hoje, além das estufas convencionais, já se encontram disponíveis equipamentos que operam a altas temperaturas (superiores a 210ºC) com circulação de ar forçada, mantendo a uniformidade da temperatura no interior da câmara, com sistema de registro e monitoramento de dados, como temperatura interna e tempo de exposição. Estas melhorias vieram acompanhadas do desenvolvimento de testes para validação, requeridos pelas agências reguladoras, bem como permitiram o uso de ciclos fixos de esterilização e uma exposição mais curta, porém mais eficiente.

2.1.1.2 Mecanismo de ação da esterilização pelo calor seco

A morte dos microrganismos pelo calor seco ocorre por meio da oxidação e desidratação, que impedem a reprodução celular diretamente por alteração no sistema genético e também produzem alteração no sistema metabólico, interrompendo o acesso dos nutrientes necessários à reprodução. Os mecanismos de transferência de calor na esterilização pelo calor seco são: condução, convecção e radiação infravermelha. O processo de esterilização realiza-se com o aquecimento dos artigos por irradiação do calor das paredes laterais e da base da estufa associada à condução. Inicialmente o calor é absorvido pela superfície exterior de um material e depois pela próxima camada. Progressivamente, a temperatura necessária para esterilização alcança todo o artigo.

As variáveis mais importantes associadas ao processo de esterilização pelo calor seco são:

a) temperatura, a mais importante variável, o seu efeito na letalidade está relacionado ao tempo de exposição;
b) tempo ou “tempo de exposição” a uma determinada temperatura, que resultará na esterilização;
c) distribuição e uniformidade do fluxo de ar quente de forma a assegurar a igual transferência de calor por toda a estufa (FIGURA 1 e FIGURA 2). O ar quente circulando sob a superfície reduz a resistência dos microrganismos por desidratação, podendo assim reduzir o tempo de exposição;
d) configuração da carga: o tamanho, a densidade e a distribuição da carga são importantes para assegurar o acesso do agente esterilizante (DALMASSO, 2003).

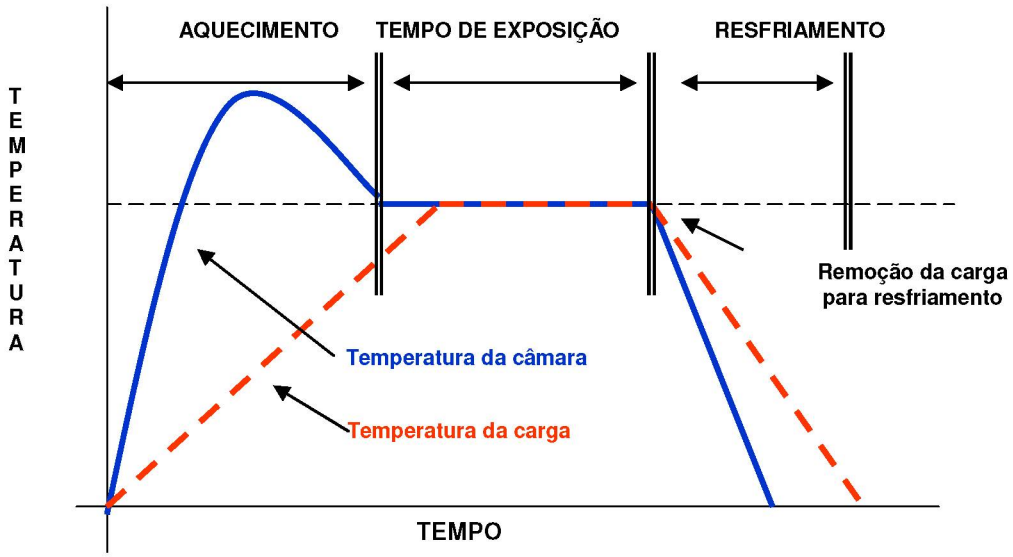


FIGURA 1 - CICLO DE ESTERILIZAÇÃO EM ESTUFA SEM CIRCULAÇÃO DE AR

FONTE: ADAPTADO DE AAMI (2004)

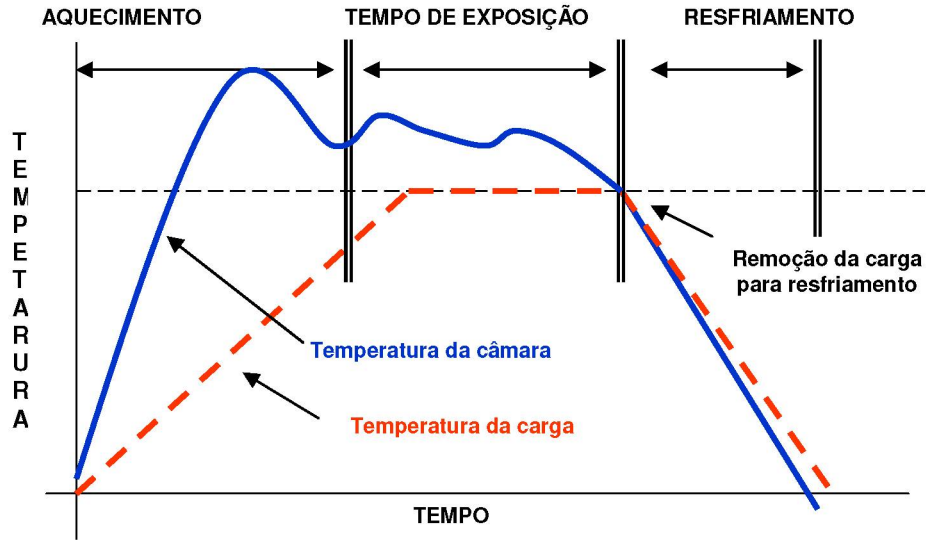


FIGURA 2 - CICLO DE ESTERILIZAÇÃO EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR
FONTE: ADAPTADO DE AAMI (2004)

O processo de esterilização pelo calor seco demanda um tempo e temperatura superior ao processo de esterilização a vapor devido à baixa capacidade do ar seco de conduzir o calor em relação ao último. Uma exposição por uma hora a 160ºC de calor seco equivale aproximadamente a 15 minutos de vapor. Devido a estas condições as estufas/ fornos de esterilização tiveram seu uso bastante reduzido em hospitais, porém ainda são largamente utilizadas nos consultórios odontológicos, pelas características dos artigos esterilizados, baixo custo de investimento e manutenção, como também facilidade de manuseio (MAYWORM, 2002).

2.1.1.3 Monitoramento biológico

Falhas do processo de esterilização nos serviços de saúde aumentam significativamente as chances de disseminação de agentes infecciosos. Para garantir a eficácia do sistema de esterilização todos os equipamentos (fornos /estufas) devem ser monitorados biologicamente quando da qualificação da sua instalação, após qualquer alteração na sua alocação, mau funcionamento, reparo ou ciclo falho; como também rotineiramente.

2.1.1.4 Indicador biológico para esterilização

Os indicadores biológicos (IB) são amplamente utilizados para avaliar a letalidade de diversas combinações, como os parâmetros dos processos de esterilização *versus* características dos produtos a serem processados em relação à composição das suas embalagens. São geralmente mais resistentes às esterilizações do que as cargas bacterianas do material a ser esterilizado (ABNT, 2001).

Esporos bacterianos são utilizados como indicadores biológicos para monitoramento da esterilização (FIGURA 3) devido a sua alta resistência aos diferentes processos. Esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 são indicados para a esterilização pelo vapor sob pressão, esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (Bacillus *subtilis* var. *niger* reclassificado por Fritze e Pukall, 2001) são empregados nos processos de esterilização pelo calor seco, óxido de etileno (USP 24, 2000b), calor úmido a baixa temperatura e plasma (NELSON; BERGER,1999) e também por microondas. Esporos de *Bacillus pumilus* são indicados para validar processos cujo agente esterilizante é a radiação iônica (PENNA; MACHOSHVILI, 1997).

FIGURA 3 - DIFERENTES FORMAS DE APRESENTAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO

FONTE: GOOGLE IMAGENS (2007)

Os indicadores biológicos para esterilização são classificados em:

a) primeira geração: tiras de papel impregnado com esporos. O material é encaminhado ao laboratório para incubação após a esterilização e o resultado é fornecido após um período de 2 a 7 dias;
b) segunda geração: ampolas contendo meio de cultivo e esporos, denominado como "autocontido", com leitura final em 48 horas;
c) terceira geração: só disponível para o processo a vapor. A leitura é realizada no máximo em 3 horas. Também chamado de "enzimático", utiliza aparelho especialmente desenvolvido para a leitura do resultado (BLOCK, 2001).

2.1.2 O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é composto por um grupo de microrganismos na forma de bastonetes, Gram positivos ou Gram lábeis e esporulados. A morfologia de suas colônias varia de acordo com a espécie. São aeróbios estritos ou aeróbios facultativos, encontrados facilmente no solo, água e ar (MANDIGAN *et al.*, 2002).

São os microrganismos que dominam as fermentações bacterianas. A capacidade de suas espécies de produzir grande quantidade de enzimas extracelulares os coloca como uns dos mais importantes microrganismos de interesse industrial. Principalmente devido às características de algumas espécies em fermentar em meios alcalinos ou ácidos, como também devido à presença de termófilos neste gênero, contribuindo para formação de enzimas com grande estabilidade. Tradicionalmente são usados na produção de alimentos como *natto* ou soja fermentada (*B. subtilis*), antibióticos (*B. licheniformis, B. polymyxa, B. circulans, Brevibacillus brevis)* e bioinseticidas (*B. thuringiensis, B. sphaericus , B. popilliae*). Algumas espécies possuem a capacidade de produzir nucleotídeos (*B. subtilis*), riboflavina (*B. subtilis*), flavorizantes (*B. subtilis, B .pumilus)*, aromatizantes (*B. cereus*), ácidos poliglutâmico (*B. subtilis*), entre outros produtos (SCHALLMEY *et al.*, 2004).

A produção de esporos resistentes faz com que o seu controle seja um grande problema na indústria de artigos farmacêuticos e médico-hospitalares estéreis, bem como na indústria de alimentos. Esta característica também é utilizada para a produção de indicadores biológicos para esterilização, para avaliação da capacidade de ação de biocidas, etc (GORDON, 1977).

O gênero *Bacillus* foi criado em 1872 por Cohn, com o *Bacillus subtilis* como espécie modelo. Inicialmente a classificação do gênero foi baseada na capacidade de esporular e nas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do microrganismo. Atualmente, após análises do 16 rRNA, o gênero foi dividido em seis grupos:

a) Grupo I ou Grupo do *Bacillus polymyxa;*
b) Grupo II ou Grupo do *Bacillus subtilis;*
c) Grupo III ou Grupo do *Bacillus brevis;*
d) Grupo IV ou Grupo do *Bacillus sphaericus;*
e) Grupo V ou Grupo dos termófilos*;*
f) *Grupo VI* ou Grupo do *Bacillus acidocaldarius* e outros acidófilos.

Aplicações recentes de novas tecnologias de análise filogenética permitiram, além da reclassificação das espécies do *Bacillus subtilis* (FIGURA 4), a criação de novas espécies como *Geobacillus* -antigo *Bacillus stearothermophilus* e *Brevibacillus* –antigo *Bacillus brevis (*SCHALLMEY *et al.*, 2004).

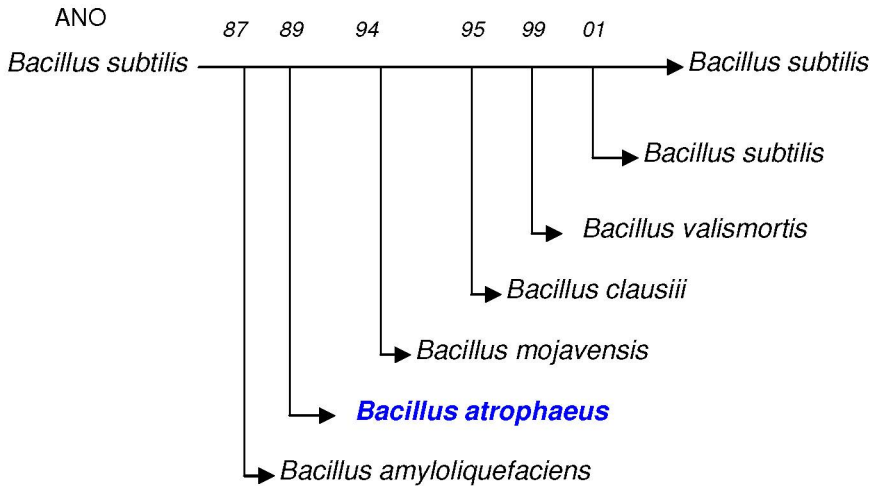


FIGURA 4 - DESENVOLVIMENTO DA TAXONOMIA DO GRUPO DO *Bacillus subtilis* 1987-2001

FONTE: ADAPTADO DE FRITZE (2004)

2.1.3 *Bacillus atrophaeus*

O *Bacillus atrophaeus* é um bacilo Gram positivo, com esporos elípticos ou cilíndricos na posição central ou para-central (FIGURAS 5 e 6), aeróbico, mesófilo, apatogênico, com temperatura ideal de cultivo de 20ºC a 37 ºC. Apresenta reação da catalase, reação de Voges Proskauser positiva, fermenta a glicose e hidrolisa o amido (GORDON, 1977). Fenotipicamente é idêntico ao *Bacillus subtilis*, exceto pela produção de pigmentos em alguns meios de cultivo (BURKE *et al.,* 2004).

Suas células vegetativas apresentam uma largura de aproximadamente 0,8 µm e comprimento de 2-3 µm, mas podem variar de acordo com as condições de cultivo (MANDINGAN *et al*., 2002). Recentes estudos ,através de microscopia eletrônica, demonstraram que os esporos do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 possuem aproximadamente 0,7 µm de largura e 1,8 µm de comprimento quando secos; podem aumentar de volume em cerca de 12% quando hidratados (PLOMP *et al.,*2005)

FIGURA 5 - FORMAS VEGETATIVAS DO *Bacillus atrophaeus* CORADAS PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM

FONTE: ANN C. SMITH & MARISE HUSSEY, DEPT. OF CELL BIOLOGY AND MOLECULAR GENETICS, UNIVERSITY OF MARYLAND; IMAGEM LICENCIADA PARA USO, ASM MICROBELIBRERY.DISPONÍVEL EM :http://www.fam.br / microrganismos /metodo_coloracao_de_gram.htm (2007)

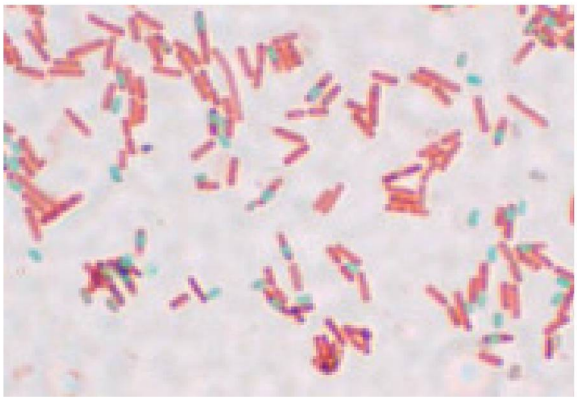


FIGURA 6 - FORMAS VEGETATIVAS, ENDOSPOROS (ESPORÂNGIOS) E ESPOROS LIVRES DO *Bacillus atrophaeus* CORADOS POR SAFRANINA E VERDE MALAQUITA

FONTE: http://www.steve.gb.com/science/ model_organisms.html (2007)

As colônias do *Bacillus atrophaeus* são semelhantes às do *Bacillus subtilis* (FIGURA 7) e podem apresentar diferentes morfologias, de acordo com as condições de cultivo.

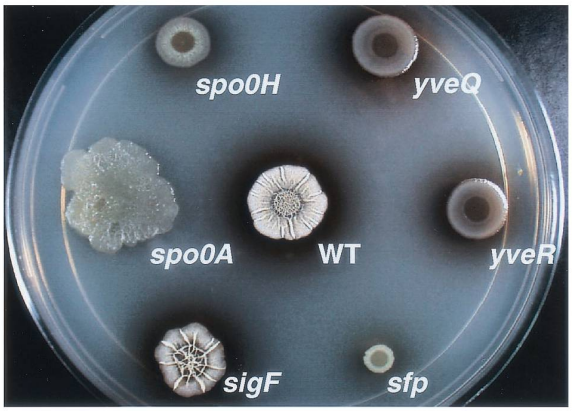


FIGURA 7 - COLÔNIAS DO *Bacillus subtilis* - DIFERENTES EXPRESSÕES FENÓTIPICAS

FONTE: ADAPTADO DE BRANDA (2001)

2.1.4 Fisiologia da esporulação

Hipóteses propondo que *Bacillus* esporulam em resposta à falta de nutrientes ou de fosfato tem sido reportadas com freqüência na literatura (FOESTER, 1956; BERNLOHR; LEITZMANN, 1969; VINTER, 1969; WALDERBURGER, *et al.*,1993). Schaffer e Millet (1965) propuseram que a taxa de esporulação depende do tipo das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas devido aos catabolitos acumulados no meio de cultivo. Pesquisas realizadas por Dawes e Thormley (1970) descrevem que a taxa de esporulação é pequena frente à limitação do fornecimento de fosfato de magnésio, citrato ou triptofano.

Após uma situação de "stress" nutricional ou ambiental e entrada na fase estacionária de crescimento, a população aleatoriamente poderá utilizar diferentes vias de desenvolvimento, dependendo do ambiente de cultivo, incluindo: síntese de polímeros extracelulares degradantes de enzimas; mobilidade e quimiotaxia; transformação genética por DNA exógeno, formação de biofilme e corpos de frutificação; mutagênese adaptativa; diferenciação e formação de esporos dormentes e resistentes (MAUGHAN; NICHOLSON, 2004). A esporulação representa o

abandono da tentativa de manter o ciclo de crescimento e de divisão, sendo portanto uma adaptação drástica.

O processo de esporulação resulta do reconhecimento e da integração de diversos sinais ambientais, incluindo a limitação nutricional, já citada, a densidade celular, e metabólitos fisiológicos, gerados pelo funcionamento do ciclo de Krebs, pelo ciclo celular e pelo estado de replicação do DNA (REAL; HENRIQUES, 2001). O reconhecimento e a integração destes sinais resultam na ativação, pela fosforização, da proteína SpoA, que é ao mesmo tempo ativadora e repressora da expressão gênica. O processo de esporulação, ilustrado na FIGURA 8, assemelha-se ao de divisão celular que gera um pré-esporo e uma "grande" célula-mãe, a membrana plasmática da célula-mãe cresce em volta do pré-esporo englobando-o, o esporo amadurece através de uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas . Por último a célula-mãe rompe, liberando o esporo (SETLOW, 2007).

Didaticamente o processo de esporulação é dividido em 7 estágios:

a) estágio I : formação de um filamento axial do material do núcleo;
b) estágio II : invaginação da membrana, revestindo o DNA e formando um septo;
c) estágio III : englobamento do pré-esporo pela membrana, formando um segundo envoltório;
d) estágio IV : deposição do córtex entre as duas membranas e o acúmulo do dipicolinato de cálcio;
e) estágio V : estruturação das proteínas da capa sobre o córtex;
f) estágio VI : maturação;
g) estágio VII : liberação do esporo pela ação de enzimas líticas, que destroem o corpo bacteriano (também denominado de esporângio).

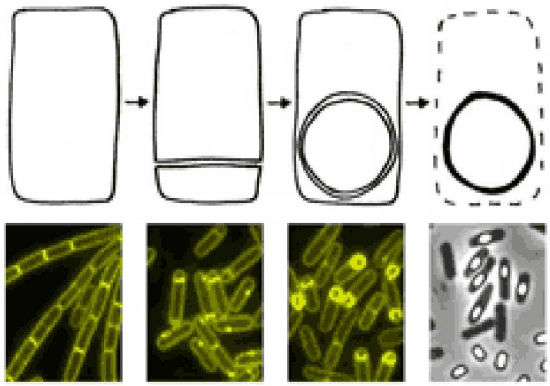


FIGURA 8 - FORMAÇÃO DE ESPOROS NAS BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus*

FONTE: http://micro.med.havard.edu/faculty/rudner.html (2007)

2.1.5 Estrutura e propriedades dos esporos

As principais características dos esporos em relação às células vegetativas estão descritas no QUADRO 1.

Característica	**Célula vegetativa**	**Esporo**
Estrutura	Célula Gram positiva típica	Exósporo levemente corado
Microscopia	Não refringente	Refringente
Cálcio	Baixo	Alto
Ácido dipicolínico	Ausente	Presente
Atividade enzimática	Alta	Baixa
Metabolismo (captação de O_2)	Alto	Baixo ou ausente
Síntese de macromoléculas	Presente	Ausente
mRNA	Presente	Raro ou ausente
Resistência ao calor	Baixa	Elevada
Resistência à radiação	Baixa	Elevada
Resistência aos produtos químicos (H_2O_2) e ácidos	Baixa	Elevada
Capacidade de retenção de corantes	Colore facilmente	Difícil coloração
Efeito da lisozima	Sensível	Resistente
Conteúdo de água	Elevado, 80-90%	Baixo, 10-25 % no núcleo
Proteínas pequenas e solúveis em ácido	Ausentes	Presentes
pH citoplasmático	Aproximadamente 7,0	Aprox. 5,5 a 6,0

QUADRO 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESPOROS E DAS CÉLULAS VEGETATIVAS

FONTE: ADAPTADO DE THE GENUS B*acillus* IN TODAR'S ONLINE TEXTBOOK OF BACTERIOLOGY KENNETH TODAR UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON DEPARTMENT OF BACTERIOLOGY (2005). DISPONÍVEL EM: www.textbookofbacteriology.net

O esporo possui uma estrutura bastante diferenciada da célula vegetativa. É composto por várias camadas (FIGURAS 9 e 10):

a) capa: a mais externa, constituída por uma ou várias camadas protéicas, com mais de 40 proteínas diferentes, inclusive esporo-específicas. Esta camada é responsável pela resistência aos agentes químicos e também protege os esporos contra a ação de microrganismos predadores;
b) membrana externa: essencial na formação do esporo, mas não tem ação de barreira no esporo maduro;
c) córtex: composto por camadas de peptideoglicano ligadas frouxamente entre si;
d) parede celular: protege o cerne;
e) membrana interna: apresenta baixa permeabilidade a proteínas e à água;
f) cerne: onde estão localizados o DNA (possuem um único cromossomo), ribossomos e enzimas. Região com baixo conteúdo de água (20-50%), pH 6,5 e alta concentração de dipicolinato de cálcio (FIGURA 11) e de pequenas proteínas ácido-solúveis, que respondem pela resistência do esporo aos agentes agressores (SETLOW, 2007).

O esporo, metabolicamente inerte, é extremamente resistente a agressões físicas e químicas, como ação de componentes tóxicos ou enzimas bactericidas, a extremos de temperatura, desidratação, radiação e luz U.V.

2.1.6 Resistência térmica

Esporos de bactérias do gênero *Bacillus* podem sobreviver por anos devido à proteção do seu DNA contra "danos" causados por diferentes agentes químicos e físicos. A proteção do DNA é resultante da presença de um composto denominado ácido dipicolínico, localizado no cerne, correspondendo à cerca de 15% do peso seco. O ácido dipicolínico associa-se a íons cálcio, originando o dipicolinato de cálcio, que provavelmente estabiliza os ácidos nucléicos contidos no cerne. O DNA, quando danificado, é auto-reparado através da sua saturação por um grupo de proteínas ácido solúveis, denominadas de *Small Acid Soluble Proteins* (SASP), que são sintetizadas no desenvolvimento do esporo e degradadas no início da esporulação. Além disso, o grau de desidratação do esporo também é um fator

importante na sua resistência, bem como a presença de várias camadas, tornando-o bastante impermeável (FAIRHEAD *et al.*,1994, SETLOW,2007).

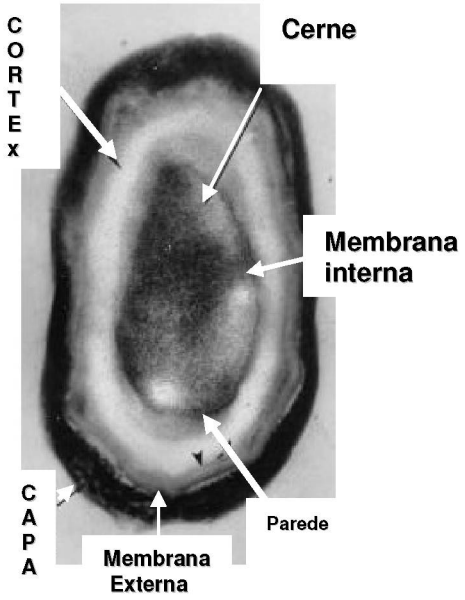


FIGURA 9 - MICROFOTOGRAFIA DE UM ENDOSPORO DO *Bacillus subtilis* MOSTRANDO SUA ESTUTURA

FONTE: http:// www. bact.wisc.edu/ microtextbook /index. php? module= book &func = displayarticle &art_id =69 (2007)

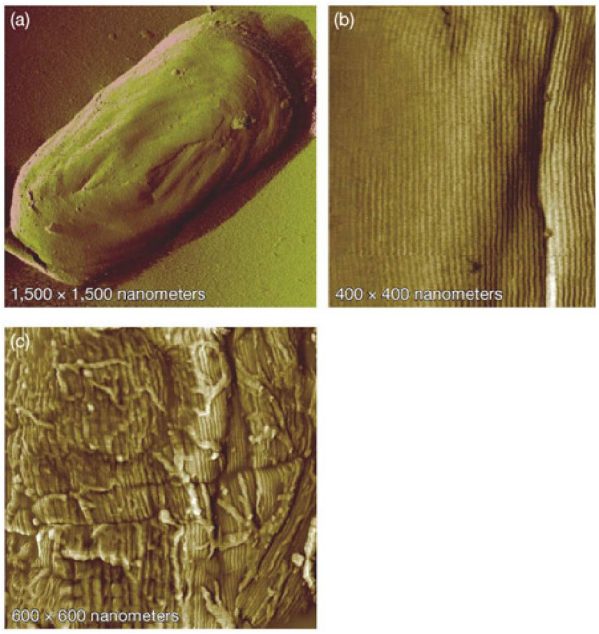


FIGURA 10 - ULTRA-IMAGENS DEMONSTRANDO A FORMA E A SUPERFÍCIE DO ESPORO DO *Bacillus atrophaeus* (a) ESPORO HIDRATADO; (b) SUPERFÍCIE HIDRATADA; (c) SUPERFÍCIE DESIDRATADA

FONTE: http://www.llnl.gov/str/May04/De Yoreo.html(2007)

Em resumo, a resistência térmica dos esporos é complexa e alguns aspectos ainda não são bem conhecidos. Os principais fatores envolvidos incluem: resistência intrínseca ou inata da espécie de esporo ou cepa, condições ambientais durante a esporulação, preparo do indicador, armazenamento, incubação, recuperação após exposição ao agente esterilizante, material de suporte e embalagem, entre outros que podem interferir significativamente.

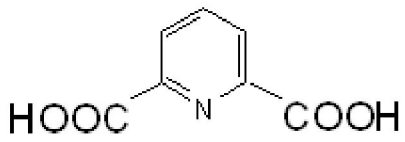


FIGURA 11 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO DIPICOLÍNICO (ÁCIDO PIRIDINA-2,6-DICARBOXÍLICO)

FONTE : www.sigma-aldrich.com (2007)

A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica e pode ser representada pelo modelo da curva linearizada, semilogarítmica de sobreviventes. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes em relação ao tempo de exposição, à temperatura constante, resulta em curva linearizada decrescente (FIGURA 12). 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:

$$Log\ N_f = Log\ N_0 - (k/2{,}303)t$$

Onde:

Log N_f = Logaritmo decimal da população sobrevivente após um tempo (*t*) de exposição;

Log No = Logaritmo decimal da população no tempo inicial (*t= 0*);

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

t= tempo de exposição (PENNA*;* MACHOSHVILI, 1977)**.**

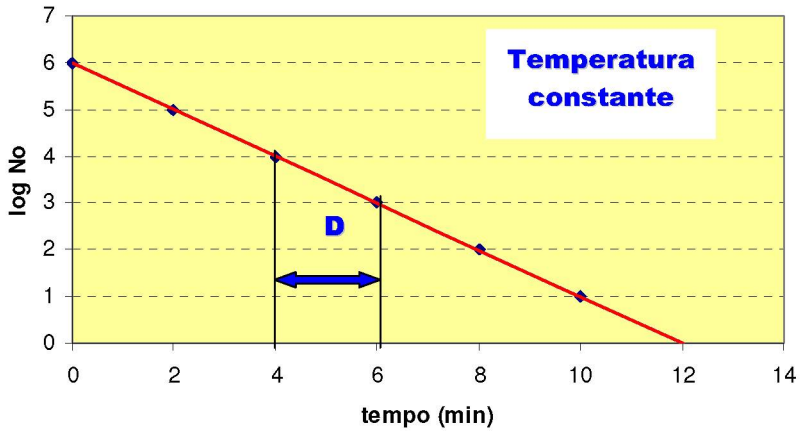


FIGURA 12 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA e *"D"* (TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL)
FONTE: ADAPTADO DE PFLUG (1999)

O bioindicador adequado deve apresentar uma população de esporos e uma termorresistência ao processo de esterilização superior àquelas dos microrganismos originalmente presentes no produto a ser esterilizado.

A sua resistência térmica é demonstrada pela determinação dos seguintes valores:

a) Tempo de redução decimal ou tempo de termo destruição (*D*): tempo de exposição, nas mesmas condições do processo de esterilização, necessário para reduzir a população microbiana inicial em 90 % (1 log). O valor de D pode ser determinado pelo Método da Curva de Sobreviventes ou pelo Método da Fração Negativa, sendo o último de mais fácil execução. Para a análise dos dados do Método da Fração Negativa são descritos dois métodos de cálculo:

   - Método de Stumbo, Murphy e Cochm (Número mais provável - NMP): quando os intervalos de tempo, de aquecimento ou de amostras não são iguais;

   - Método de Spearman-Kaber *(*Tempo médio de esterilização): quando os intervalos de tempo de aquecimento são iguais e o mesmo número de amostras são expostas ao mesmo intervalo de tempo.

b) Tempo médio de morte (U_{sk}): é o tempo médio, expresso em minutos, necessário para matar toda a população microbiana a uma determinada

temperatura. Pode ser calculado graficamente através da elaboração de uma Curva de Sobreviventes ou por fórmula citada no Método de Spearman-Kaber;

c) Intervalo Tempo de Sobrevivência -Tempo de Morte: intervalo entre o maior tempo em que todos os indicadores apresentam crescimento positivo e o menor tempo em que todos os indicadores não apresentam crescimento, quando expostos às mesmas condições.

A USP XXIV (2000) preconiza:

a) Tempo de sobrevivência: maior que *D* x (log da população viável de esporos - 2);

b) Tempo de morte: menor que *D* x (log da população viável de esporos + 4) (ISO 11.138-1,1994; USPXXIV, 2000; FDA, 2001).

As características de população e resistência térmicas recomendadas e observadas nos indicadores biológicos para calor seco comercializados estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS RECOMENDADAS E OBSERVADAS DA POPULAÇÃO E RESISTÊNCIA TÉRMICA DO IB PARA CALOR SECO (160ºC)

Referência/ Marca	**Número de esporos/ unidade**	***D*** (min)	**Tempo de morte** (min)	**Tempo de Sobrevivência** (min)	**Validade** (meses)	**Conser-vação.**
FDA, 2001	Mínimo 10^6	Mín. 3,0	-	Mínimo 12,0		-
USP 29,2006	10^4 a 10^9	1,0 a 3,0	10,0 a 30,0	4,0 a 12,0	-	-
SGM Biotech	10^6	2,0	5,0 a 18,0	10,0 a 12,0	24	Ambiente
BAUMER, (SPORTEST)	2,5 x 10^6	2,2	22,9	9,6	24	Ambiente
CEFAR	10^6	2,0 a 3,0	20,0	10,0	18	2-8ºC
NAMSA	10^2 a 10^6	1,0 a 3,0	-	-	24	Ambiente

2.1.7 Germinação

A germinação dos esporos é definida como o conjunto de eventos que resultam na perda das suas propriedades características em resposta a nutrientes químicos específicos. Requer um receptor específico de proteínas, localizado na membrana interna. A interação germinante x receptor ocasiona uma movimentação iônica e rehidratação parcial do esporo, seguida da hidrólise do córtex, hidratação total e formação da colônia (MOIR, 2006).

A ativação é um processo reversível que prepara o esporo para a germinação. Na germinação começa a ocorrer um intumescimento, em decorrência da absorção de água do meio. Há então a ruptura ou reabsorção da capa do esporo, a perda da resistência e o aumento da atividade metabólica. Este estágio pode ser disparado por diferentes metabólitos, tais como açúcares ou aminoácidos. A última etapa consiste no crescimento, quando o metabolismo normal é retomado e há a síntese dos constituintes normais de uma célula vegetativa. Neste momento o protoplasto emerge do restante da capa (FIGURA 13) e desenvolve-se normalmente outra vez (MOIR, 2006).

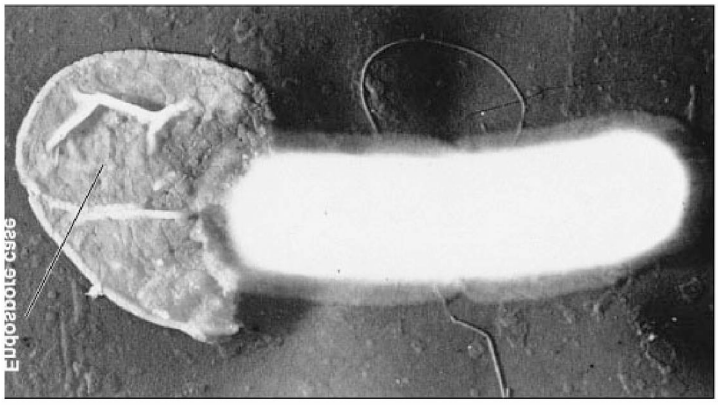


FIGURA 13 - GERMINAÇÃO DO ESPORO DE BACTÉRIA DO GÊNERO *Bacillus*
FONTE: PERSSON EDUCATION INC.BENJAMIN CUNNING (2004)

Esporos danificados pelo calor muitas vezes exigem condições especiais de cultivo para garantir a sua completa germinação e o meio de recuperação deve assegurar o seu desenvolvimento.

A germinação necessita de água e de agentes indutores, como por exemplo, a alanina, o dipicolinato de cálcio e íons inorgânicos, como Mn^{++} , (KUJALA; KAUPPINEN, 1982). Também pode ser induzida pela exposição a certos estimuladores como a alanina, a glicose mais frutose e pelo cloreto de potássio (LOSIK, 1986). Foester (1983) obteve uma excelente germinação utilizando uma solução de extrato de levedura e fosfato de sódio, também cita a valina e leucina como os aminoácidos mais eficientes e a glicose como o açúcar mais efetivo para a estimulação da germinação.

2.2 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO COM MEIOS INDUSTRIALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

2.2.1 Introdução

A resistência térmica dos esporos está também relacionada à qualidade da célula vegetativa de origem. Esporos produzidos a partir da fase estacionária de crescimento do inóculo são mais sensíveis ao calor, devido ao maior tempo de exposição das células vegetativas aos metabólitos tóxicos no meio de cultivo (OLSON; NOTTINGHAM, 1980). A determinação da fase logarítmica de crescimento é fundamental para a obtenção de um inóculo de boa qualidade.

A Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) recomenda o uso do meio caldo de soja tripticaseína (*Tryptone Soy Broth* – TSB ou *Soybean Casein Digest Broth*) para o cultivo de esporos do *Bacillus atrophaeus*, antes e após sua exposição ao calor. Este meio industrializado é quimicamente semidefinido e contém como fonte de nutrientes a peptona de caseína (fonte de carbono e nitrogênio), o cloreto de sódio e o fosfato de potássio. O fosfato de potássio, além de fornecer capacidade de tamponamento ao meio, fornece fosfato para o processo metabólico. O cloreto de sódio é um suplemento adicionado para modular a força osmótica do meio.

As condições da esporulação determinam as características dos esporos formados, como resistência térmica e capacidade de germinação (VRIES *et al.*, 2005; FEAVERS *et al.*, 1990 ; RASO *et al.*, 1998; REDMOND *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que cátions divalentes, como magnésio e cálcio, induzem a esporulação e aumentam a resistência térmica (CAZEMIER *et al.*, 2001). Krzywicka, *et al.* (1996) descrevem que o *Bacillus subtilis* produz um maior número de esporos em meio contendo manganês e extrato de levedura, porém com baixa resistência térmica, esta só foi aumentada com adição de cálcio ao meio e aumentando o tempo de cultivo de sete para dez dias. Kujala e Kauppinen (1982) também citam que os cátions divalentes aumentam a termorresistência e que a glicose age como inibidora da esporulação. O cálcio tem sido citado como elemento fundamental para o desenvolvimento da resistência térmica (PENNA *et al.*,2002).

Diferentes meios sintéticos são descritos para produção de esporos termorresistentes de *Bacillus sp.*, tais como: ágar nutriente suplementado com

sulfato de manganês (LÓPEZ *et al.*, 1996); meio de esporulação com a mistura de seis íons metálicos (CAZEMIER *et al.*, 2001; FAILLE *et al.*, 1977); meio de esporulação de Schaeffer -SSM (SCHAEFFER *et al.*, 1965); ágar para contagem de colônias suplementado com amido solúvel, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e cloreto de cálcio (PENNA *et al.*, 1996).

Esporos podem ser produzidos em meios líquidos ou sólidos, porém os meios sólidos fornecem uma maior produção (PINTO; SAITO, 1992).

Neste experimento testamos diferentes métodos de produção do inóculo e diferentes meios de esporulação com a finalidade de eleger um processo e um meio de referência, através da avaliação da sua capacidade de produção de esporos.

2.2.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 14 .

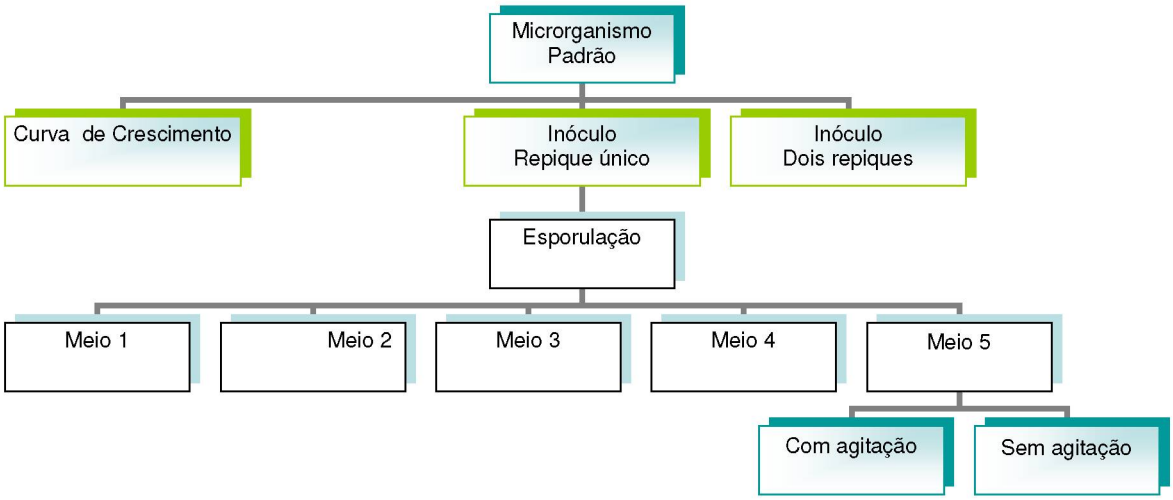


FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS

FONTE: O AUTOR

2.2.2.1 Microrganismo

Utilizou-se nos experimentos cepa padrão fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/MS, Brasil) de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, Lote-1403349. Mantida em ágar de soja tripticaseína 5ºC ± 3ºC, com repiques semestrais e também conservadas em alíquotas de 1,0 mL em nitrogênio líquido e em freezer a -80ºC.

2.2.2.2 Determinação da fase logarítmica de crescimento

Para a elaboração da curva de crescimento 20 tubos contendo 30 mL de caldo de soja tripticaseína foram inoculados com 100 µL da suspensão de esporos L 1/06 CPPI (8,0 x 10^7UFC. mL^{-1}), fornecendo um número inicial de esporos (N_0) de 2,7x 10^5 UFC.mL^{-1}. Os tubos foram incubados por até 24 horas a 36ºC ± 2ºC. Duas amostras foram retiradas a cada três horas e quantificadas em duplicata. A biomassa também foi determinada indiretamente por turbidimetria em espectrofotômetro, sob comprimento de onda de 610nm. A taxa de crescimento máxima foi expressa através da "taxa de crescimento vegetativo" e do "tempo de duplicação", calculados pelas equações:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln N - \ln No}{t} \qquad (1)$$

$$T = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad (2)$$

Onde:

$\mu_{máx}$ =Taxa de crescimento máxima

N= Número final de microrganismos

No= Número inicial de microrganismos

T= Tempo de duplicação

t= tempo de cultivo

2.2.2.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado testando-se repique único e dois repiques (FIGURA 15).

2.2.2.3.1 Dois repiques

Utilizando-se dois repiques, o inóculo foi preparado da seguinte maneira:

a) recuperação: 100 µL da suspensão de esporos, L1/06 CPPI, foram inoculadas em 3 tubos contendo 30 mL de caldo de soja tripticaseína, cada . Os tubos foram incubados por 24 horas a 36ºC ± 2ºC;
b) promoção da fase logarítmica de crescimento: 1,0 mL da cultura de 24 horas (células vegetativas) foi inoculada em 3 tubos contendo 30 mL de caldo de soja tripticaseína. Estes tubos foram incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC. O crescimento foi quantificado através da contagem de microrganismos viáveis.

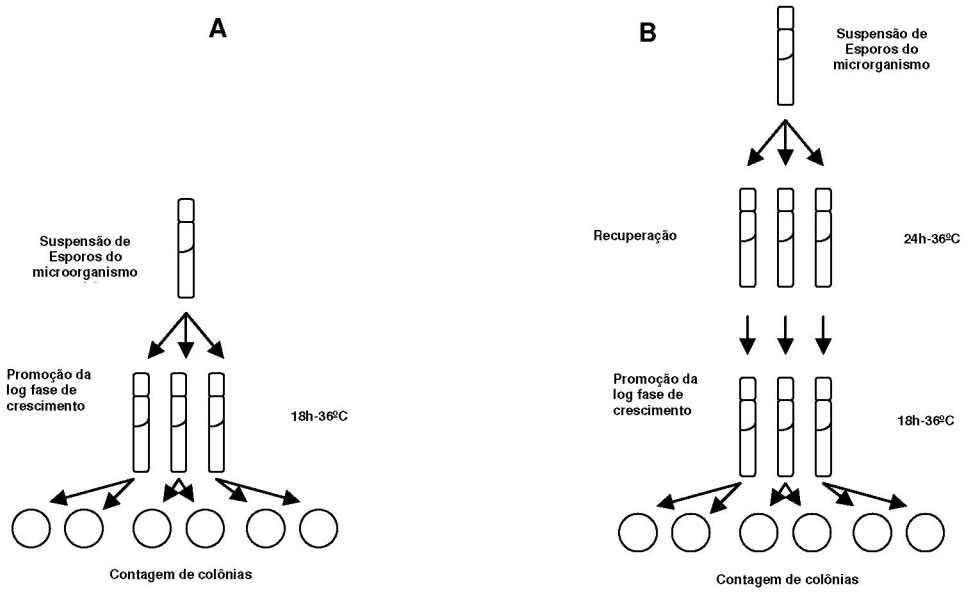


FIGURA 15 - PREPARO DO INÓCULO: (A) REPIQUE ÚNICO; (B) DOIS REPIQUES

FONTE: O AUTOR

2.2.2.3.2 Repique único

O volume de 100 µL da suspensão de esporos, L 1/06 CPPI, foi inoculada em três tubos contendo 30 mL de caldo de soja tripticaseína . Os tubos foram incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC.

2.2.2.4 Meios de esporulação

O inóculo foi preparado por repique único, como descrito no item anterior. O volume de inoculação utilizado foi 1% (v/v) para os meios contendo ágar e 3% (v/v) para o meio líquido. Os cultivos em ágar foram realizados em garrafa de Roux, cada uma contendo 400 mL do meio testado. O cultivo em caldo foi realizado em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio a ser testado.Todos os meios tiveram o seu pH ajustado para 7,0 ± 0,2 com NaOH 0,1N e foram autoclavados a 121ºC por 15 minutos.

Foram avaliados 5 diferentes meios de esporulação:

a) Meio 1: peptona de caseína, 0,3%; triptona, 0,5%; extrato de carne, 0,3%; extrato de levedura, 0,5%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005%; $MgSO_4.7H_2O$, 0,005%; $CaCl_2 .6H_2O$, 0,005 %; K_2HPO_4 , 0,005 %; ágar, 2,0% (SELLA, 1995).
b) Meio 2: extrato de levedura, 0,8%; caldo nutriente, 0,4%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005%; $CaCl_2.6H_2O$, 0,005 %; ágar, 3,0%. pH 7,0 ± 0,2 (PINTO, SAITO, 1992);
c) Meio 3: ágar nutriente, 8,0%; $MnSO_4.H_2O$, 0,003% (CAZEMIER *et al.*, 2001);
d) Meio 4: ágar nutriente, 12,0%; $MnSO_4.H_2O$, 0,003% (CAZEMIER *et al.*, 2001);
e) Meio 5, caldo para esporulação contendo: caldo nutriente 0,4%;extrato de levedura 0,8%; $MnSO_4.H_2O$, 0,0038%, $CaCl_2.2H_2O$, 0,0034% (PINTO; SAITO, 1992) .

Os meios inoculados foram incubados a 36ºC ± 2ºC por até 14 dias. O caldo foi incubado sem agitação em estufa e com agitação orbital a 200 rpm. Os cultivos foram realizados em duplicata e os dados apresentados representam a média dos resultados.

2.2.2.5 Monitoramento da esporulação

O acompanhamento da esporulação, feito através de microscopia ótica sob imersão em óleo, com aumento de 1000 vezes, utilizando células coradas pelo Método de coloração de Gram. O resultado foi demonstrado pela porcentagem de esporos:
% de esporos livres = nº total de esporos livres /nº total de células (esporos,esporângios e células vegetativas) x 100. Sendo contatos no mínimo 100 células por campo, no mínimo em 5 campos. As amostras foram retiradas no 7.º, 10.º e 14.º dia de incubação.

2.2.2.6 Preparo da suspensão de esporos

Nas culturas que apresentaram mais de 50% de esporulação, os esporos foram retirados do meio solidificado de forma asséptica, e suspensos em uma solução gelada de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7 (ajustado com hidróxido de cálcio 0,14%). Filtrados por algodão e gaze, lavados por 3 vezes em centrífuga refrigerada a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos a 4ºC. Suspensos em 50 mL de uma solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7. A suspensão foi submetida ao aquecimento a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes.

2.2.2.7 Quantificação

A quantificação foi realizada em duplicata, por diluição seriada decimal e inoculação em superfície do ágar de soja tripticaseína (TSA). Na inoculação foram utilizados 50 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a 36ºC ± 2ºC por 18 horas a 24 horas. O resultado considerado foi a média das duas contagens de colônias e expresso em UFC.mL $^{-1}$.

2.2.3 Resultados e discussões

A curva de crescimento do *Bacillus atrophaeus* apresentou uma fase logarítmica que teve início seis horas após a incubação, seguida de uma curta fase estacionária (FIGURA 16). O decréscimo da biomassa após 24 horas de incubação

pode ser associado à lise celular devido ao aumento de metabólitos tóxicos no meio de cultivo. A máxima densidade celular, cerca de 2,8 x 10^9 UFC.mL^{-1} foi obtida após 21 horas de incubação.

A taxa específica de crescimento obtida foi 0,42 h^{-1} e o tempo de duplicação foi calculado em 1,65 hora (1 hora e 39 minutos). Resultados similares foram encontrados por Dawes e Thormley (1970) que descreveram uma taxa específica de crescimento de 0,1 a 0,42 h^{-1} ao estudarem a esporulação do *Bacillus subtilis.* Burdett *et al.* (1986) observaram um tempo de duplicação de cerca de 2 horas ao estudar a cinética de crescimento do *Bacillus subtilis.* Não foram encontrados estudos sobre a cinética de crescimento do *Bacillus atrophaeus*. Estes resultados permitiram padronizar o tempo ideal de incubação do inóculo para 18 horas, evitando a exposição prolongada do microrganismo a metabólitos tóxicos.

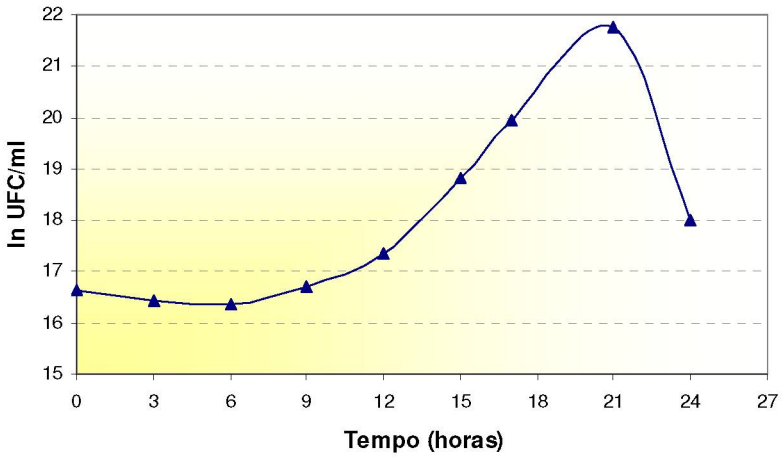


FIGURA 16 - CURVA DE CRESCIMENTO DO *Bacillus atrophaeus* EM TSB

Como demonstrado na FIGURA 17, foi observada uma correlação entre a densidade ótica obtida e o número de unidades formadoras de colônia por mL na log fase da cinética de crescimento , que apresentou um $R^2 = 0,984$.

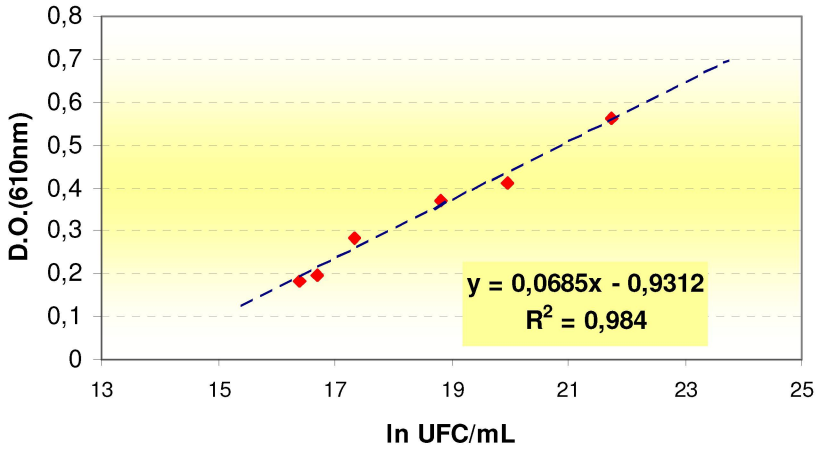


FIGURA 17 - LOG FASE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Bacillus atrophaeus*

A metodologia usual de produção de inóculo para esporulação (SELLA, 1995; PARANÁ, 2005) recomenda o uso de dois repiques sucessivos para aumentar o número de células viáveis a serem inoculadas. Esta etapa foi realizada com a finalidade de avaliar o comportamento do *Bacillus atrophaeus* quanto à produção de células viáveis diretamente a partir de esporos (repique único) e a partir de células vegetativas, originadas do primeiro cultivo. Os resultados estão apresentados na TABELA 3

TABELA 3 - PRODUÇÃO DE CÉLULAS VEGETATIVAS DO *Bacillus atrophaeus* PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO COM: REPIQUE ÚNICO E DOIS REPIQUES

Amostras	**Repique único** (UFC.mL $^{-1}$)	**Dois repiques** (UFC.mL $^{-1}$)
1	2,0 x 10 ^{8}	2,3 x 10 ^{8}
2	7,4 x 10 ^{7}	5,5 x 10 ^{7}
3	2,0 x 10 ^{8}	1,3 x 10 ^{8}
Média	1,6 x 10 ^{8}	1,4 x 10 ^{8}
Desvio Padrão	5,9 x 10 ^{7}	7,1 x 10 ^{7}
Variância	3,5 x 10 ^{15}	5,1 x 10 ^{15}

F = 0,6865 Valor de *p*= 0,7647
W = 6,0 Valor de *p* = 0,6631

A aplicação do Teste F nos resultados obtidos forneceu: F= 0,6865; *p* =0,7647. A aplicação do Teste de Mann-Whitney (Wilcoxon) forneceu valor de *p* = 0,6631(>0,05). Estes resultados demonstram que não existe diferença

estatisticamente significativa entre as duas amostras num nível de confiança de 95%.

O diagrama de Box e Wisker Plot originado (FIGURA 18) demonstra graficamente esta igualdade. Este conjunto de análises permitiu eliminar o segundo repique do processo, levando a uma redução de tempo, energia e consumo de meio de cultivo.

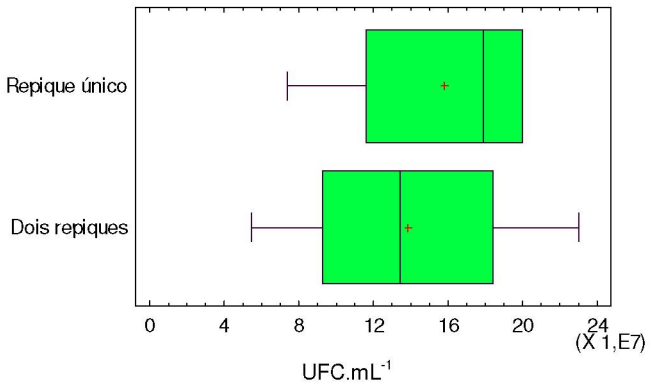


FIGURA 18 - BOX E WISKER PLOT DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO DO *Bacillus atrophaeus*

Para a eleição do meio de esporulação de referência, foram testados cinco diferentes meios de cultivo com substratos sintéticos em ágar e um meio líquido, com e sem agitação. As formulações foram definidas com base na literatura. Nenhum dos meios testados contém glicose, citada por Kujala e Kauppinen (1982) como inibidora da esporulação, todos contêm extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio. A TABELA 4 demonstra que apenas dois meios testados forneceram um índice de esporulação satisfatório (>80%), após 14 dias de incubação.

O *Bacillus atrophaeus* apresentou baixa esporulação no meio líquido, confirmando os resultados obtidos por Hoxey e Davies (1985). Pinto e Saito (1992) consideraram vantajoso o uso de meio sólido em relação ao meio líquido de esporulação, devido ao seu elevado rendimento, avaliando o número de $UFC.mL^{-1}$ (unidades formadoras de colônias por mL) nas suspensões obtidas pelos dois meios.

Rose *et al*. (2007) ao compararem as propriedades de esporos do *Bacillus subtilis* preparados em meio líquido e em ágar, observaram que os esporos preparados em meio líquido apresentaram menor resistência térmica aos agentes químicos, sendo esta mais uma vantagem da escolha do ágar para a esporulação.

TABELA 4 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SINTÉTICOS

Meios de Esporulação	**Monitoramento da Esporulação**			**Esporos** (UFC.mL^{-1})
	7 dias	**10 dias**	**14 dias**	
1 (SELLA,1995)	40%	60%	90%	2,8 x 10^8
2 (PINTO;SAITO,1992)	50%	70%	90%	4,0 x 10^8
3 (CAZEMIER et al,2001)- 8% ágar nutriente	Ausência	Ausência	Ausência	-
4 (CAZEMIER et al,2001)- 8% ágar nutriente	Ausência	Ausência	Ausência	-
5 (PINTO;SAITO,1992) -meio líquido sem agitação	10%	20%	40%	2,4 x 10^5
6 (PINTO;SAITO,1992)-meio líquido com agitação	Ausência	Ausência	Ausência	-

A literatura relata uma produção de esporos de *Bacillus subtilis* de 1,0 x 10^5 esporos.mL^{-1} (CAYUELA *et al*.,1993) a 7,4 x 10^9 esporos.mL^{-1} (MONTEIRO *et al*., 2005), com o uso de diferentes cepas e diferentes processos de cultivo. Porém estes trabalhos não relatam o volume do diluente na recuperação dos esporos provenientes do meio sólido, prejudicando a comparação da quantidade (nº de esporos.mL $^{-1}$) relatada com as obtidas nos experimentos.

Embora os meios nº 1 e nº 2 tenham apresentado resultados semelhantes, o meio nº 2 (extrato de levedura, caldo nutriente, $MnSO_4$, $CaCl_2$ e ágar) foi escolhido como meio de referência para a produção de esporos por apresentar menor quantidade de constituintes na sua composição, facilitando o seu preparo e reduzindo os custos. Este é um fator relevante visando à produção de esporos destinados à fabricação de indicadores biológicos em escala industrial.

2.3 INTERFERÊNCIA DO SUPORTE E DA EMBALAGEM NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DO INDICADOR BIOLÓGICO

2.3.1 Introdução

Os materiais de suporte (onde os esporos são depositados) e as embalagens interferem na resistência térmica e na estabilidade dos indicadores biológicos. Esporos expostos ao calor seco, depositados em diferentes materiais, mostram diferentes termorresistência, a qual decresce na seguinte ordem: areia, vidro e papel (MOLIN, 1982).

Os indicadores biológicos para esterilização pelo calor seco são comercialmente apresentados na forma de fitas de papel absorvente inoculadas com esporos (papelotes), embaladas em envelopes de papel e acompanhadas do meio de recuperação. As tiras de papel apresentam as seguintes vantagens: são de baixo custo, tamanho pequeno e fácil manuseio, o que permite um melhor acondicionamento do indicador biológico junto à carga a ser esterilizada.

A metodologia de inoculação e de secagem dos esporos deve garantir a viabilidade e a termorresistência dos esporos aderidos ao suporte utilizado. O processo de secagem dos papelotes inoculados pode causar oxidação e desidratação dos esporos, resultando numa desnaturação protéica e alteração da sua permeabilidade, tornando-o mais sensível à ação do calor (PENNA *et al.,* 2002).

Penna *et al.* (1996) demonstraram que o tratamento prévio das tiras de papel com acetato de cálcio conferem aumento da estabilidade e da termorresistência dos esporos do *Bacillus stearothermophilus.*

Alderton e Snell (1969) descreveram que esporos depositados em vidro de borossilicato, por evaporação, aderem fortemente ao vidro, dificultando a sua recuperação e, conseqüentemente, interferindo nos resultados dos testes de resistência térmica, que dependem da contagem dos esporos viáveis.

Este experimento buscou a escolha do melhor diluente, suporte e embalagem visando à produção de um indicador biológico para esterilização pelo calor seco que atenda aos requisitos normativos de qualidade.

2.3.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 19 .

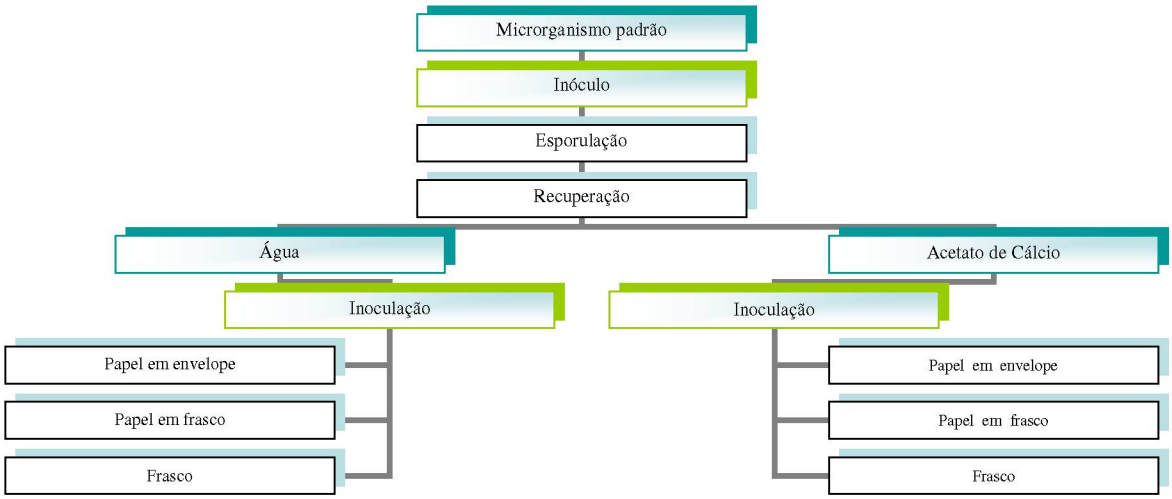


FIGURA 19 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A DETERMINAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO SUPORTE E DA EMBALAGEM NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DO IB

FONTE: O AUTOR

2.3.2.1 Microrganismo

Utilizou-se *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, Lote-1403349, cepa padrão fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/MS, Brasil).

2.3.2.2 Inóculo

O inóculo foi preparado a partir de 50 µL da suspensão de esporos, obtida do lote 01/05-CPPI (2,5 x 10^8 UFC.mL^{-1}) adicionados a 30 mL de caldo de soja tripticaseína. O meio foi incubado a 36ºC ± 2ºC, por 18 horas. A taxa de inoculação foi de 1%(*v/v*).

2.3.2.3 Suspensão de esporos

Os cultivos foram realizados em duas garrafas de leite, cada uma contendo 80 mL do meio de esporulação: extrato de levedura, 0,8%; caldo nutriente, 0,4%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005%; $CaCl_2.6H_2O$, 0,005%; ágar, 3,0%, pH ajustado para 7,0 ± 0,2 com NaOH 0,1N. A temperatura de incubação foi 35ºC ± 3ºC e o tempo foi 14 dias. Os esporos foram retirados do ágar de forma asséptica e recuperados na solução diluente gelada. Filtrados, lavados com os diluentes testados por 3 vezes em centrífuga refrigerada a 4ºC a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos. Suspensos em 50 mL da solução diluente. As suspensões foram submetidas a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes. Foram utilizados dois diluentes: (1) água destilada estéril, pH 7,0; (2) solução estéril de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7(ajustado com hidróxido de cálcio 0,14%).

2.3.2.4 Indicadores biológicos

Foram preparados com diferentes formas de apresentação:

a) papel: 10 µL das suspensões de esporos (N_o= 5,0 10^8 UFC.mL^{-1}) preparadas com os dois diluentes (1=água destilada e 2=sol.acetato) foram inoculados em fitas estéreis de papel de filtro qualitativo de 48 g /m^2 medindo 2,5cm x 1,0 cm. Os papelotes foram previamente tratados com solução de acetato de cálcio 0,02M pH 11,0 (ajustado com hidróxido de cálcio), secos por 2 horas em câmara de fluxo laminar e mantidos por 18 horas a 24 horas em estufa a 45ºC. As fitas inoculadas foram secadas novamente em estufa a 45ºC por 24 horas e posteriormente acondicionadas assepticamente em:
   - (a) frascos de vidro de 7 mL, fechados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio (papelotes em frasco);
   - (b) envelopes de 4 cm^2, confeccionados com embalagem de dupla face constituída de papel grau cirúrgico e filme laminado em poliéster com polipropileno, fechados por termoselagem , autoclavados a 121ºC por 30 minutos e secos em estufa a 45°C por 24 horas (papelotes em envelope).
b) vidro: 10 µL das suspensões de esporos preparadas com os dois diluentes (1=água destilada e 2=sol.acetato) foram inoculados diretamente em frascos de vidro de 7 mL. Os frascos inoculados foram secos em estufa a 45ºC por 24

horas e posteriormente fechados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio.

Os indicadores biológicos produzidos foram mantidos a 5ºC ± 2ºC. Como referência foi utilizado o indicador biológico para calor seco da marca CEFAR, Lote: H7623, constituído de papelote embalado em envelope de papel, acompanhado de tubo de ensaio contendo 4 mL de meio de recuperação (FIGURA 20). Apresentando N_o= 1,1 x 10^6 UFC/unidade, $D_{160ºC}$ = 2,23 min e U_{sk}= 14,0 min (valores informados pelo fabricante).

FIGURA 20 - INDICADOR BIOLÓGICO COMERCIAL UTILIZADO COMO REFERÊNCIA
FONTE: O AUTOR (2007)

2.3.2.5 Meio de recuperação

Como meio de recuperação foi utilizado: caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018%; amido solúvel 0,1%; púrpura de bromocresol 0,001%; água destilada q.s.p., pH 6,7 (PARANÁ, 2003). O meio foi envasado assepticamente no volume de 3 mL em frasco-ampola de vidro neutro, estéril com capacidade para 7 mL. Armazenados a 5ºC ± 3ºC.

2.3.2.6 Resistência térmica

A resistência térmica dos esporos foi testada em estufa com circulação de ar, pré-aquecida por no mínimo 30 minutos. Foram expostas 10 unidades do indicador, à temperatura de 160ºC ± 2ºC, sob diferentes tempos de exposição (USP 29, 2006): 35, 30, 25, 20, 15 e 10 minutos. Os indicadores testados foram cultivados de forma asséptica no meio de recuperação, incubados a 36ºC ± 2ºC, por até 7 dias. O teste foi realizado em triplicata. O valor de *D* (tempo de redução decimal) e U_{sk} (tempo médio de morte) foram calculados pelo método da fração negativa e pelo método de Spearman-Kaber (USP 29, 2006), segundo as equações:

$$D_{160^{\circ}C} = \frac{U_{sk}}{\log N_0 + 0{,}2507} \qquad (1)$$

$$U_{sk} = U_k - 2{,}5 - \left[0{,}5x \sum_{i=1}^{k-1} \frac{r_i}{10} \right] \qquad (2)$$

Onde:

N_0= Número de microrganismos viáveis no IB;

U_{sk} = tempo médio de morte de Spearman-Kaber (tempo médio necessário para matar toda população microbiana do teste);

U_k= Menor tempo em que houve morte de todas as amostras;

r_i = número de amostras que apresentaram crescimento negativo.

Obs: Nos cálculos utiliza-se o "r" até o último tempo que apresentar amostras com crescimento positivo.

2.3.3 Resultados e discussões

A avaliação da interferência da embalagem e do suporte na termorresistência do produto final foi realizada submetendo-se esporos, suspensos

em dois diferentes diluentes (água e acetato de cálcio), colocados em diferentes suportes (vidro e papel) e acondicionados em dois tipos de embalagem (frasco e envelope de papel grau cirúrgico e filme laminado em poliéster com polipropileno), ao teste de resistência térmica (FIGURA 21).

FIGURA 21 - INDICADORES BIOLÓGICOS EM DIFERENTES SUPORTES E EMBALAGENS: PAPEL EM FRASCO; VIDRO E PAPEL EM ENVELOPE

FONTE: O AUTOR (2007)

Os resultados dos tempos de redução decimal (*D*) e dos tempos médio de morte (U_{sk}) obtidos estão demonstrados na TABELA 5.

TABELA 5 - TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL (*D*) E TEMPO MÉDIO DE MORTE (U_{sk}) POR SUPORTE / EMBALAGEM E DILUENTE DOS ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

Suporte/ Embalagem	**Diluente**	***No*** (UFC/ unidade)	**1º teste**		**2ºteste**		**3ºteste**		**Média**	
			D (min)	U_{sk} (min)	***D*** (min)	U_{sk} (min)	***D*** (min)	U_{sk} (min)	***D*** (min)	U_{sk} (min)
Vidro	Acetato	$1,9 \times 10^6$	2,7	17,5	4,1	27,1	4,1	26,9	3,6	23,8
Vidro	Água	$1,0 \times 10^7$	3,0	21,5	3,1	22,1	3,6	21,7	3,2	21,8
Papelote/ Frasco	Acetato	$1,0 \times 10^6$	3,6	22,1	4,4	27,5	4,9	31,9	4,3	27,2
Papelote / Frasco	Água	$6,2 \times 10^6$	3,1	21,5	3,9	27,5	4,5	27,2	4,0	25,4
Papelote / Envelope	Acetato	$1,6 \times 10^6$	2,9	18,7	1,8	12,4	1,5	9,9	2,1	13,7
Papelote / Envelope	Água	$3,3 \times 10^6$	2,8	18,6	1.9	12,4	1,4	8,1	2,0	13,0
IB referência (Papelote em Envelope)	-	$1,1 \times 10^6$	2,1	13,0	1,5	12,5	2,0	12,7	1,9	12,7

A aplicação da análise das variâncias (ANOVA) nos resultados de *D* obtidos (TABELA 6) forneceu para o Teste F um *p* menor que 0,05, indicando que os

resultados de *D* dos IB nas três diferentes embalagens testadas são estatisticamente diferentes.

TABELA 6 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES DILUENTES, SUPORTES E EMBALAGENS

Fonte	**Soma dos quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado das médias**	**F**	**Valor de *p***
Entre grupos	12,7633	2	6,3816	15,90	0,0002
Dentro dos grupos	6,0216	15	0,4014		
Total	18,7849	17			

Os resultados obtidos também foram submetidos à estratificação:

a) pela forma de apresentação: suporte e embalagem;

b) pelo tipo de diluente.

A aplicação do teste *t* de Student nos resultados estratificados por tipo de suporte e embalagem (TABELA 7, FIGURA 22) demonstrou que IB embalados em frasco apresentam maior resistência do que os embalados em envelope e que não há diferença significativa entre os IB embalados em frasco, independente do tipo de suporte (próprio frasco ou papel).

TABELA 7 - TESTE *t*-STUDENT DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES APRESENTAÇÕES: SUPORTES E EMBALAGENS

Apresentação	***t***	**Graus de liberdade**	**Valor de *p***	**95% de Confiança**	**Conclusão**
Vidro x papelote em frasco	1,75	10	0,11	1,44 a 0,17	Não há uma diferença significativa nos resultados
Vidro X papelote em envelope	5,35	10	0,00003	1,18 a 2,86	Há uma diferença significativa nos resultados. A embalagem "vidro" indica maior eficácia, devido *p* ter sido significativo à esquerda do intervalo.
Papelote em frasco x papelote em envelope	3,86	10	0,003	0,59 a 2,18	Há uma diferença significativa nos resultados, e que a embalagem "papelote em frasco" indica maior eficácia devido *p* ter sido significativo à esquerda do intervalo.

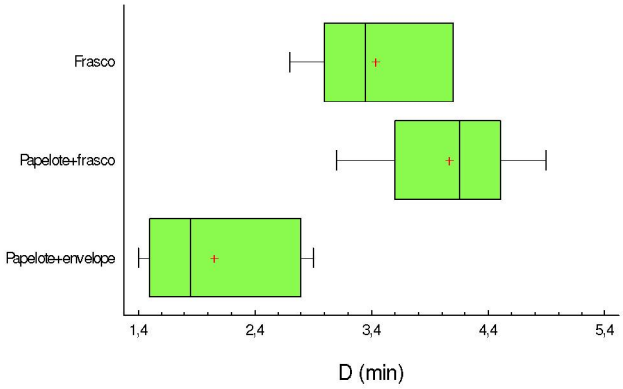


FIGURA 22 - BOX E WISKER PLOT DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES SUPORTES E EMBALAGENS

Uma maior resistência térmica nos IB embalados em frasco já era esperada devido à própria barreira térmica da embalagem, relacionada à espessura do vidro e ao ar no seu interior (FIGURA 23). O IB deve ser considerando um "sistema" constituído pelo "esporo + suporte + embalagem", e o acréscimo obtido do valor de *D*, de 2,0 min (média dos IB embalados em envelope) para 3,2 min (média dos IB embalados em frasco), é desejável quando se objetiva avaliar um processo de esterilização com longo tempo de exposição (60 minutos).

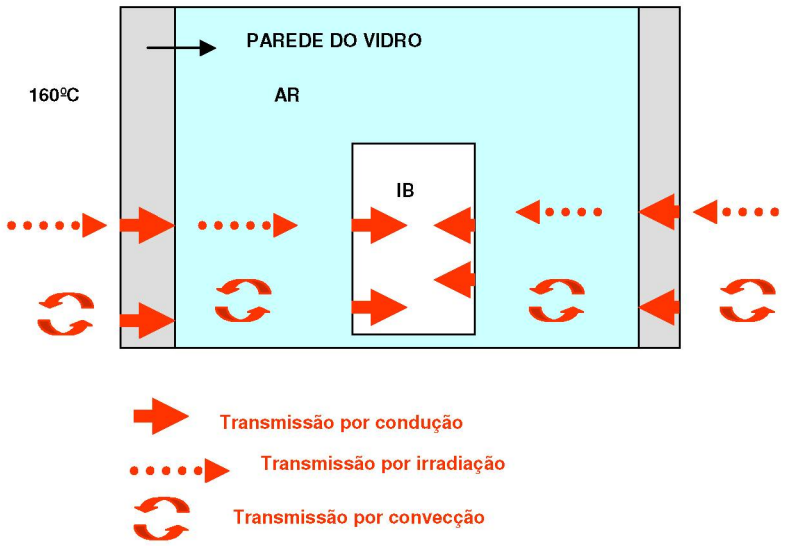


FIGURA 23 - LEI DE FOURIE DE TRANSMISSÃO DO CALOR:

FONTE: O AUTOR (2007)

NOTA - O calor flui da face de temperatura maior para a face de temperatura menor

Embora operacionalmente a produção em papelote represente uma etapa a mais no processo de produção, esta tem a vantagem de permitir a visualização do produto envasado e facilitar o envase manual. A adição da suspensão de esporos diretamente no frasco, num volume de 10 uL, apresentou dificuldade na visualização do produto durante o envase, podendo levar à dupla inoculação ou à ausência de inoculação, bem como dúvidas ao consumidor quanto à presença do produto (FIGURA 24). Esta forma de apresentação apenas seria vantajosa para envase automatizado.

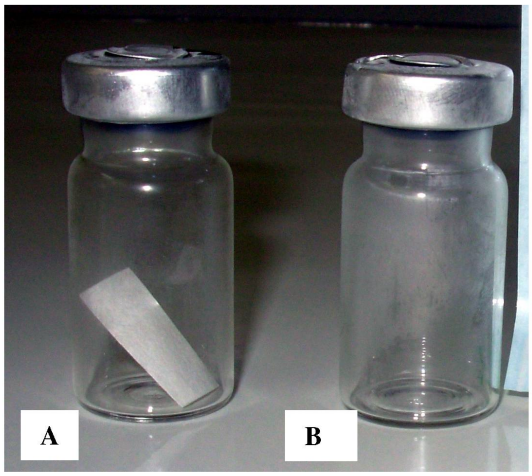


FIGURA 24 - INDICADOR BIOLÓGICO: (A) INOCULADO NO PAPEL E ACONDICIONADO EM FRASCO; (B) INOCULADO NO FRASCO

FONTE: O AUTOR (2007)

A estratificação dos resultados pelo tipo do diluente da suspensão de esporos seguida da aplicação do teste *t* de Student (TABELA 8) demonstrou que não há diferença estatisticamente significativa nos resultados, embora em média o valor de *D* para os IB preparados com esporos suspensos em acetato (3,3 min) tenha sido levemente maior que as dos IB preparados com esporos suspensos em água (3,1 min), como demonstrado na FIGURA 25.

TABELA 8 - TESTE *t*-STUDENT E TESTE F DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM SUSPENSÕES DE ESPOROS EM DIFERENTES DILUENTES

		Graus de liberdade	**Valor de *p***	**95% de confiança**	**Conclusão**
Teste F	F= 0,65	8	0,56	0,15 a 2,89	
Teste *t*-Student	*t*=-0,59	16	0,56	1,37 a 0,77	Não há uma diferença significativa nos resultados

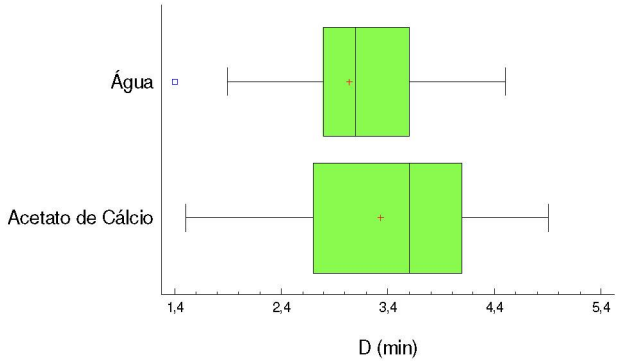


FIGURA 25 - BOX E WISKER PLOT DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE IB PRODUZIDOS COM DIFERENTES DILUENTES

A solução de acetato de cálcio foi escolhida como diluente padrão objetivando uma maior estabilidade do produto, não estudada neste experimento. Segundo Schmidt (1955), esporos envelhecidos em suspensões aquosas têm sua capacidade de germinação reduzida com o tempo, enquanto esporos mantidos em solução de glicose-acetato, ou fosfato germinam facilmente quando induzidos pela adição de extrato de levedura. Beaman e Gerhardt (1986) demonstraram que a resistência térmica dos esporos também é atribuída a sua mineralização e que esporos calcificados são mais resistentes que esporos naturais. Alderton e Snell (1969) descreveram o preparo de esporos termorresistentes a partir da sua forma desmineralizada, utilizando o acetato de cálcio 0,02M para reposição mineral.

A imersão das tiras de papel, utilizadas como suporte, na solução de acetato de cálcio 0,02M é justificada pela sua capacidade de reposição dos íons Ca^{+2} e H^{+} na estrutura das fibras de celulose, melhorando a sua homogeneidade, favorecendo a distribuição dos esporos através delas, protegendo-os das mudanças ambientais e aumentando a estabilidade do IB (PENNA, 2002).

2.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO PARA RECUPERAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR

2.4.1 Introdução

Esporos danificados exigem condições especiais de cultivo e o meio para a sua recuperação deve assegurar o seu pleno desenvolvimento. A composição do meio de recuperação afeta o resultado dos métodos de detecção e de determinação da resistência química e térmica dos esporos.

Alguns esporos não são totalmente inativados pelos processos térmicos, mas sim danificados de forma subletal. Cazemier *et al.* (2001) citam que os efeitos primários das lesões subletais nos esporos são no sistema de germinação ou no crescimento das células vegetativas, devido à inativação de enzimas e proteínas. A extensão destas lesões pode ser estabelecida pelo estudo da recuperação destes esporos em um meio ótimo.

Na presença de água e de agentes indutores (como dipicolinato de cálcio, alanina, glicose, frutose e íons inorgânicos) que penetram pela capa danificada, através de receptores específicos, e ativam uma enzima lítica, os esporos quebram a sua dormência (LOSIK, 1986; PAIDHUNGAT; SETLOW, 2000). A célula absorve água acompanhada de potássio e magnésio, conduzindo a uma germinação imediata (KUJALA; KAUPPINEN, 1982).

Os meios de recuperação são constituídos basicamente de: peptona de caseína (principal proteína do leite, fonte de nitrogênio protéico), peptona de soja ou outros digestos ou extratos. Em geral fornecem carboidratos, íons inorgânicos, purinas e pirimidinas (componentes do ácido nucléico para facilitar o crescimento populacional), vitaminas essenciais, aminoácidos e peptídeos (fonte de nitrogênio nutricional). Os carboidratos encontrados nestes extratos e digestos estão em pequenos traços e são suplementariamente adicionados de outras fontes de carbono para melhorar as características dos níveis de crescimento do meio. A glicose é um exemplo de fonte de carbono facilmente metabolizada, provendo energia sem a necessidade que o microrganismo gaste sua própria energia com a quebra das moléculas de fontes de carbono mais complexas (HUI *et al.*, 2002).

Foester (1983) obteve excelente germinação com uma solução de extrato de levedura e fosfato de sódio, cita também a valina e leucina como os aminoácidos

mais eficientes e a glicose como o açúcar mais efetivo para a estimulação da germinação.

O fosfato de potássio fornece o fosfato necessário para o processo metabólico e o cloreto de sódio é um suplemento adicionado para modular a força (pressão) osmótica do meio. Sasaki *et al.* (2000) citam que a presença de cálcio no meio reconhecidamente afeta a resistência térmica e a germinação de esporos do gênero *Bacillus,* sendo este indispensável para a recuperação de esporos afetados pelo calor. Porém altas concentrações de cálcio adicionadas ao meio de cultura podem induzir à formação de fosfato de cálcio, ao reagir com o ácido fosfórico proveniente do fosfato de potássio do meio. O fosfato de cálcio não é utilizável pelo microrganismo.

A interferência do uso de corantes como indicador de pH no meio de recuperação, para detectar o crescimento bacteriano antes do surgimento da turbidez do meio de cultura, é controversa. Brown e Gaze (1988) demonstraram que a presença de púrpura de bromocresol no meio de recuperação dos esporos que sofreram ação do calor (com a função de indicador de crescimento) reduz a sua capacidade de recuperação. Porém, Lopez *et al.* (1996) e Smith *et al.* (1982) observaram que o cloreto de sódio e o corante púrpura de bromocresol não inibem o crescimento quando utilizados em baixas concentrações (0,06% e 0,0015%, respectivamente). Lopez *et al.* (1997) e Schmidt (1955) citam que meios contendo amido solúvel (substância capaz de absorver inibidores da germinação) são os melhores para a recuperação de esporos danificados pelo calor. A utilização do azul de bromotimol é citada por Pinto e Saito (1992) e por Capasso (1991).

A composição do meio de recuperação/ revelação, principalmente quanto à presença de substâncias indutoras da germinação, pode aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de incubação e leitura do teste biológico para verificação do processo de esterilização.

O CPPI já vem produzindo indicador biológico para esterilização a vapor sob pressão, com esporos do *Geobacillus stearothermophilus,* utilizando o corante púrpura de bromocresol como indicador de pH. É desejável que um outro produto a ser inserido na mesma área de produção apresente características diferentes quanto à coloração, como um fator a mais para evitar trocas, principalmente pelo usuário. Este experimento buscou a otimização de um meio de cultura para a recuperação de esporos danificados de *Bacillus atrophaeus* visando à padronização da produção de

indicador biológico para esterilização pelo calor seco e ao atendimento aos requisitos de qualidade do produto.

2.4.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 26.

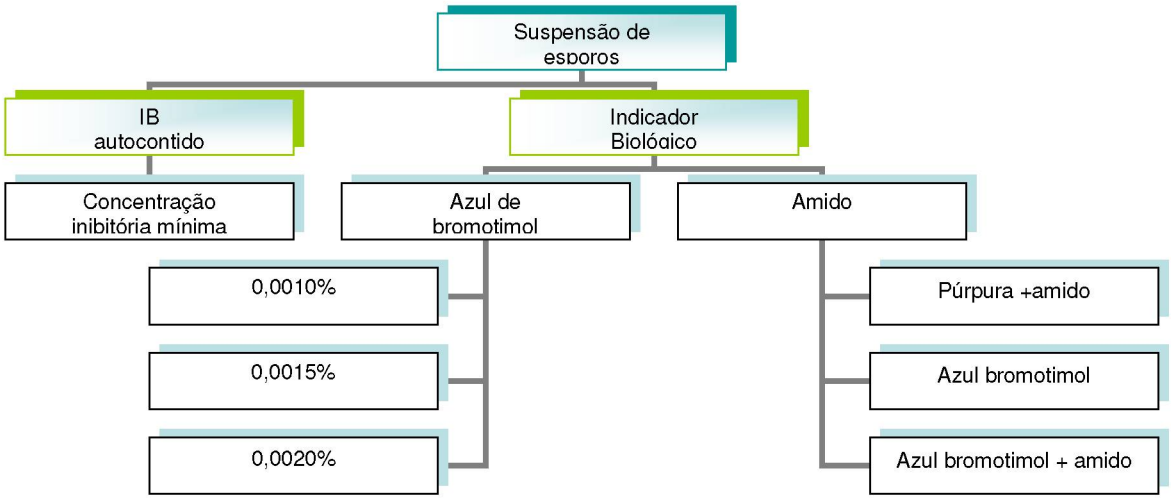


FIGURA 26 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA RECUPERAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR

FONTE: O AUTOR

2.4.2.1 Microrganismo

Ulitlizou-se uma suspensão de esporos do *Bacillus atrophaeus* Lote 02/05-CPPI, contendo 1,0 x 10^9 UFC .mL^{-1} esporos.

2.4.2.2 Determinação da concentração inibidora mínima do azul de bromotimol

Para verificação da concentração inibidora do azul de bromotimol na germinação de esporos do *Bacillus atrophaeus* foram formulados nove meios de recuperação contendo: glicose, 0,5%; cloreto de cálcio bihidratado 0,018%; triptona, 1,0%, amido solúvel 0,1% e azul de bromotimol nas concentrações de (1) 0,001%, (2) 0,002% e

(3) 0,003%, com pH corrigido com HCl 0,1N para: (a) 6,2; (b) 6,4 e (c) 6,8. Em cada 100 mL de meio foi inoculado 50 µl da suspensão de esporos diluída 1/1000, de modo a obter a concentração final de 1,5 x 10^3 UFC/ 3,0 mL de meio de recuperação. O meio contendo esporos foi agitado em agitador magnético por 30 minutos e envasado assepticamente no volume de 3,0 mL, em frasco-ampola de vidro neutro, estéril, com capacidade para 7 mL. Armazenados a 5 ºC ± 3ºC. Dez frascos de cada lote foram submetidos à pasteurização, em banho-maria, a 65ºC, por uma hora (exceto os frascos-controle). Todos os frascos foram incubados em estufa com circulação de ar, a 36ºC ± 2ºC, por 48 horas. O crescimento positivo foi evidenciado pela mudança de coloração dos meios (de verde para amarelo) e pela turvação.

2.4.2.3 Indicadores biológicos

Para este experimento foram utilizados 10 lotes de indicadores biológicos, originados de diferentes suspensões de esporos do *Bacillus atrophaeus:* Lotes: 01/05-CPPI e 01/06-CPPI, suspensos em água destilada; e Lotes: A 01/05-CPPI, M2/06 e V1/06, suspensos em solução de acetato de cálcio 0,02M.

Os indicadores foram produzidos em três formas de apresentação: frasco (suspensão inoculada diretamente no frasco-ampola); papelote em frasco (suspensão inoculada em papel de filtro e embalada em frasco-ampola) e papelote embalado em envelope, conforme demonstrado na TABELA 9.

TABELA 9 – INDICADORES BIOLÓGICOS UTILIZADOS NOS TESTES PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE RECUPERAÇÃO

Lote	**Suspensão de origem**	***No*** (UFC.mL^{-1})	**IB Suporte/Embalagem**	**IB** (UFC/unidade)
1	1/05	1,4 x 10^8	Frasco	5,9 x 10^5
2	1/05	1,4 x 10^8	Papelote em Frasco	6,2 x 10^5
3	A1/05	2,1 x 10^8	Frasco	2,2 x 10^6
4	A1/05	2,1 x 10^8	Papelote em Frasco	1,4 x 10^6
5	01/06	8,0 x 10^7	Frasco	2,9 x 10^5
6	M2/06	4,2 x 10^8	Frasco	2,0 x 10^6
7	V1/06	1,6 x 10^8	Frasco	1,2 x 10^5
8	1/05	1,4 x 10^8	Papelote em Envelope	5,5 x 10^5
9	A1/05	2,1 x 10^8	Papelote em Envelope	3,2 x 10^6

2.4.2.4 Interferência da concentração de azul de bromotimol na resistência térmica.

Para verificação da concentração ideal do azul de bromotimol, foi determinada a resistência térmica de nove lotes de IB, utilizando um meio de recuperação contendo: glicose, 0,5%; cloreto de cálcio bihidratado 0,018%; amido solúvel 0,1%; triptona, 1,0% e azul de bromotimol nas concentrações de (1) 0,001%, (2) 0,0015% e (3) 0,002%, com pH corrigido para 6,8 com HCl 0,1N.

2.4.2.5 Interferência do amido

Para a escolha do melhor meio de recuperação foram avaliadas três diferentes formulações: (1) Meio referência: caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018%; amido solúvel 0,1%; púrpura de bromocresol 0,001% (PARANÁ, 2005); (2) Glicose, 0,5%; cloreto de cálcio bihidratado 0,018%; triptona, 1,0%; azul de bromotimol 0,002%; (3) Caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018%; amido solúvel 0,1%; azul de bromotimol 0,002%, todos com pH ajustado para 6,8 com HCl 0,1N.

2.4.2.6 Contagem do número de células viáveis

Para cada amostra foi realizada uma diluição seriada decimal, seguida de inoculação por microgotas em superfície (50 µL por diluição, três diluições por placa), em duplicata, em ágar de soja tripticaseína, incubadas por 18 a 24 horas a 36ºC ± 2ºC. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias.

2.4.2.7 Resistência térmica

A resistência térmica dos esporos foi testada em estufa com circulação de ar, pré-aquecida por no mínimo 30 minutos. Foram expostas 10 unidades do indicador, à temperatura de 160ºC± 2ºC, sob diferentes tempos de exposição (USP 29, 2006): 35, 30, 25, 20, 15 e 10 minutos, para esporos acondicionados em frasco e 15', 12'30", 10' , 7'30" e 5' para esporos acondicionados em envelopes. Os indicadores testados foram cultivados de forma asséptica no meio de recuperação e incubados a

36ºC ± 2ºC, por até 7 dias. O teste foi realizado em duplicata. O valor de *D* (tempo de redução decimal) e U_{sk} (tempo médio de morte) foram calculados pelo método da fração negativa e pelo método de Spearman-Kaber (USP 29, 2006). Como controle, foram utilizadas três unidades do indicador biológico da marca Esporofar, produzido pela CEFAR Diagnóstica, lote H7623, N_0= 1,1 x 10^6 UFC/unidade, $D_{160ºC}$= 2,23 min e U_{sk}= 14,0 min. As fitas foram incubadas no meio de cultivo fornecido pelo fabricante.

2.4.3 Resultados e discussões

A formulação de um meio de cultivo, para ser utilizado como parte de um indicador biológico de esterilização, deve buscar a ausência de substâncias inibidoras e a presença de outras que promovam a recuperação de esporos, como o amido.

O azul de bromotimol quando adicionado ao meio promove uma fácil identificação do crescimento bacteriano, devido à mudança de coloração promovida pela alteração do pH, facilitando a leitura do indicador biológico e evitando sub-cultivos para verificação de crescimento. Porém, sua concentração deve ser cuidadosamente estudada para não interferir na viabilidade e nos resultados da avaliação da resistência térmica do produto.

O corante azul de bromotimol em solução ácida (pH ≤ 6,0) fica amarelo, em solução neutra verde e azul em solução básica (pH ≥ 7,6). É encontrado na concentração de 0,002% a 0,008% na composição de meios de cultivo, como o CLED (identificação de uropatógenos) e o Ágar Citrato de Simmons (identificação de enterobactérias). Pinto e Saito (1992) utilizaram o meio caldo caseína-soja adicionado de azul de bromotimol na concentração 0,0025% para a detecção de formas viáveis de *Bacillus atrophaeus*, após contato dos esporos com o agente esterilizante óxido etileno, e não observaram inibição de crescimento. O teste de viabilidade permitiu determinar a concentração do corante a partir da qual a inibição do crescimento é facilmente caracterizada (TABELA 10).

TABELA 10 - VIABILIDADE DOS ESPOROS DO *Bacillus Atrophaeus,* APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE BROMOTIMOL NO MEIO DE RECUPERAÇÃO E EM DIFERENTES pH

Lote	**Conc.de azul de bromotimol** (%)	**pH**	**% de frascos-teste com crescimento positivo**	**% de frascos-controle com crescimento positivo**
01	0,001	6,2	100	100
02	0,001	6,4	100	100
03	0,001	6,8	100	100
04	0,002	6,2	100	100
05	0,002	6,4	100	100
06	0,002	6,8	100	100
07	0,003	6,2	0	100
08	0,003	6,4	0	100
09	0,003	6,8	0	100

Os resultados obtidos demonstraram que as concentrações de 0,001% e 0,002% do azul de bromotimol no meio de recuperação não inibiram o crescimento do *Bacillus atrophaeus,* enquanto que a concentração de 0,003% inibiu o crescimento em 100%. A variação do pH na faixa de 6,2 a 6,8 nos meios de recuperação não interferiu na viabilidade dos esporos, porém o pH 6,8 foi o que forneceu a melhor coloração ao meio para permitir a diferenciação visual da ausência (FIGURA 27 A) e da presença de crescimento (FIGURA 27 B).

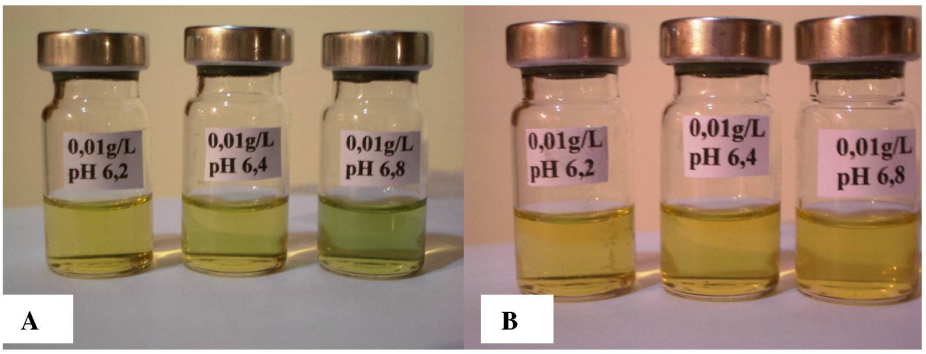


FIGURA 27 - MEIO DE RECUPERAÇÃO, CONTENDO ESPOROS, COM DIFERENTES pH : (A) ANTES DA INCUBAÇÃO; (B) APÓS INCUBAÇÃO

FONTE: O AUTOR (2006)

.

Para a avaliação da interferência da concentração de azul de bromotimol na resistência térmica, foram testadas três concentrações (abaixo da concentração inibitória do crescimento determinada) frente a nove lotes de indicadores biológicos submetidos ao teste de resistência térmica.

TABELA 11 - INTERFERÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AZUL DE BROMOTIMOL NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

Concentração/ Amostras	**0,001%**		**0,0015%**		**0,002%**	
	D (min)	***U_{sk}*** (min)	***D*** (min)	***U_{sk}*** (min)	***D*** (min)	***U_{sk}*** (min)
1	3,8	22,5	3,4	20,1	2,9	17,1
2	4,9	29,8	4,9	29,8	5,0	30,4
3	4,1	26,7	4,0	26,0	3,4	22,1
4	4,7	29,9	5,0	31,8	4,2	26,7
5	5,4	30,9	5,6	32,0	5,4	30,9
6	4,1	31,5	5,0	38,4	4,8	36,9
7	6,0	32,5	6,1	33,0	5,8	31,4
8	2,0	12,2	2,1	12,6	1,1	6,8
9	2,1	14,0	1,9	12,9	1,7	11,5
Média	**4,1**	**25,6**	**4,2**	**26,3**	**3,8**	**23,8**

A análise da variância dos resultados obtidos (TABELA 12) forneceu um valor de $p > 0,05$ tanto para *D* (tempo de redução decimal) quanto para U_{sk} (tempo médio de morte), demonstrando que não há diferença significativa nos resultados em um nível de confiança de 95%.

TABELA 12 - ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS (ANOVA) DOS RESULTADOS DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* RECUPERADOS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE BROMOTIMOL

Fonte	**Soma dos quadrados**		**Df**		**Quadrado das médias**		**F**		**Valor de *p***	
	D	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***
Entre grupos	0,82	30,58	2	2	0,4137	15,2933	0,18	0,19	0,8342	0,8307
Dentro dos grupos	54,34	1963,43	24	24	2,2641	81,8097				
Total	52,16	1994,02	26	26						

A representação gráfica dos resultados obtidos através da menor diferença significativa da média de Fischer - *Least Significant Difference* ou LSD (FIGURA 28), confirma a similaridade e demonstra que a concentração 0,0015% foi a que apresentou maior média dos resultados para *D* e para U_{sk}.

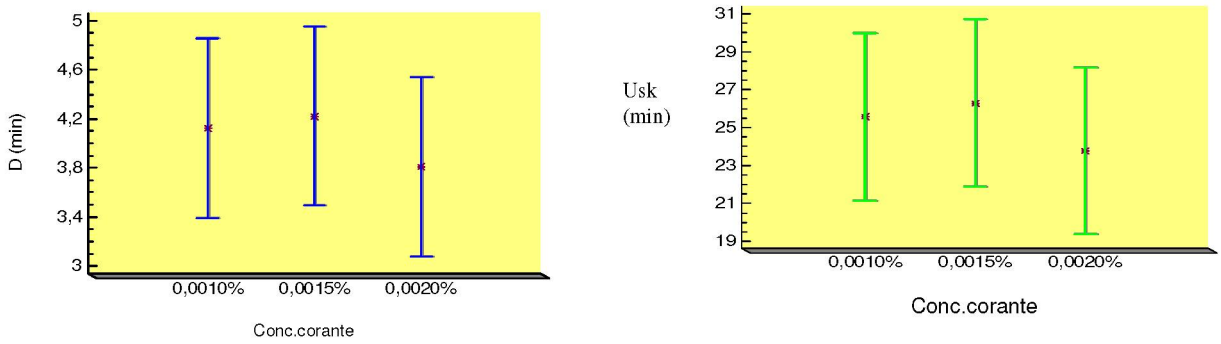


FIGURA 28 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER (LSD) PARA O TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL(*D*) E O TEMPO DE MÉDIO MORTE (U_{SK}) FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE BROMOTIMOL NO MEIO DE RECUPERAÇÃO

A determinação da resistência térmica de diferentes lotes de esporos em meio de cultivo na ausência e na presença de amido pode demonstrar a ocorrência ou não da interferência desta substância na recuperação de esporos do *Bacillus atrophaeus* danificados pelo calor seco. Foram testados seis lotes de IB frente a diferentes meios de recuperação: (1) CPPI, contendo amido e púrpura de bromocresol como indicador; (2) sem amido e com azul de bromotimol como indicador e (3) com amido e com azul de bromotimol como indicador. Os resultados estão demonstrados na TABELA 13.

TABELA 13 - TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL(*D*) E TEMPO MÉDIO DE MORTE (U_{SK}) x MEIOS DE RECUPERAÇÃO: (1)CPPI; (2) AZUL DE BROMOTIMOL; (3) AZUL DE BROMOTIMOL+AMIDO

Meio/	**1**		**2**		**3**	
Amostra	***D*** (min)	U_{sk} (min)	***D*** (min)	U_{sk} (min)	***D*** (min)	U_{sk} (min)
1	4,1	26,5	3,4	27,5	4,2	27,5
2	3,7	26,7	3,0	21,9	3,0	23,5
3	4,3	27,1	4,4	27,5	4,4	27,3
4	3,9	27,5	3,9	27,5	3,9	27,5
5	1,9	12,5	1,8	12,5	1,9	12,5
6	1,8	12,3	1,3	11,9	1,9	12,5
Média	3,3	22,1	3,0	20,5	3,2	21,6
Controle	1,5	12,5	-	-	-	-

A análise da variância dos resultados obtidos (TABELA 14) forneceu um valor de $p > 0,05$ para *D* (tempo de redução decimal) e para U_{sk} (tempo médio de morte), demonstrando que não há diferença significativa nos resultados em um nível

de confiança de 95%. Porém a adição de amido no meio 3 (meio azul de bromotimol) forneceu *D* em média 7,0 % maior *e* U_{sk}, em média 5,4% maior.

TABELA 14 - TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL(*D*) E TEMPO MÉDIO DE MORTE (U_{SK}) x MEIOS DE RECUPERAÇÃO: (1)PURPURA DE BROMOCRESOL +AMIDO; (2) AZUL DE BROMOTIMOL; (3) AZUL DE BROMOTIMOL+AMIDO

Fonte	**Soma dos quadrados**		**Df**		**Quadrado das médias**		**F**		**Valor de *p***	
	D	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***	***D***	***U_{sk}***
Entre grupos	0,33	7,814	2	2	0,1672	3,9072	0,13	0,07	0,8829	0,9308
Dentro dos grupos	19,97	813,288	15	15	1,3313	54,2192				
Total	20,30	821,102	17	17						

Os resultados obtidos (ausência de efeito positivo na recuperação de esporos danificados pelo calor), FIGURA 29, não confirmaram o descrito na literatura por:

a) Cook e Gilbert (1968), que observaram uma maior recuperação de esporos danificados com a adição de amido e carvão no meio AAMS (Antibiotic Assay Médium);

b) López *et al.* (1996), que demonstraram que a adição de amido ao meio de cultivo melhora as condições de recuperação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus ;*

c) Gonzalez *et al.* (1997), que afirmaram que a adição de 0,1% de amido ao meio de recuperação resultou em um aumento significativo da contagem de algumas cepas do *Bacillus cereus;*

d) Brown e Gaze (1988),que obtiveram de melhores resultados na recuperação de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* provenientes de papelotes aquecidos a submetidos ao vapor sob pressão a 121ºC por até 5 minutos quando cultivados em meio contendo amido.

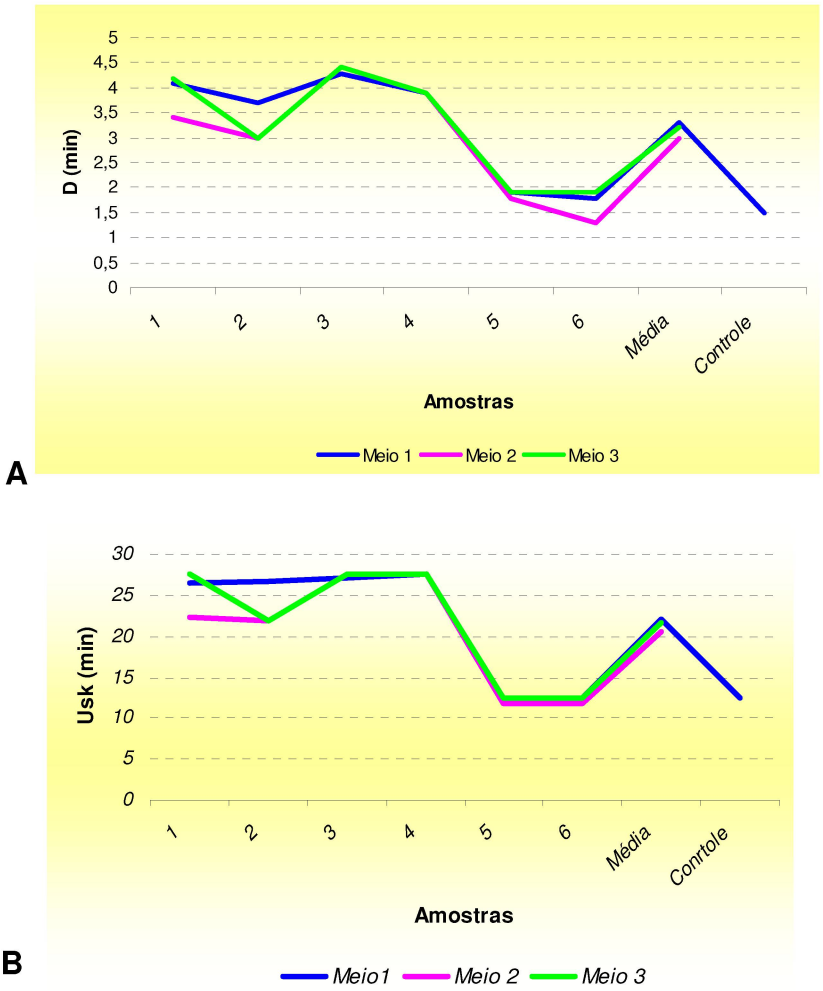


FIGURA 29 – INTERFERÊNCIA DO AMIDO E DO INDICADOR DE pH NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO: (A) TEMPO DE REDUÇÃO DECIMAL-*D*; (B) TEMPO MÉDIO DE MORTE -U_{SK}. MEIO 1: PURPURA DE BROMOCRESOL+AMIDO; MEIO 2: AZUL DE BROMOTIMOL SEM AMIDO; MEIO 3: AZUL DE BROMOTIMOL+AMIDO

O motivo para a não observação de uma maior recuperação de esporos danificados com a adição de amido neste experimento pode ter sido a utilização de IBs recém produzidos, provavelmente com uma maior capacidade de recuperação em relação a IBs armazenados por seis meses ou mais, o que pode ter influído na demonstração da interferência positiva do amido. Sugerimos a continuidade deste experimento com amostras de IBs com tempo de produção superior a seis meses (9, 12 e 18 meses) para verificação da influencia do amido na recuperação de esporos danificados em relação ao tempo de produção do indicador biológico.

2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CONTAGEM TOTAL DE ESPOROS VIÁVEIS EM INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO, EM SUBSTITUIÇÃO À METODOLOGIA OFICIAL (USP)

2.5.1 Introdução

Entre os testes de performance dos indicadores biológicos para a esterilização, a Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) recomenda o teste de "Contagem de Esporos Viáveis", que é a determinação do número de organismos viáveis em uma unidade de volume, de uma suspensão ou suporte inoculado, estimado pelo crescimento de colônias sob determinadas condições de cultivo (ISO, 2006). As técnicas oficiais indicam o uso do ágar de soja tripticaseína como meio de cultivo e a aplicação de tratamento térmico à amostra antes da contagem de colônias.

O tratamento prévio das amostras serve a dois propósitos: eliminar as formas não esporuladas e quebrar a sua dormência, aumentando a sua capacidade de germinação em condições favoráveis (CURRAN; EVANS, 1945; BEAMAN *et al.*,1988).

Schimdt (1955) cita que a proporção de esporos que respondem a pré-ativação térmica depende da temperatura e tempo do tratamento térmico, composição do meio de cultivo, temperatura na qual os esporos foram formados e temperatura do cultivo para germinação. Algumas pesquisas afirmam que esporos recém preparados expostos às condições de germinação não germinam eficientemente a não ser que tenham sido anteriormente expostos a condições de ativação, como o tratamento térmico (COOK; BROWN, 1964; FOESTER, 1983; LOSICK, 1986). Porém, Beaman *et al.* (1988) demonstraram que, embora o choque térmico afete a permeabilidade e a resistência dos esporos, a presença de substâncias específicas ativa a germinação, independente do choque térmico.

Hang *et al.*(2005) não observaram alterações na germinação do *Bacillus cereus* após choque térmico até 70ºC por 30 minutos, porém a temperatura de 80ºC inibiu o crescimento.

Este experimento objetivou determinar a significância da interferência do choque térmico na germinação de esporos produzidos para uso como indicador biológico para esterilização e avaliar a correspondência entre os resultados das

contagens de colônias, obtidos com semeadura por *pour-plate* e por microgotas na superfície do ágar. A otimização da metodologia oficial permitirá redução do consumo de placas, meio de cultura, horas trabalhadas, tempo de incubação com conseqüente reflexo no consumo de energia e redução do custo do produto.

2.5.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 30.

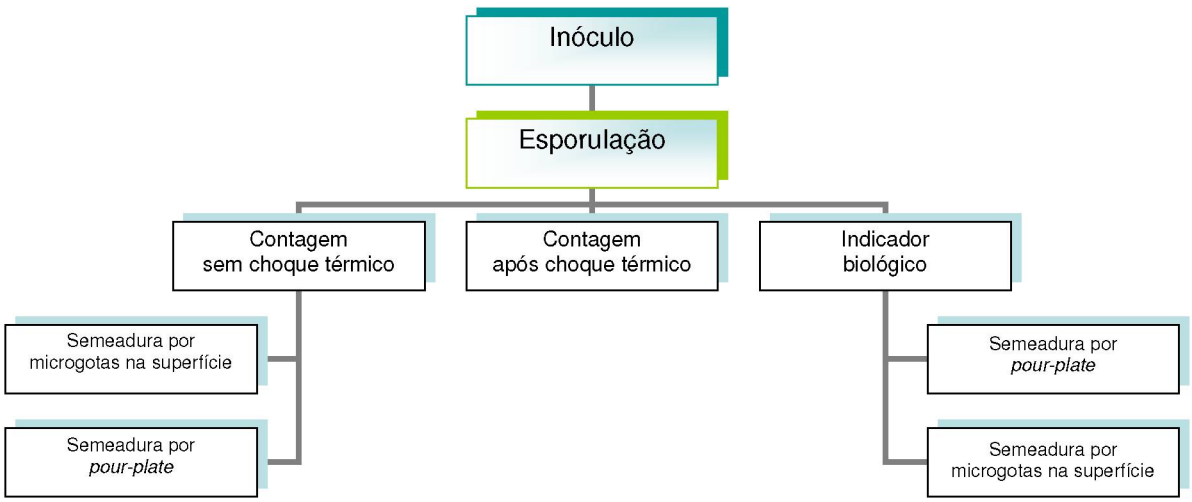


FIGURA 30 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CONTAGEM TOTAL DE ESPOROS VIÁVEIS

FONTE: O AUTOR

2.5.2.1 Inóculo

O Inóculo foi produzido pela semeadura de 100 µL da suspensão de esporos em tubo com 30 mL de caldo de soja tripticaseína. Incubado por 18 horas a 36ºC ± 2ºC.

2.5.2.2 Esporulação

O volume de 1% do inóculo foi semeado em 400 mL de ágar para esporulação, em garrafa de Roux. Incubado por 10 dias a 14 dias a 36ºC ± 2ºC. O acompanhamento da esporulação foi feito por esfregaço em lâmina corada pela coloração de Gram. Os esporos foram retirados do ágar com movimentos leves, com auxílio de um bastão de vidro e suspensos em solução estéril de acetato de cálcio 0,02 M. Filtrados em funil com gaze e algodão, lavados por três vezes em centrífuga refrigerada a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos a 4ºC, recuperados em 50 mL de água destilada gelada (SELLA, 1995). As suspensões foram submetidas a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes. Envasados no volume de 5 mL em frasco-ampola de vidro neutro, estéril, de 7 mL. Armazenados a 5ºC ± 3ºC. A padronização e controle de qualidade foram realizados, em diferentes diluições, pela contagem de esporos viáveis, pesquisa de contaminantes e determinação da resistência térmica conforme USP (USP 29,2006) e ISO 11.1380 (ISO, 2006).

Ágar para esporulação: extrato de levedura, 8,0 g; caldo nutriente, 4,0 g; sulfato de manganês tetra-hidratado, 0,05 g; cloreto de cálcio hexa-hidratado, 0,05 g; ágar bacteriológico, 30,0 g e água destilada q.s.p. 1000,0 mL. pH 7,0 ± 0,2 (PINTO ;SAITO , 1992). Para avaliação da influência do tempo de produção foram utilizadas suspensões de esporos produzidas como descrito, padronizadas e armazenadas no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos/SESA-PR.

2.5.2.3 Preparo dos indicadores biológicos

Diferentes concentrações de esporos foram diluídas no meio de recuperação contendo: caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bi-hidratado, 0,018%; amido solúvel 0,1%; azul de bromotimol 0,0015% e/ou vermelho de fenol 0,0017%, pH 6,8 ± 0,1. Envasados assepticamente no volume de 3 mL em frasco-ampola de vidro neutro, estéril, de 7 mL. Armazenados a 5ºC ± 3ºC (PARANÁ, 2005). O controle de qualidade foi realizado pela contagem de esporos viáveis, pesquisa de contaminantes e determinação da resistência térmica, conforme USP (USP 29, 2006) e ISO 11.1380 (ISO, 2006). Também foram utilizadas duas amostras do IB autocontido da marca Sterikon -MERCK.

2.5.2.4 Contagem total do número de esporos viáveis

Para cada amostra, sem e após choque térmico, foi realizada uma diluição seriada decimal, seguida de inoculação, em duplicata, pelo método de *pour plate* (1,0 mL da diluição em cada placa), incubadas a 36ºC ± 2ºC por 24 horas a 48 horas e pelo método de inoculação de microgotas em superfície (50 µL da diluição, três diluições por placa), em duplicata ,incubadas a 36ºC ± 2ºC por 18 horas a 24 horas. O resultado foi considerado como a média das contagens de colônias obtidas.

2.5.2.5 Choque térmico

As amostras da primeira diluição receberam um tratamento térmico de 85ºC por 10 minutos e posteriormente foram resfriadas em banho de gelo.

2.5.3 Resultados e discussões

Sendo os esporos metabolicamente dormentes, vários fatores devem ser considerados quando se deseja sua plena germinação, como ocorre na determinação da quantidade de esporos viáveis presentes em uma suspensão. O tratamento ou choque térmico é o estimulador da germinação mais citado na literatura.

A metodologia para a quantificação de esporos viáveis envolve muitas variáveis. A composição do meio é citada como principal fator que irá ativar os mecanismos de germinação, diferentes tipos e marcas de meio de cultura podem afetar significativamente os resultados (SHINTANI *et al.*,2000). Outros fatores também podem ter influência na avaliação da capacidade germinativa dos esporos, tais como: a homogeneização da amostra e das diluições; a temperatura e o pH do meio de cultivo; o tempo e a temperatura de esterilização do meio; a calibração das micropipetas e o uso inadequado de técnicas assépticas. A padronização e validação do método utilizado são fundamentais para garantir a reprodutibilidade e a qualidade dos resultados.

Na primeira etapa deste experimento oito suspensões de esporos do *Bacillus atrophaeus* foram submetidas à determinação do número de células viáveis, antes e após o choque térmico, pelo método de *pour-plate*. Os resultados, descritos

na TABELA 15, demonstraram que, embora o tratamento térmico tenha promovido uma inibição da germinação de esporos do *Bacillus atrophaeus* na maioria das amostras, esta não foi significativa. A aplicação do Teste F forneceu F= 1,02; p = 0,98; intervalo de confiança = 0,20 a 5,10; indicando que não existe diferença estatisticamente significante entre os dois resultados num nível de confiança de 95%. A aplicação do teste *t*-Student forneceu: t= 0,19; p = 0,85, intervalo de confiança = - 6,0 x 10^8 a 7,1 x 10^8. Confirmando que, com 95% de confiança, não há uma diferença significativa entre as metodologias. A média da relação sem tratamento/ após tratamento foi de 1,2 ± 0,3, estando este valor dentro da variação da metodologia , citada pela USP como entre 0,5 a 3,0.

TABELA 15 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*, SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, PELO MÉTODO DE *POUR PLATE*

Amostra/Lote	**Sem tratamento térmico** (UFC.mL^{-1})	**Após tratamento térmico** (UFC.mL^{-1})	**Relação S/A (sem trat./após tratamento)**
1/A-CPPI 01/05	2,5 x 10^8	1,4 x 10^8	1,8
2/A-CPPI A-1/05	2,9 x 10^8	2,1 x 10^8	1,4
3/A-CPPI 01/05	2,3 x 10^8	2,0 x 10^8	1,2
4/A-CPPI-A-01/05	3,0 x 10^8	2,6 x 10^8	0,9
5/A-CPPI-02/05	1,3 x 10^8	1,4 x 10^8	1,1
6/A-CPPI-A- 02/05	1,6 x 10^9	1,5 x 10^9	1,1
7/A-CPPI-02/05	1,0 x 10^9	8,8 x 10^8	1,0
8/A-CPPI-A -02/05	1,5 x 10^9	1,5 x 10^9	1,2
x(média)	6,6 x 10^8	6,0 x 10^8	1,2
variância	3,7 x 10^{17}	3,6 x 10^{17}	0,1
Desvio padrão	6,1 x 10^8	5,2 x 10^8	0,3

Com a finalidade de verificar se a capacidade de germinação dos esporos suspensos em caldo nutritivo e indicador de pH (IB autocontido), sem e após tratamento térmico, apresenta diferença em relação ao que foi observado na suspensão de esporos, nove amostras de IB autocontido foram submetidas à determinação do número de células viáveis, antes e após o choque térmico, pelo método de *pour-plate*.

Os resultados obtidos demonstraram que, neste caso, o tratamento térmico também promoveu uma redução da germinação de esporos do *Bacillus atrophaeus*. Entretanto, com a aplicação do Teste F (TABELA 16) obteve-se: F= 2,9; p =0,12; intervalo de confiança = 0,73 a 11,81, demonstrando que não existe diferença

estatisticamente significativa entre as duas amostras num nível de confiança de 95%. A aplicação do teste *t*-Student forneceu: *t*= 0,5293; *p* = 0, 60, intervalo de confiança = - 9,2 x 10^4 a 1, x 10^5. Concluindo, com 95% de confiança, que não há uma diferença significativa nas metodologias. A média da relação sem tratamento/ após-tratamento foi de 1,8 ± 0, 8, estando este valor dentro da variação da metodologia de contagem de colônias (0,5 a 3,0).

TABELA 16 - CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS INDICADORES BIOLÓGICOS, SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, PELO MÉTODO DE *POUR-PLATE*

Amostra/Lote	**Sem tratamento térmico** (UFC.mL^{-1})	**Após tratamento térmico** (UFC.mL^{-1})	**Relação S/A (sem trat./ após trat.)**
1/A-CPPI-01/05 Púrpura de bromocresol	1,9 x 10^4	1,2 x 10^4	1,6
2/A-CPPI-01/05 Vermelho de fenol	1,4 x 10^5	9,4 x 10^4	1,5
3/A-CPPI-c02/05 Vermelho de fenol	4,1 x 10^2	3,7 x 10^2	1,1
3/A-CPPI-c03/05 Vermelho de fenol	2,9 x 10^2	1,2 x 10^2	2,4
4/A-CPPI-c02/05 Púrpura de bromocresol	3,9 x 10^5	2,1 x 10^5	1,9
5/A-CPPI-c03/05 Púrpura de bromocresol	7,8 x 10^4	2,0 x 10^5	3,9
6/A-CPPI-c01/05 AzuL de bromotimol	4,4 x 10^2	3,4 x 10^2	0,9
7/A-CPPI-c03/05 AzuL de bromotimol.	3,4 x 10^2	1,6 x 10^2	2,1
8/A-CPPI-c02/05 AzuL de bromotimol	4,2 x 10^5	2,0 x 10^5	2,1
9/A-CPPI-c04/05 AzuL de bromotimol.	1,2 x 10^5	1,4 x 10^5	0,9
x(média)	1,2 x 10^5	8,6 x 10^4	1,8
variância	2, 6x 10^{10}	8,8 x 10^9	0,8
desvio padrão	1,6 x 10^5	9, x 10^4	0,9

A demonstração gráfica destes resultados através do diagrama de Box-e-Wisker Plot , (FIGURA 31) mostra a semelhança dos resultados obtidos, e que o choque térmico não promoveu um aumento significativo da germinação.

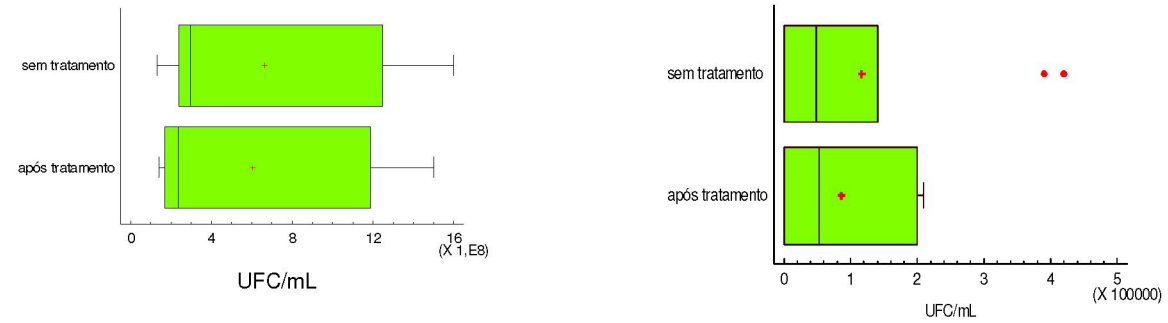


FIGURA 31 - BOX-E-WHISKER PLOT DA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DO *Bacillus atrophaeus*: (A) SUSPENSÃO DE ESPOROS; (B) INDICADOR BIOLÓGICO

Resultados semelhantes também foram obtidos por Turnbull *et al*. (2007), que ao comparar a contagem de esporos viáveis de *Bacillus anthracis,* antes e após o tratamento térmico com diferentes tempos e temperaturas, observaram que a maioria das contagens após tratamento até 80ºC foram inferiores, porém não significativamente diferentes.

Reich *et al*. (1979) confirmaram que não há diferenças na contagem de esporos recém preparados, sem e após choque térmico. Esta diferença só foi observada em função do tempo de armazenamento. Obtiveram uma relação S/A de 1,4 e 2,5 para amostras de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* armazenadas por até 24 meses em freezer e a temperatura ambiente, respectivamente. Gould (2005) também citou que a inativação pode ocorrer durante o tempo de armazenamento.

Objetivando verificar o comportamento dos esporos do *Bacillus atrophaeus* frente ao armazenamento, foram testadas nove amostras, com diferentes tempos de produção, variando entre 13 dias a 11 meses. Os resultados estão demonstrados na TABELA 17.

TABELA 17 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*, COM DIFERENTES TEMPOS DE PRODUÇÃO, SEM E APÓS-TRATAMENTO TÉRMICO

Nº	Lote	Tempo de Produção	Sem tratamento térmico (UFC.mL^{-1})	Após tratamento térmico (UFC.mL^{-1})	Relação S/A
1	A-CPPI 01/05	13 dias	2,5 x 10^8	1,4 x 10^8	1,8
2	A-CPPI Acetato01/05	13 dias	2,9 x 10^8	2,1 x 10^8	1,4
3	A-CPPI-02/05	22 dias	1,3 x 10^8	1,4 x 10^8	0,9
4	A-CPPI-Acetato 02/05	22 dias	1,6 x 10^9	1,5 x 10^9	1,1
5	A-CPPI 01/05	11 meses	2,3 x 10^8	2,0 x 10^8	1,2
6	A-CPPI-Acetato 01/05	11 meses	3,0 x 10^8	2,6 x 10^8	1,2
7	A-CPPI-02/05	11 meses	1,0 x 10^9	8,8 x 10^8	1,1
8	A-CPPI-Acetato 02/05	11 meses	1,5 x 10^9	1,5 x 10^9	1,0

A relação S/A para esporos do *Bacillus atrophaeus*, estocados entre 13 dias e 11 meses, não demonstrou uma relação significativa entre o tempo de produção e a ação do tratamento térmico, nas amostras analisadas (FIGURA 32). A análise de um maior número de amostras, com intervalos de tempo de produção entre 15 dias e 24 meses é necessária para a confirmação desta observação.

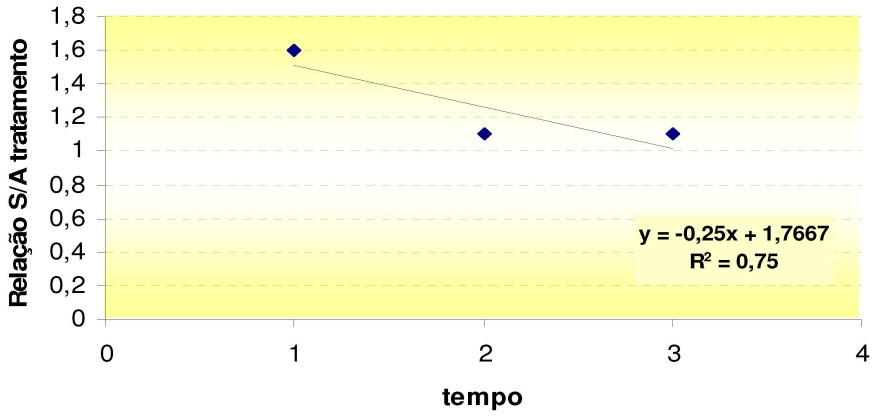


FIGURA 32 – RELAÇÃO: CONTAGEM DE COLÔNIAS SEM TRATAMENTO TÉRMICO/ APÓS TRATAMENTO TÉRMICO, DO *Bacillus atrophaeus,* POR TEMPO DE PRODUÇÃO: (1) 13 DIAS; (2) 22 DIAS; (3) 330DIAS

A quantificação de células viáveis por diluição decimal seguida de cultivo por *pour-plate*, além de trabalhosa, demanda grande quantidade de material de consumo (meios, placas, etc) e um tempo de incubação de até 48 horas. Para a

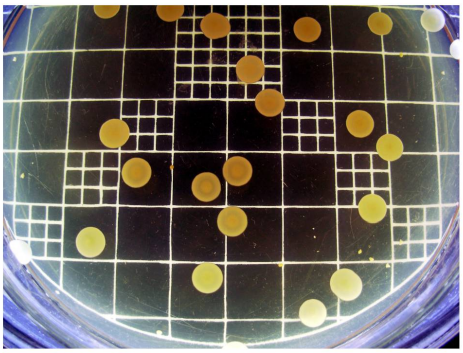
inclusão da metodologia de inoculação em superfície do ágar no controle de processo e no controle de qualidade do produto final, foi realizada a validação deste método frente ao oficial, através da semeadura simultânea de 11 amostras, contendo diferentes concentrações de esporos, pelos dois métodos. Os resultados estão demonstrados na TABELA 18.

TABELA 18 – CONTAGEM DE COLÔNIAS DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus,* POR SEMEADURA : *POUR-PLATE* E MICROGOTAS EM SUPERFÍCIE

Amostras		**Semeadura**	
	Lote Nº	**Superfície** (UFC.mL^{-1})	***Pour-plate*** (UFC.mL^{-1})
1	19	1,60 x 10 ^{4}	2,7 x 10 ^{4}
2	11	2,40 x 10 ^{4}	3,9 x 10 ^{4}
3	06	1,8 x 10 ^{5}	3,5 x 10 ^{5}
4	15	4,3 x 10 ^{5}	5,0 x 10 ^{5}
5	20	5,1 x 10 ^{6}	7,7 x 10 ^{6}
6	07	1,0 x 10 ^{6}	1,0 x 10 ^{6}
7	22	3,5 x 10 ^{7}	4,1 x 10 ^{7}
8	23	3,5 x 10 ^{7}	4,1 x 10 ^{7}
9	17	2,2 x 10 ^{8}	1,9 x 10 ^{8}
10	21	1,0 x 10 ^{8}	1,8 x 10 ^{8}
11	04	8,0 x 10 ^{7}	5,6 x 10 ^{7}
	Média	4,3 x 10 ^{7}	4,7 x 10 ^{7}
	Variância	5,1 x 10 ^{6}	7,7 x 10 ^{6}
	Desvio padrão	4,7 x 10 ^{15}	5,1 x 10 ^{15}

A aplicação do Teste F forneceu: F= 1,5393; *p* =0,5075; intervalo de confiança = 0,4142 a 5,7213, demonstrando que não existe diferença estatisticamente significante entre os resultados das duas metodologias num nível de confiança de 95%. A aplicação do teste *t*-Student forneceu: *t*= 0,4113; *p* = 0,6851; intervalo de confiança = -3,2 x 10^6 a 4,8 x 10^6. Concluindo, com 95% de confiança, que não há uma diferença significativa nos resultados.

O método de inoculação na superfície em ágar apresentou maior facilidade de execução e leitura (FIGURA 33).



A

B

FIGURA 33 - CONTAGEM DE COLÔNIAS: (A) *POUR-PLATE;* (B) SEMEADURA EM SUPERFÍCIE
FONTE: O AUTOR (2007)

A formação de colônias grandes e difusas, que podem tornar-se confluentes, impossibilitando a contagem, citada por Everal e Morris (1978) não foi observada. Provavelmente o menor tempo de incubação impediu esta formação. A metodologia da semeadura em superfície também facilita a identificação de contaminantes das suspensões do *Bacillus atrophaeus*, evitando erros de contagem.

2.6 PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO

2.6.1 Introdução

A produção de indicadores biológicos para esterilização deve atender à legislação vigente, com ênfase na Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998, que determina a todos os estabelecimentos que fabriquem produtos para diagnóstico para uso *in vitro* o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelas "Boas Práticas de Fabricação e Controle em Estabelecimentos de Produtos para Diagnóstico para uso *in vitro*. O capítulo seis determina que estas empresas devem ter um Manual de Produção, onde estejam definidos por escrito as fórmulas padrão, matérias prima e materiais de embalagem (qualidade e quantidade), assim como procedimentos detalhados de produção, controle e garantia de qualidade para cada produto. Quando possível, o manual deve ser preparado para um tamanho padrão de lote. Para cada lote de produto intermediário ou final, deve ser preparado um protocolo de produção. No mesmo devem estar registradas a fórmula padrão, as informações e dados complementares da produção.

De acordo com sua política da qualidade: “Produzir e pesquisar em busca da excelência”, o CPPI se propõe a produzir imunobiológicos que atendam às Normas da Organização Mundial de Saúde e às recomendações das Boas Práticas de Fabricação, a fim de garantir qualidade e segurança aos usuários de seus produtos.

O sistema de qualidade do CPPI, certificado pela NBR ISO 9000:2000, possui três níveis de documentação: Manual da Qualidade; Procedimentos Gerenciais e Procedimentos Operacionais Padrões (POPs). Todo produto deve atender às determinações deste sistema de qualidade e possuir:

1) Procedimento Operacional Padrão de Produção (POP): visando garantir a padronização e a reprodutibilidade do processo;
2) Fluxograma de Produção;
3) Protocolo de Produção: onde são registrados todas as matérias-prima, equipamentos, processos e análises da produção de um lote, assegurando a sua rastreabilidade
4) Instrução de uso;

5) Material de embalagem e rotulagem de acordo com as exigências legais.

Novos produtos devem ter os seus processos de produção validados pela produção de três lotes distintos e consecutivos, como também devem atender aos requisitos para estudo de estabilidade (PARANÁ, 2006).

Os indicadores biológicos para esterilização são isentos de registro na ANVISA (RDC 260/2002), porém o fabricante não é isento da autorização de funcionamento e está sujeito às fiscalizações inerentes à sua atividade.

As normas internacionais para a avaliação da qualidade dos Indicadores Biológicos para esterilização são descritas na Farmacopéia Americana (USP), na ISO 11.138-1 *Sterilization of health care products- Biological indicators* e pela FDA - *Premarket notification* [5210(k)] *for Biological Indicators Intended to Monitor Sterilizers used in Health Care Facilities.*

2. 6. 2 Material e métodos

2.6.2.1 Elaboração dos documentos

Para a padronização da produção foram elaborados: Fluxograma de produção; Procedimento Operacional Padrão; Protocolo de Produção; Instrução de uso e material de embalagem.

2.6.2.2 Produção do primeiro lote experimental

Realizada de acordo com o padronizado nos Procedimentos Operacionais de Produção elaborados.

2.6.2.3 Validação do tempo de incubação para leitura

Foram submetidas a um tratamento térmico sub-letal 50 unidades do IB: exposição por 32 minutos e 30 segundos ao calor seco à temperatura de 160ºC ± 2ºC. Após resfriamento cada uma foi cultivada com 3 mL do meio de recuperação a ser testado (Lote 1E/07) em ambiente asséptico.Incubadas a 36ºC ± 2ºC, com leitura diária do crescimento por até sete dias, de acordo com o POP 14.00.07-CPPI - Validação do Tempo de Incubação (PARANÁ, 2007).Como controle:

a) Foram expostas ao mesmo tratamento 10 fitas de IB comercial (CEFAR, lote: E 9334) as quais foram anteriormente acondicionadas na mesma forma de embalagem dos IB testados (frasco de vidro com tampa de borracha e lacre) e cultivadas no meio de recuperação a ser testado;
b) Foram expostas mais 10 fitas do IB produzido (L 01E/07) e, posteriormente, cultivadas no meio de recuperação fornecido no kit do IB comercial (CEFAR, lote: E 9334).

2.6.2.4 Estudo de estabilidade

Foram separadas e identificadas 1000 unidades do Lote 01E/07 (1000 papelotes e 1000 frascos com meio de recuperação), sendo:

a) 500 amostras mantidas em câmara fria a 5ºC ± 3ºC;
b) 500 amostras mantidas em estufa com circulação de ar 36ºC ± 2ºC.

As amostras serão analisadas após 3, 6, 12, 18, 24 e 36 meses de armazenamento, quanto à viabilidade e resistência térmica.

2.6. 3 Resultados e discussão

Visando a padronização do processo de produção foram elaborados, em caráter experimental, os seguintes documentos:

Procedimento Operacional Padrão de Produção da Suspensão de Esporos do *Bacillus atrophaeus* (ver modelo no ANEXO 1);

a) Protocolo de Produção da Suspensão de Esporos do *Bacillus atrophaeus*;
b) Fluxograma de Produção da Suspensão de Esporos do *Bacillus atrophaeus* (FIGURA 35);
c) Procedimento Operacional Padrão de Produção do Indicador Biológico para Calor Seco (ver modelo no ANEXO 2);
d) Protocolo de Produção do Indicador Biológico para Calor Seco ;
e) Fluxograma de Produção do Indicador Biológico para Calor Seco (FIGURA 36);
f) Instrução de Uso do Indicador Biológico para Calor Seco (ANEXO 3);
g) Modelo de Embalagem e Rotulagem (FIGURA 34).

A produção do primeiro lote experimental da suspensão de esporos foi realizada de acordo com o fluxograma elaborado (FIGURA 35) e o Procedimento Operacional Padrão de Produção. Apresentando os seguintes resultados:

- Lote Experimental: E 01/07 ;
- Data de Fabricação: 11/06/2007 (data do envase);
- Contagem de colônias: N_o= 1,2 x 10^9 UFC/mL;
- Contaminantes: Ausência de colônias com características morfológicas diferentes das do *Bacillus atrophaeus*;
- Nº de frascos produzidos: 11 frascos com 3 mL.

O lote de indicador biológico preparado para o controle de qualidade da suspensão de esporos apresentou:

- N_o = 4,0 x 10^7 UFC/ unidade (papelote);
- Viabilidade: 100% de crescimento em 24 horas;
- Termorresistência:

U_{sk} = 32,1 ± 1,0 min.;

D= 4,1 ± 0,1 min.;

T_s (tempo de sobrevivência)= 24 ± 0,8 min.;

T_m (tempo de morte total) = 47 ± 1,5 min.

Todo o processo de produção foi registrado no Protocolo de Produção da Suspensão de Esporos do *Bacillus atrophaeus*.Os resultados obtidos atenderam aos critérios de aceitação do produto, descritos no POP.

A produção do primeiro lote experimental do Indicador Biológico para Calor Seco - CPPI foi realizada de acordo com o fluxograma elaborado (FIGURA 36) e o Procedimento Operacional Padrão de Produção do Indicador Biológico para Calor Seco, apresentando os seguintes resultados:

- Lote Experimental: 01E/07;
- Data de Fabricação: 14/08/2007 (data do envase);
- Suspensão de Esporos de Origem: CPPI 01E/07;
- N_o= 4,0 x 10^6 UFC/ unidade (papelote);
- Contaminantes: Ausência de colônias com características morfológicas diferentes das do *Bacillus atrophaeus.*
- Viabilidade: 100% de crescimento em 24 horas;

- Termorresistência:

U_{sk} = 37,4 ± 1,5 min.;

D= 5,5 ± 0,3 min.;

T_s (tempo de sobrevivência)= 26,7 ± 1,2 min.;

T_m (tempo de morte total) 59,7 ± 2,7 min.;

- Nº de unidades produzidas: 2.000.

Todo o processo de produção foi registrado no Protocolo de Produção do Indicador Biológico para Calor Seco. Os resultados obtidos atenderam aos critérios de aceitação do produto, descritos no POP.

No teste para a validação do tempo de incubação, o Lote 01E/07 apresentou 50% de crescimento nas primeiras 24 horas e 72% de crescimento em 48 horas, mantendo esta taxa até o sétimo dia. O controle da fita produzida +meio comercial apresentou 70% de crescimento nas primeiras 24 horas e 80% de crescimento em 48 horas. O controle "fita comercial + meio produzido" apresentou 10% de crescimento nas primeiras 24 horas, 70% de crescimento em 48 horas e 80% de crescimento em 4 dias. Estes resultados indicam que o teste foi válido por ter promovido entre 30% a 80% de crescimento, e que o tempo de leitura final tende a ser 48 horas de incubação. Serão necessários mais dois testes, com diferentes lotes de produção para que estas observações possam ser confirmadas e o tempo de incubação validado.

A estabilidade do produto varia de acordo com a temperatura de armazenamento, alguns fabricantes recomendam 2ºC a 8ºC, outros a temperatura ambiente (ver TABELA 2). Os prazos de validade dos produtos similares variam entre 12 meses a 24 meses. Reich e Morien (1982) não observaram diferenças significativas na população de esporos do *Bacillus stearothermophilus (Geobacillus stearothermophilus)* e do *Bacillus subtilis* após um ano de armazenamento a 20ºC em umidade relativa de 0 a 55% .Young e Setlow (2004) relacionaram a viabilidade dos esporos à umidade relativa do ambiente de armazenamento. Porém, cabe ao fabricante determinar o prazo de validade e as condições de armazenamento e transporte do produto, as quais estão relacionadas à metodologia de produção e principalmente à forma de apresentação e à embalagem primária. A análise dos resultados dos ensaios de resistência térmica e viabilidade de três lotes

consecutivos, armazenados em diferentes temperaturas (5ºC ± 3ºC e 36ºC ± 2ºC), permitirão a definição do armazenamento adequado e o estabelecimento do prazo de validade deste produto.

FIGURA 34 - INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO : PRIMEIRO LOTE EXPERIMENTAL

FONTE: O AUTOR (2007)

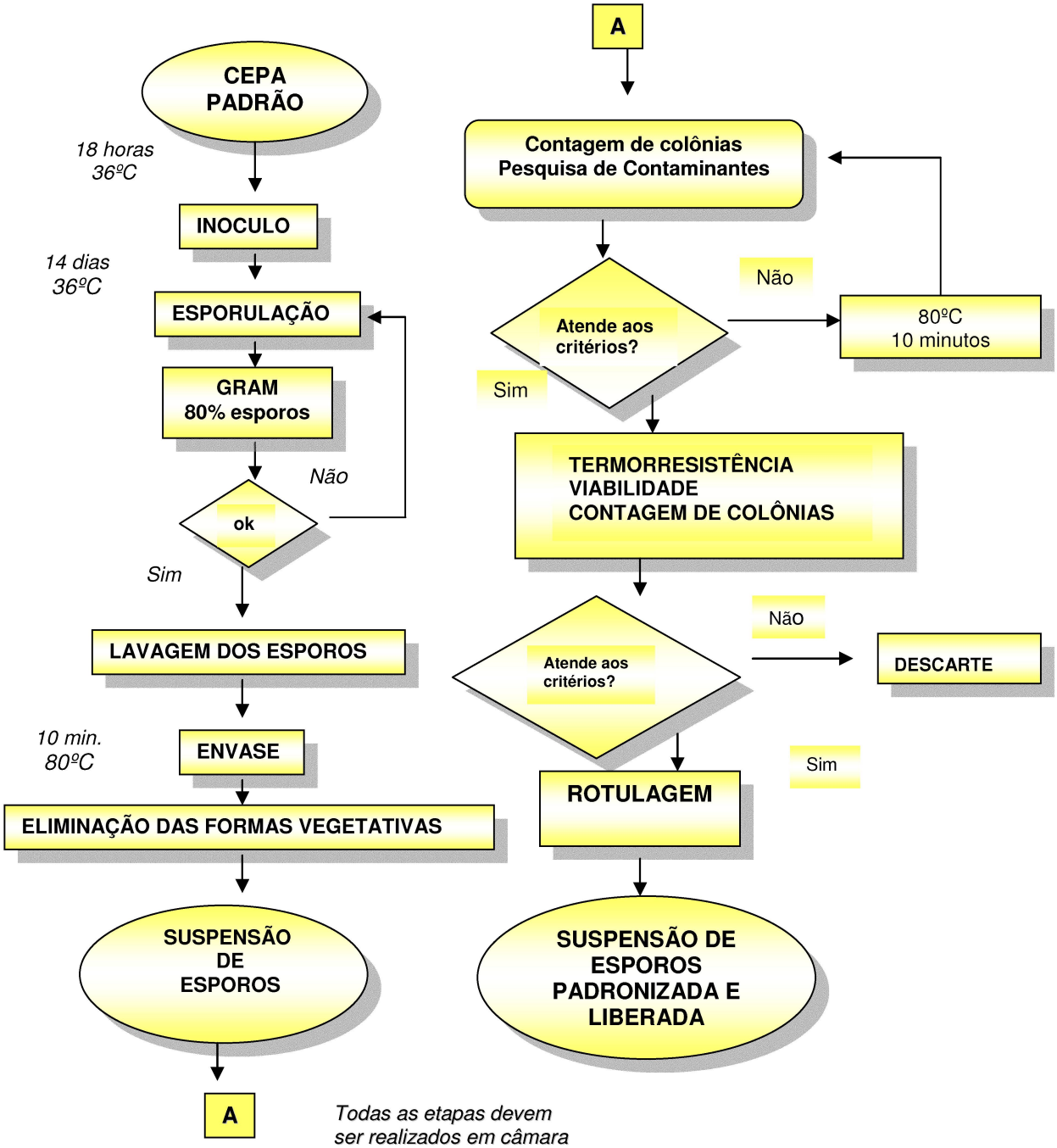


FIGURA 35 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

FONTE: O AUTOR (2007)

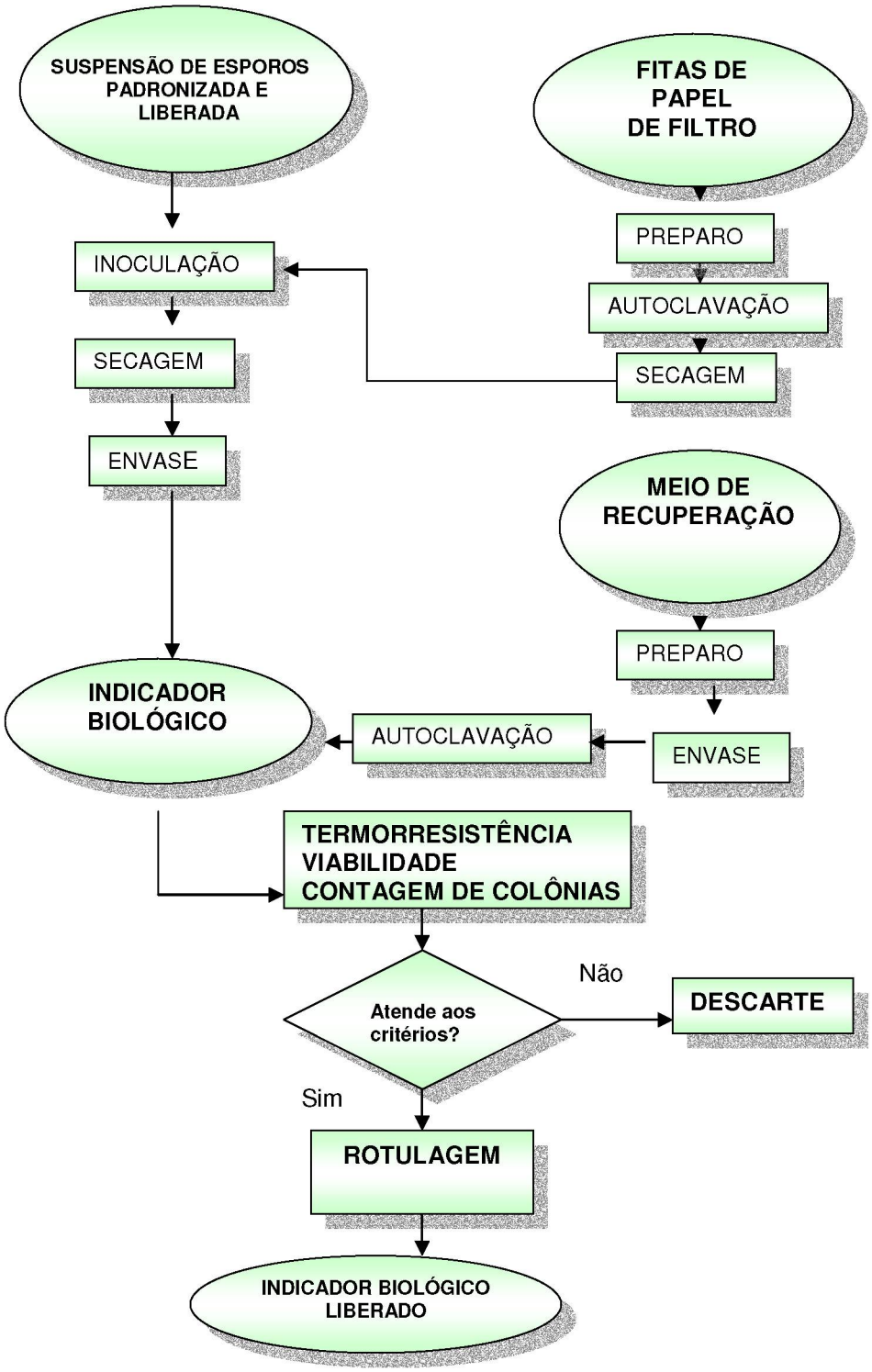


FIGURA 36 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO

FONTE: O AUTOR (2007)

FIGURA 37 - (A) PREPARO DAS FITAS; (B) INOCULAÇÃO NOS PAPELOTES; (C) ENVASE DO MEIO DE RECUPERAÇÃO; (D) ENVASE DOS PAPELOTES INOCULADOS; (E) COLOCAÇÃO DE LACRES; (F) PRODUTO EM QUARENTENA (AGUARDANDO LIBERAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE)

FONTE: O AUTOR (2007)

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita pela descrição, exploração e comparação dos dados por medida de centro (Teste de Homogenidade ou Teste F - Senedecor e Teste *t*-Student) demonstrada pela medida de posição relativa via boxplot (Análise Exploratória de Dados-AED), análise de variâncias e comparação entre as médias (teste de Tukey), calculados através do software SGWIN (Statgraphics plus 5.0 for Windows version 5.0, Statistical Graphics Co., 2000).

2.8 CONCLUSÃO

Quanto aos estudos de **esporulação** pode-se concluir que:

A curva de crescimento do *Bacillus atrophaeus* apresentou uma fase logarítmica que teve início seis horas após a incubação, seguida de uma curta fase estacionária. A taxa específica de crescimento obtida foi 0,42 h^{-1} e o tempo de duplicação foi calculado em 1,65 hora (1 hora e 39 minutos). Estes resultados permitiram padronizar o tempo ideal de incubação do inóculo em 18 horas, evitando a exposição prolongada do microrganismo a metabólitos tóxicos.

A comparação da produção de células viáveis para inoculação, produzidas por dois repiques sucessivos e por um único repique, permitiu a eliminação do segundo repique do processo de produção do inóculo, levando a uma redução de tempo, energia e consumo de meio de cultivo.

Embora dois meios de esporulação, entre os cincos testados, tenham apresentado resultados semelhantes quanto à produção de esporos, o meio constituído de extrato de levedura, 0,8%; caldo nutriente, 0,4%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005%; $CaCl_2.6H_2O$, 0,005%; ágar, 3,0% (PINTO; SAITO, 1992), foi escolhido como meio de produção, por apresentar menor quantidade de constituintes na sua composição. Facilitando o seu preparo e reduzindo os custos de fabricação. Este é um fator relevante visando à produção industrial de indicadores biológicos.

Os estudos para escolha do **suporte e da embalagem**, permitiram concluir que:

A avaliação da interferência da composição do suporte dos esporos e da embalagem primária na resistência térmica do produto ao calor seco demonstrou que, como esperado pelas suas características físicas e geométricas, os IB embalados em frasco apresentaram maior resistência do que os embalados em envelope e que não houve diferença estatisticamente significativa entre os IB embalados em frasco, independente do tipo de suporte (vidro ou papel).

A produção em papelote apresentou a vantagem de permitir a visualização do produto envasado, facilitando o envase manual e evitando a dupla inoculação ou a ausência de inoculação, embora represente uma etapa a mais no processo de produção. A adição da suspensão de esporos diretamente no frasco apenas seria vantajosa para envase automatizado, justamente por apresentar dificuldade de visualização do produto, devido ao seu pequeno volume (10 µL).

O tipo de diluente (água ou solução de acetato de cálcio) usado no preparo da suspensão de esporos não afetou a resistência térmica. A solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7, foi escolhida como diluente com base na literatura (SCHMIDT, 1955; ALDERTON; SNELL,1969; BEAMAN; GERHARDT,1986; PENNA *et al.*,2002) objetivando uma maior estabilidade do produto, não estudada nesta etapa.

Em relação aos estudos do **meio de recuperação** pode-se concluir que:

A capacidade de inibição do corante azul de bromotimol foi avaliada visando sua utilização como indicador de pH no meio de recuperação. Este corante promoveu completa inibição da germinação dos esporos do *Bacillus atrophaeus* na concentração de 0,003%, enquanto que as concentrações de 0,001% e 0,002% não interferiram na viabilidade dos esporos. A variação do pH de 6,2 a 6,8 não interferiu nos resultados.

Para verificar a interferência da concentração do indicador de pH na resistência térmica, por ação direta ou por reduzir a recuperação dos esporos danificados pelo calor, foram testados indicadores biológicos com diferentes formas de apresentação. Os valores do tempo de redução decimal (*D*) obtidos foram estatisticamente semelhantes. A concentração 0,0015% apresentou uma maior média do *D* e uma coloração mais intensa em relação à concentração de 0,0010%,

o que facilita a diferenciação visual do crescimento (cor amarela) e da sua ausência (cor verde). Estes resultados confirmaram que a capacidade inibitória do azul de bromotimol na recuperação de esporos do *Bacillus atrophaeus* danificados pelo calor seco está relacionada com a concentração do corante e que concentrações não inibitórias não interferem na determinação da resistência térmica.

O aumento da capacidade de recuperação dos esporos quando o amido é adicionado ao meio de cultivo não foi confirmada pela análise da variância dos resultados dos U_{sk} e D obtidos. a adição de amido no meio 3 (meio azul de bromotimol) forneceu D, em média, 7,0% maior e U_{sk}, em média, 5,4% maior, razão da opção da sua manutenção na fórmula do meio de recuperação. Não foram testados IB preparados há mais de 30 dias, situação onde o amido poderia induzir efeitos positivos.

Os estudos para escolha da metodologia para a **quantificação de células viáveis** permitiram concluir que:

Para a quantificação de esporos viáveis *do Bacillus atrophaeus*, tanto o método oficial (preconizado pela USP 29 e ISO 11138) quanto o método proposto (sem tratamento térmico prévio e com inoculação na superfície do ágar) forneceram resultados estatisticamente iguais, podendo ser substituídos um pelo outro. Esta substituição é vantajosa, pois implica em economia de tempo e de material, refletindo desta maneira no custo final das análises e conseqüente barateamento da produção. Na metodologia oficial são utilizadas duas placas por diluição e o tempo de incubação é de 48 horas e no método proposto são inoculadas duas diluições por placa (já considerando a duplicata) e o tempo de incubação é de 18 horas a 24 horas.

Não foi observada uma relação significativa entre o tempo de produção e a ação do tratamento térmico nas amostras analisadas. A análise de um maior número de amostras, com intervalos de tempo de produção regulares de 15 dias a 24 meses, é necessária para a confirmação desta observação.

Com o desenvolvimento da **padronização do processo de produção** pode-se concluir que:

Um lote experimental da suspensão de esporos e um lote experimental do "Indicador Biológico para Calor Seco - CPPI" foram produzidos de acordo com os procedimentos operacionais (POP) elaborados. Estes procedimentos foram desenvolvidos com base nos resultados obtidos nos experimentos descritos. Os resultados obtidos atenderam aos critérios de aceitação do produto, descritos no POP, e aos preconizados pelas normas internacionais.

O teste para a validação do tempo de incubação sugeriu 48 horas como o tempo de incubação para a leitura final. Serão necessários mais dois testes, com diferentes lotes de produção para que estas observações possam ser confirmadas e este tempo de incubação validado.

Os estudos de estabilidade foram iniciados para a determinação do prazo de validade e das condições ideais de armazenamento e transporte do produto.

A produção, o registro e o acompanhamento de mais dois lotes distintos (a partir de diferentes lotes de suspensão de esporos) são necessários para a validação do processo de produção como um todo e pré-requisito para liberação do uso do produto ao consumidor.

O uso do indicador biológico para esterilização pelo calor seco é fundamental para monitoramento, avaliação e validação deste processo, como garantia de qualidade e de segurança dos serviços odontológicos. O desenvolvimento do seu processo de produção, dentro dos padrões internacionais de qualidade, foi padronizado para as condições de produção do CPPI, o qual já possui infra-estrutura para o manuseio asséptico de esporos, tais como salas limpas em ambiente segregado, etc., viabilizando assim a implantação do controle biológico da esterilização nos serviços públicos de saúde a nível nacional. A aquisição de matéria-prima será o maior investimento para sua inserção na linha de produção. A continuidade da validação do processo de produção e da determinação da estabilidade do produto é imprescindível para garantir ao usuário uma avaliação segura do seu equipamento e da sua metodologia de esterilização.

2 ª PARTE

3.0 DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DO *Bacillus atrophaeus* UTILIZANDO SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

3.1 REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1 Subprodutos e resíduos agroindustriais

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois, além de criar potenciais problemas ambientais, representa perdas de matérias-prima e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição (PELIZER *et al.*,2007).

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O setor agroindustrial e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final por serem potenciais poluentes, além de representarem muitas vezes perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor.

A denominação "resíduo" leva a uma idéia de algo que não tem uso e deve ser descartado. Este conceito tem sido substituído por outros, como subproduto ou co-produto, colocando em aberto a possibilidade de outra forma de utilização. Conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG, 2003). Particularmente, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de outros produtos.

3.1.2 Resíduos da produção do álcool de cana-de-açúcar

O setor sucroalcooleiro faz do Brasil o maior produtor mundial de açúcar de cana e o único do país a implantar em larga escala um combustível alternativo ao petróleo. Hoje, o álcool é reconhecido internacionalmente pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas, e muitos outros países estão interessados nesta tecnologia.

Na produção do álcool (FIGURA 38), 1.000 kg de cana-de-açúcar geram, em média, 90L de álcool, 260 kg de bagaço e 650 L de vinhaça. Somente a vinhaça responde por 65% deste total.

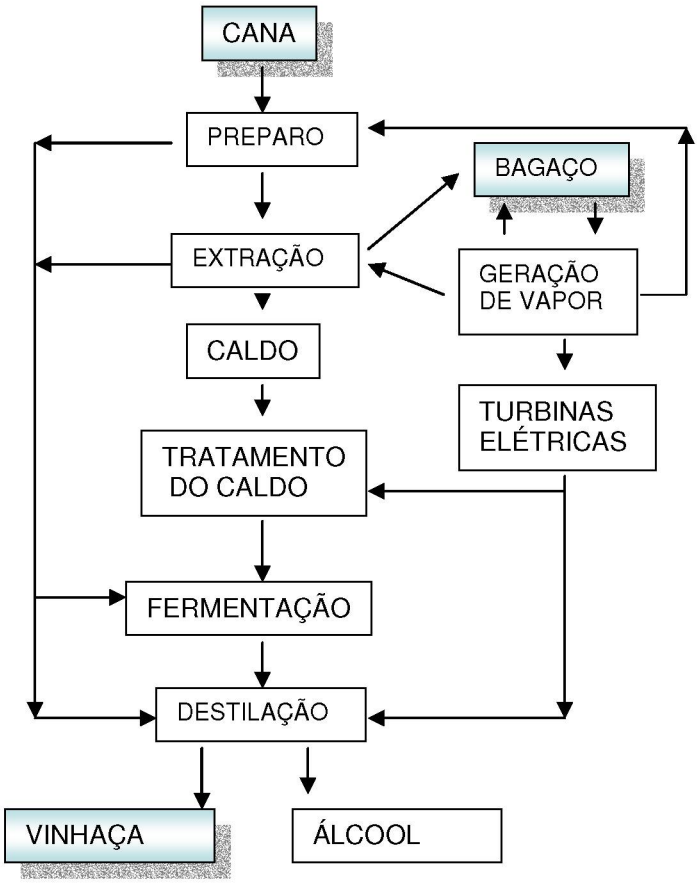


FIGURA 38 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL DE CANA-DE-AÇUCAR
FONTE: ADAPTADO DE GRANATO (2003)

Pode-se até afirmar que o álcool não seria o principal produto e sim um subproduto, pois a vinhaça corresponde a 10 vezes esta produção e seu destino como efluente pode desencadear sérios problemas de contaminação das águas. Por

um lado é excelente fertilizante, dada a riqueza de potássio, mas se não bem empregada, contamina águas superficiais e subterrâneas (RODRIGUES, 2001).

3.1.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Em comparação a outros resíduos da agroindústria, o bagaço é considerado um subproduto nobre utilizado, em sua maior parte, na geração de calor para os processos de industrialização do açúcar e do álcool.

Resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana, são fontes alternativas de suporte e/ou substrato para a produção de biomassa e seus metabólitos, reduzindo os custos de produção. Pandey *et al.* (2001), em artigo de revisão de literatura, listam uma série de processos biotecnológicos que usaram o bagaço de cana-de-açúcar em processos de fermentação sólida, onde este pode servir tanto como nutriente ou suporte inerte para o crescimento microbiano.

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, originária da Ásia, pertence ao gênero *Saccharum*, é apropriada para climas tropicais e subtropicais. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, produzindo cerca de 24% do total (SBRT, 2006). O bagaço de cana (FIGURA 39) é o resíduo da cana após a moagem. É um material fibroso obtido após a extração do caldo em moendas. Ao sair da moenda, o bagaço tem aproximadamente 30% da massa da cana e uma umidade em torno de 50%.

FIGURA 39 - BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR

FONTE: : http://www.sescsp.org.br (2006)

É o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil, aproximadamente 280 Kg/ tonelada de cana moída. Estima-se que, a cada ano,

sejam produzidos de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo à cerca de 30% do total da cana moída. Pode ser utilizado para diversos fins, como: ração animal, matéria-prima para a produção de celulose, papel, aglomerados e chapas semelhantes à madeira e na geração de energia elétrica e mesmo assim ainda se observa uma sobra nas usinas realmente significativa (SILVA *et al.*,2007).

O bagaço é constituído por :celulose, polímero da glicose; hemicelulose, formada por açúcares de cinco carbonos, chamados de pentoses e por lignina, um material estrutural da planta, associado à parede celular vegetal, cuja função é dar rigidez, impermeabilidade e oferecer resistência aos ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Possui uma composição química aproximada de 50% de água, 23% de carbono, 22% de oxigênio, 3% de hidrogênio e 2% de cinzas. Sua composição média pode ser distribuída da seguinte forma: umidade, 50%; fibra, 46%; Brix (sólidos solúveis em água), 2%; impurezas minerais, 2%. Sendo a fibra composta de: celulose, 48%; hemicelulose, 25% e lignina (maior poder calorífico), 12% (SBRT, 2006).

A composição química do bagaço varia de acordo com diversos fatores, entre eles: o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio. As TABELAS 19, 20 e 21 mostram a composição média do bagaço de cana-de-açúcar.

TABELA 19 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA ÚMIDA

Composição química média	
Carbono	39,7 – 49%
Oxigênio	40 – 46%
Hidrogênio	5,5 – 7,4%
Nitrogênio e cinzas	0 – 0,3%
Propriedades físico-químicas	
Umidade	50%
Fibra	46%
Brix	2%
Impurezas minerais	2%
Composição média da fibra do bagaço	
Celulose	26,6 – 54,3%
Hemicelulose	14,3 – 24,4%
Lignina	22,7 – 29,7%

FONTE: ADAPTADO DE PERES (1999); MELLO, Jr *et al.*(2000)

TABELA 20 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA SECA

Constituinte	% (Silva)	% (Macgregor)	% (Martin)
Matéria seca	43,2	91-100	-
Proteína bruta	1,5	1,9-2,1	-
Fibra bruta	47,3	39,1-43,0	75,0
Extrato etéreo	0,9	0,8-0,9	-
Matéria mineral /cinzas	4,5	-	3,4
Extrativo não nitrogenado	45,5		-
Fibra em detergente neutro	94,8	78,3-86	-
Fibra em detergente ácido	63,3	49,5-54,4	-
Celulose	44,9	-	-
Hemicelulose	31,4	-	-
Lignina em detergente ácido	14,0	-	-
Cálcio	-	0,82-0,90	-
Fósforo	-	0,26-0,29	-
Nitrogênio	-	-	5,0
TDN (total comp.digeríveis)	-	25,5-28,0	-
Açucares totais			10,3
Açucares redutores			3,56

FONTE: ADAPTADO DE SILVA, V.M *et al.* (2007);MARTIN,N.*et al.*(2004);MACGREGOR(2000)

De acordo com ABIPTI (1999), o bagaço de cana-de-açúcar é constituído por quatro frações:

a) fibra ou bagaço: fração sólida orgânica insolúvel em água, composta de celulose, hemicelulose e lignina. Esta fração é portadora de elementos estruturais que permitem o uso do bagaço na indústria de derivados (produção de polpa, papel e produtos aglomerados, ração animal, combustível industrial), 45%;
b) sólidos insolúveis, compostos orgânicos (terra, pedras e outras matérias estranhas) originários da colheita e do solo, 2-3%;
c) sólidos solúveis, fração que se dissolve na água, composta por sacarose, não extraída na usina, 2-3%;
d) água, retida no bagaço por mecanismos de adsorção e de capilaridade, 50%.

TABELA 21 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Componente	dag .Kg$^{-1(1)}$ mg.Kg$^{-1(2)}$
C/N	64,4 (1)
C	48,95 (1)
N	0,76 (1)
P	0,05 (1)
K	0,15 (1)
Ca	1,03 (1)
Mg	0,35 (1)
S	0,04 (1)
Fe	0,12 (2)
Zn	52 (2)
Mn	49 (2)
Cu	10 (2)

FONTE: ADAPTADO DE MATOS *et al.*(1998)

De acordo com Pal *et al.* (1995) o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial abundante em vários países e pode ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de vários processos biotecnológicos de interesse industrial.

3.1.2.2 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça é o principal subproduto da agroindústria canavieira por ser um efluente altamente poluidor e apresentar-se em grande volume, dificultando seu transporte e eliminação. É um produto resultante da destilação e fermentação da cana-de-açúcar no processo de fabricação de álcool e também pode originar-se como subproduto da produção de açúcar, sendo eliminada no processo de cristalização do caldo da cana. No geral a vinhaça é rica em matéria orgânica e em nutrientes minerais como o potássio (K), o cálcio (Ca) e o enxofre (S), e possui uma concentração hidrogeniônica (pH) variando entre 3,7 e 5,0 (LUDOVICE, 1997).

A produção de vinhaça varia em função dos diferentes processos empregados na fabricação do álcool, de maneira geral cada litro de álcool produzido em uma destilaria gera entre 10 litros a 15 litros de vinhaça. Uma aparente solução para o descarte racional na vinhaça é o que atualmente chama-se de fertirrigação, ou seja, a utilização desse produto rico em matéria orgânica aplicada “in natura” nas áreas de plantio. Apresenta composição variável em função dos seguintes fatores:

condições climáticas do plantio, composição do solo, natureza e composição do mosto, teor alcoólico do vinho, sistema de aquecimento dos aparelhos de destilação (GRANATO, 2003).

A caracterização da vinhaça (TABELA 22), através de análise química periódica, é importante na obtenção de parâmetros seguros para a sua aplicação como matéria prima de bioprocessos

TABELA 22 - COMPOSIÇÃO DA VINHAÇA DE CANA DE AÇÚCAR

ELEMENTOS	**(%)**
º Brix	1,1-2,4º
Sólidos totais	6,4
Matéria Orgânica	4,6
Matéria Mineral	2,0
Nitrogênio	0,01 - 0,08
Cálcio	0,04 - 0,08
Magnésio	0,01 - 0,2
Fósforo	0,01-0,06
Potássio	0,03 -0,76
pH	3,2 - 5,0
Cinza Bruta	0,9
Ferro	0,005-0,12
Cobre	0,001-0,072
Zinco	0,002-0,05
Manganês	0,006-0,011
SO_4	0,06-0,64

FONTE: ADAPTADO DE GRANATO (2003)

3.1.3 Subprodutos e resíduos do processamento da soja

A soja é constituída principalmente de lipídeos e proteínas, e esta última fração tem recebido cada vez mais atenção nas últimas décadas. A obtenção do extrato protéico é tradicionalmente feita com base no ponto isoelétrico das proteínas da soja que se situa na faixa de pH 4,0 - 5,0 e pode ser alcançado com o uso de ácidos ou bases. Outra maneira de se extrair as proteínas da soja é com o uso de uma mistura etanol e água. Esta mistura insolubiliza as proteínas e as fibras da soja, que são retiradas, e após a secagem obtém-se um produto conhecido como proteína concentrada de soja. A fração líquida da mistura etanol e água contêm na sua maior parte, os açúcares da soja que, após a recuperação do etanol por evaporação, acabam por gerar o melaço de soja (FIGURA 40). Ou seja, o melaço de soja é um subproduto da extração da proteína concentrada de soja.

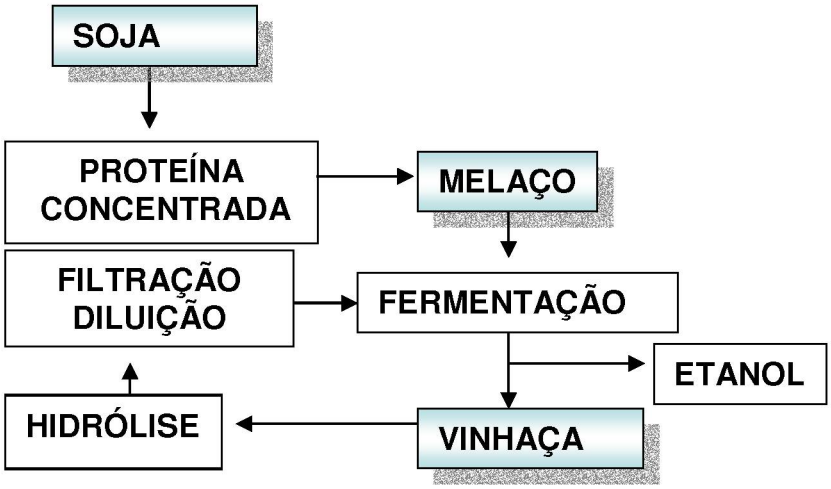


FIGURA 40 - FLUXOGRAMA BÁSICO DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL DE SOJA
FONTE: ADAPTADO DE IMCOPA (2006)

A composição do melaço de soja (TABELA 23) é aproximadamente de 65% de mono e dissacarídeos e 35% de oligossacarídeos, principalmente rafinose, 5-7%, e estaquiose, 30-32% (MACHADO, 1999; AYUB *et al.* 2002; CEGLA *et al.*, 2005).

A produção nacional do melaço de soja é estimada em 100.000 toneladas por ano, com um custo de três a dez dólares a tonelada (SIQUEIRA, 2006).

TABELA 23 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO MELAÇO DE SOJA

Elemento	%(massa/volume)
ºBrix	25-35º
Lipídeos	1,4 -8,1
Proteína	2,3 – 5,3
Sólidos totais	19,1 – 51,2
Carboidratos totais	8,0 – 21,1
Estaquiose	2,7 -7,0
Rafinose	1,7 - 4,5
Dissacarídeos	4,0 -10,5
Frutose+ galactose	0,04 -0,10
Glicose	0,004 -0,010
Fibras	0
Cinzas	1,8- 4,7
Umidade	75-65
Densidade	1,08- 1,19

FONTES: ADAPTADO DE IMCOPA (2006); AYUB *et al.*(2002)

NOTA: O melaço de soja pode ser concentrado por evaporação para reduzir o volume de armazenamento

A vinhaça de soja é um resíduo da produção do álcool de soja, cujo aproveitamento trará ganhos indiscutíveis na prevenção da contaminação ambiental, bem como nos custos dos tratamentos da sua eliminação. Seu açúcar predominante é a rafinose (TABELA 24), mas também contém fontes de nitrogênio, possuindo composição mínima para permitir o crescimento de microrganismos (NALVAPROTO, 2006).

TABELA 24 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DA VINHAÇA DE SOJA

Elemento	**%**
ºBrix	9-13º
Lipídeos	1,7-8,2
Proteína	1,0-1,5
Sólidos totais	~9,0
Carboidratos totais	4,7-11,8
Estaquiose	~0,02
Rafinose	~ 2,3
Dissacarídeos	~ 2,0
Frutose+ galactose	~0,4
Glicose	0
Fibras	~0,2
Cinzas	1,4-2,1
Umidade	Aprox. 90,0

FONTE: IMCOPA (2006)

3.1.4 Fermentação em estado sólido (FES)

3.1.4.1 Conceito

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido, aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998). A água contida no substrato pode ser a da própria matriz sólida ou ser adicionada (PANDEY *et al.,*2001;PANDEY,2003) .

É estritamente referida à ausência de água livre nos espaços entre as partículas sendo que o termo FES não pode ser aplicado às fermentações sobre materiais suspensos na fase líquida (DURAND; CHEREAU, 1988).

3.1.4.2 Histórico

A técnica da FES tem sido utilizada desde a antiguidade, na fabricação de pães, queijos e *koji* (alimento fermentado típico do extremo oriente). Existem relatos desde o ano 1000 a.C., na China, sobre a produção do molho de soja. Em 500 a.C. os chineses também produziam o *Chiang*, um alimento tipo *misô*, produzido por FES (HESSELTINE, 1977; CANNEL;MOO-YOUNG, 1980 ;PANDEY,2003).

Nos países ocidentais e europeus, a FES foi negligenciada a partir de 1940, devido ao advento da tecnologia da fermentação submersa, talvez em decorrência do sucesso da produção da penicilina em fermentação submersa. Poucos trabalhos foram realizados em FES nas décadas seguintes, até que na década de 1980 ressurgiu o interesse por estes processos (LONSANE *et al.*, 1991; PANDEY *et al.*, 2001).

O enriquecimento protéico de rações animais foi a principal atividade que motivou a utilização da FES nos países ocidentais, envolvendo o uso de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e minimizando, de alguma maneira, a poluição causada por estes resíduos (PANDEY, 2003).

3.1.4.3 Aplicações

Atualmente, sua aplicação é estendida às indústrias de alimentos, farmacêuticas e biotecnológicas. A aplicação comercial da FES pode ser dividida em:

1) Sócio-econômicas, como a compostagem e o aproveitamento de resíduos; abrangendo também a biorremediação e a biodegradação de compostos tóxicos, pesticidas e herbicidas;

2) Economicamente lucrativas como a produção de enzimas, ácidos orgânicos, hormônios vegetais, antibióticos, etc (RAMANA-MURTHY *et al.*, 1993);

3) Aproveitamento de resíduos e visando a produção de produtos rentáveis. Ex: enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos, agentes de controle biológico de pragas (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2002; PINTO *et al.*, 2005).

3.1.4.4 Características

A característica própria da FES é sua capacidade de proporcionar um ambiente seleto com baixa umidade e apropriado para um organismo que pode crescer em altas concentrações de nutrientes sobre uma superfície sólida (SMITS *et al.*, 1998).

A fermentação em meio sólido é constituída por um sistema trifásico (sólido - líquido - gasoso) no qual a fase sólida está inteiramente ligada à fase líquida (SOCCOL *et al.*,1994). A água encontra-se em três diferentes formas e em proporções variáveis no meio de cultura:

a) Água ligada ao sólido (água de constituição);

b) Água fracamente ligada ao sólido (água de solvatação);

c) Água adsorvida por capilaridade ao sólido (água livre).

A fase sólida é constituída pelo suporte de crescimento e pelo reservatório de água, que fornece os nutrientes e a fonte de energia responsável pelo crescimento do microrganismo. A essa fase podem ser adicionados suplementos ou outras fontes de carbono em função das exigências do microrganismo ou do produto de metabolismo desejado (SOCCOL *et al.*,1994).

3.1.4.5 Microrganismos

Bactérias, leveduras e fungos podem crescer em substrato sólidos, tais como: *Bacillus sp. (*compostagem, *Natto*, amilase, bioinseticidas); *Pseudomonas sp.; Serratia sp.; Streptoccus sp.(*compostagem*); Saccharomyces cerevisiae (*alimentos, etanol*); Schwanniomyces castelli (* etanol, amilase); *Beauveria sp.; Metharizium sp. (*controle biológico e bioinseticidas*); Aspergillus oryzae (*Koji, ácido cítrico*); Penicilium notatum* (penicilina, queijo), entre outras.

A escolha dos microrganismos fermentadores é decisiva, pois é a partir do metabolismo destes que se obtém o "produto" desejado. Para a FES os fungos filamentosos são os mais aplicados, pois estes apresentam um crescimento por hifas permitindo uma maior penetração e aderência ao substrato, necessitam de pouca água livre e suportam altas pressões osmóticas. As enzimas destes são pouco diluídas (devido ao baixo teor de água da matriz sólida) tendo aí um maior rendimento (LONSANE *et al.*, 1985; RAIMBAULT, 1998).

As fermentações em substratos sólidos também podem envolver culturas mistas com microrganismos próprios do meio, inoculados ou ambos.

3.1.4.6 Suporte e substrato

O suporte é um meio sólido que contém, ou aglutina sobre a sua matriz, os nutrientes necessários para o metabolismo dos microrganismos. Muitas fermentações em estado sólido têm o suporte como fonte de nutrientes, atuando também como substrato. O meio já pode conter os nutrientes necessários para o metabolismo e/ou pode ser acrescido de outras fontes, natural ou sintética (PANDEY *et al,.* 2001).

O suporte/substrato deve ter algumas características para melhor rendimento da fermentação: conter e/ou reter nutrientes para a fermentação e possuir grande acessibilidade do microrganismo a todo o meio (grande distribuição de microrganismos), que pode ser avaliada pela porosidade, pelo tamanho e o formato das suas partículas (PANDEY *et al*., 2001).

O suporte /substrato também pode necessitar de um pré-tratamento para melhor adaptação das condições necessárias ao crescimento do microrganismo e a seu metabolismo, como:

- Esmagamento, moagem e peneiramento, para regular a granulometria do meio;
- Hidrólise química ou enzimática dos polímeros para aumentar o acesso ao substrato;
- Suplementação com nutriente e correção de pH e umidade;
- Cozimento ou tratamento pelo vapor para pré-degradação de macromoléculas ou eliminação de contaminantes (RAIMBAULT,1998 DEL BIANCHI, *et al*.,2001).

Os meios de cultivo utilizados em FES, na sua maioria, são produtos agrícolas ou subprodutos de agroindústrias tais como: palha de trigo, farelo de arroz, polpa de beterraba, farinha de milho, polpa de maçã, palha de arroz (PELIZER *et al*.,2007), farelo de trigo, bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar (SOCCOL;VANDENBERG,2002). Tipicamente são compostos de biopolímeros de alto peso molecular como amido, celulose, hemicelulose, pectina, proteína e lipídios

(RAIMBAULT, 1998). Proporcionam fontes de carbono mistas e uma diversificada e complexa fonte de nutrientes que pode, ou não, ser completa no que diz respeito às exigências nutricionais do microrganismo a ser cultivado, podendo ser necessária à complementação de nutrientes e a correção do pH (PANDEY, 1994).

Pinto *et al.* (2005,p.2), afirmam que:

> A heterogeneidade dos substratos não diz respeito apenas a variações existentes entre diferentes lotes de matéria-prima utilizada, mas também às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes, que podem variar de acordo com a espécie e o tecido vegetal. Dessa forma, cada substrato com potencial de uso em FES, deve ser cuidadosamente avaliado.

3.1.4.7 Vantagens

A FES apresenta, em relação a outros métodos fermentativos, vantagens como o grande rendimento produtivo, a pouca produção de resíduos e exigência de equipamentos simples para fermentação. Para um bom aproveitamento, deve-se levar em conta vários fatores, dentre os quais: a seleção criteriosa do microrganismo e do substrato; controle dos parâmetros da fermentação e a purificação do produto, bem como o reaproveitamento dos microrganismos (LONSANE, 1994; RAIMBAULT, 1998).

3.1.4.8 Parâmetros

Dentre os parâmetros, deve-se levar em conta fatores físico-químicos e bioquímicos, como: pH; temperatura de incubação; transferência de massa (O_2 , CO_2, etc.) e de energia (calor na fermentação); suplementação de nutrientes ao substrato (N, P, etc.); agitação e aeração; umidade relativa do sistema e outros. Devido a grande heterogeneidade do sistema torna-se difícil a avaliação destes parâmetros, pois se têm formações de muitos gradientes ao longo de todo substrato (PANDEY *et al.,* 2001; PANDEY, 2003) .

FATOR	FERMENTAÇÂO SUBMERSA	FERMENTAÇÂO EM ESTADO SÓLIDO
Substratos	Solúveis (açúcares)	Polímeros insolúveis: amido, celulose ,pectinas,lignina
Condições assépticas	Esterilização pelo calor Controle asséptico	Tratamento pelo vapor Condições não estéreis (em geral)
Água	Altos volumes com descarte de efluentes	Baixo volume sem descarte de efluentes
Aquecimento metabólico	Fácil controle de temperatura	Baixa transferência de calor
Aeração	Requer alto nível de areação	Fácil aeração Grande superfície para troca gasosa
Controle do pH	Fácil	Requer tamponamento
Agitação mecânica	Boa homogeneização	Preferência por condições estáticas
Aumento de escala	Disponibilidade de equipamentos industriais	Desenvolvimento de equipamentos apropriados ao processo
Inoculação	Fácil, homogênea, contínua	Inoculação por lote, esporos, heterogênea
Contaminação	Fácil, por bactérias	Difícil, por fungos
Consumo de energia	Alto	Baixo
Capacidade do equipamento	Maior volume em relação a FES	Menor volume

QUADRO 2 - COMPARAÇÃO ENTRE A FERMENTAÇÃO SUBMERSA E A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

FONTE: ADAPTADO DE RAIMBAULT (1998)

3.1.4.8.1 Fontes de carbono e relação C /N

A fonte de nutrientes é um dos fatores mais importantes no processo fermentativo, intimamente relacionada às necessidades nutricionais do microrganismo eleito e às características desejadas do produto. Devem ser conhecidos: as necessidades dos microrganismos e o tipo de compostos de carbono (desde monossacarídeos como a glicose, maltose, até a polissacarídeos) e de nitrogênio (desde nitrogenados simples como a uréia, amônia, até compostos organonitrados complexos, com ou sem impurezas) em que estes podem extrair os nutrientes necessários para o seu metabolismo (PANDEY *et al .*,2001). Diferentes fontes de nutrientes podem induzir ao uso de diferentes vias metabólicas, como também levar à produção de metabólitos supressores do produto desejado.

3.1.4.8.2 Temperatura

Deve ser próxima à temperatura ideal de crescimento do microrganismo a ser utilizado. Este fator pode afetar em: desnaturação das proteínas, ativação e/ ou inibição das enzimas, promoção ou inibição de subprodutos do metabolismo celular, vida útil dos microrganismos, rendimento da fermentação, etc. O controle do aumento da temperatura em processos exotérmicos na FES é muito difícil, devido à heterogeneidade característica do processo, onde são encontrados gradientes de temperatura no substrato (PANDEY *et al .*,2001).

3.1.4.8.3 Umidade e atividade de água (A_w)

A água pode estar presente como água ligada e água livre, resultando no conteúdo total de água (umidade). Pode apresentar-se intimamente ligada às moléculas constituintes do substrato, não podendo ser removida ou utilizada para o metabolismo dos microrganismos, não havendo desenvolvimento ou reprodução dos mesmos; ou pode encontrar-se livre, estando disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas.

A atividade de água é um parâmetro que fornece a quantidade de água livre disponível para o metabolismo dos microrganismos. É definida como a razão entre a pressão de equilíbrio de vapor da solução (*P*) e a pressão de vapor do solvente (*Po*),que em geral é a água pura, à mesma temperatura.

$$A_w = \frac{P}{P_o}$$

Cada microrganismo tem um teor adequado de A_w : leveduras ficam na faixa de 80% e bactérias ficam em torno de 90% (FIGURA 41). Para fungos, este valor é na média de 70%, mas para fungos filamentosos podem chegar a 98% e 99,8% (nesta taxa, tem-se um favorecimento da esporulação), taxas menores favorecem o crescimento micelial ou germinação dos esporos (DEL BIANCHI *et al.*,2001).

A água é necessária para a execução do metabolismo, pois é o meio dispersor intracelular e da respiração. A partir da água livre pode-se controlar a produção e a excreção celular. Logo, para uma efetiva fermentação, deve-se ter um teor de água

adequado (PANDEY *et al.*,2001). Os microrganismos que são capazes de executar suas atividades metabólicas em A_w inferiores (como os fungos filamentosos) são os mais apropriados para os processos de fermentação em estado sólido (NIGAM; SINGH, 1994).

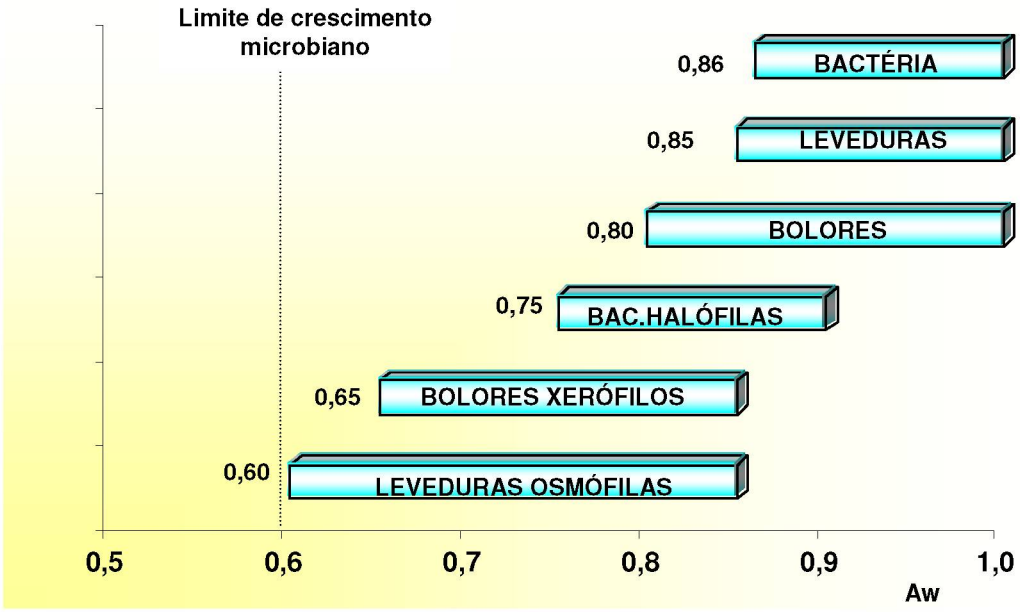


FIGURA 41 - FAIXA DA A_w PARA O CRESCIMENTO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS

FONTE: ADAPTADO DE http://brasil.ilsi.org/NR/rdonlyres(2007)

O nível de umidade para um determinado valor de atividade de água é influenciado pela natureza do substrato. Uma umidade muito alta resulta em um leito com baixa porosidade e baixa difusão do oxigênio, aumentando o risco de contaminação bacteriana (LONSANE *et al.*, 1985). O teor de umidade inicial geralmente muda durante o curso da fermentação devido à evaporação e às atividades metabólicas.

3.1.4.8.4 pH

O pH é fundamental uma vez que, dependendo da acidez ou alcalinidade do meio, pode-se proporcionar a ativação ou desativação das enzimas usadas na fermentação, bem como afetar o metabolismo dos microrganismos. O controle deste

parâmetro é muito difícil devido à heterogeneidade do sistema e à consistência do material. Para amenizar este efeito, utiliza-se um substrato com capacidade de tamponamento ou adicionam-se soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; PANDEY *et al .,* 2001).

Também é desejável que o microrganismo tenha uma certa tolerância às alterações na concentração de prótons. Observa-se que o intervalo de pH ideal para o crescimento microbiano e aquele para a formação do produto podem diferir consideravelmente (PRIOR *et al.*,1992).

A medida desta variável também é difícil, visto que o pH da fase líquida contida dentro das partículas, aquele que se obtém pela suspensão do meio sólido em água destilada, pode ser consideravelmente diferente daquele na superfície do sólido, próximo de onde ocorre a maior parte das reações biológicas (MUDGETT, 1986).

3.1.4.8.5 Agitação e aeração

Para a fermentação, o fluxo e a distribuição de O_2 dentro da matriz sólida e o refluxo de CO_2 (relacionados à transferência de massa) são da maior importância. Os microrganismos necessitam de O_2 para o metabolismo celular (respiração) e para a produção de substâncias essenciais, como enzimas, etc (PANDEY *et al.*, 2001).

A agitação tem seus efeitos benéficos por proporcionar uma homogeneidade durante todo o período da fermentação, promover o crescimento sobre partículas individuais do substrato, expor as partículas do substrato à atmosfera do biorreator, promover a transferência de gás e de calor e promover uma efetiva distribuição do inóculo no início do processo, mas pode interferir na vida útil dos microrganismos (LONSANE *et al.*, 1985).

A aeração implica não somente na transferência de gás, mas também na transferência de umidade e calor entre o sólido fermentando e o ambiente gasoso (MUDGETT, 1986). A influência destes parâmetros deve ser analisada para cada processo (PANDEY *et al .*,2001).

3.1.4.8.6 Tamanho da partícula

Deve-se determinar um valor ótimo para as partículas do suporte /substrato. Quanto menor a partícula maior é a área superficial para o crescimento microbiano e maior é o grau de absorção de volume do substrato, com isso maior é o grau de transformação. Entretanto, partículas muito pequenas diminuem a porosidade e a circulação de ar, bem como, a dissipação de gases e de calor gerados fica comprometida, permitindo a compactação e diminuindo o rendimento da fermentação. A porosidade influencia na capacidade de absorção da água que faz o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e os microrganismos (PANDEY *et al .,*2001).O tamanho ideal da partícula também deve ser determinado para cada processo.

3.1.4.8.7 Tipos de reator

A FES é mais comumente empregada em regime de batelada, onde o meio é adicionado ao reator, ocorrendo então a inoculação do mesmo por um determinado período de tempo. O produto pode ser extraído por suspensão do meio com água, soluções-tampão ou solventes (como no caso de enzimas, ácidos, álcool) ou secado e armazenado (produção de bioinseticida ou proteína microbiana).

Muitos modelos de reatores têm sido projetados visando as duas categorias de FES: escala laboratorial e piloto e escala industrial (DURAND, 2003). Na primeira categoria estão incluídos os modelos estáticos e agitados, mas poucos modelos estão disponíveis para a produção industrial (GUTIÉRRES-CORREA; VILLENA, 2003).

Dentre alguns reatores, pode-se citar:

- Reatores de vidro: para a seleção de culturas e para a otimização das variáveis do processo é indicado que a FES seja conduzida em frascos, com capacidade de trabalho de 50 a 1000 g (LONSANE *et al.*, 1992), como: frascos Erlenmeyers (escala de laboratório); frascos de Fernbach (utilizado até em escala industrial para a produção de esporos); garrafas de cultura e colunas de Raimbault (colunas de vidro de 4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, com volume útil de aproximadamente 250 mL).

- Bandejas: construídas de vários materiais, vários tamanhos (altura em média de 2 a 10 cm), podendo ter o fundo intacto (como os frascos) ou ter o fundo com tela perfurada, fazendo uma melhor circulação de ar (tanto superficial como pelo interior do meio). Apresentam uma área superficial e uma capacidade de alocação do meio muito maior que os frascos, e pode-se trabalhar com aeração forçada ou com o uso de ar natural;
- Sacos de polietileno autoclaváveis de alta densidade;
- Tanque circular: o meio fica alocado em tanques rotatórios com grandes diâmetros (média de 7m) com agitadores helicoidais dentro do tanque, com condições controladas (FIGURA 42). A batelada é toda automatizada: alimentação, esterilização, agitação, aeração, inoculação e retirada do produto. O custo é elevado e a agitação pode trazer danos ao meio e à manutenção do equipamento (DEL BIANCHI, 2001).

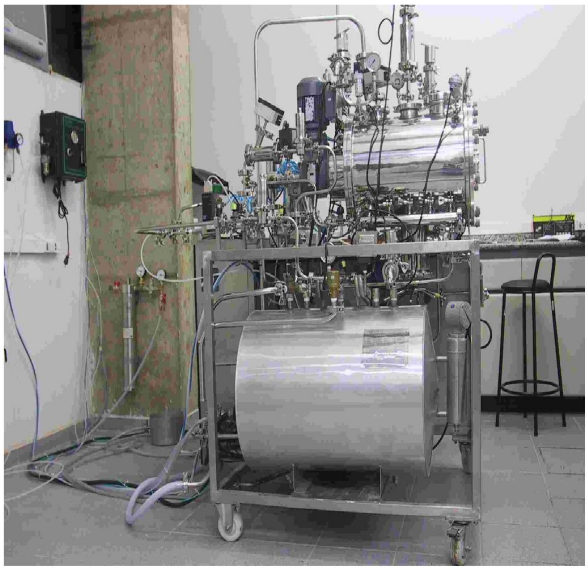


FIGURA 42 - BIORREATOR DE 40 L PARA CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO, COM SISTEMA DE MONITORAMENTO E CONTROLE DE PROCESSO

FONTE: http://pqi.poli.usp.br/leb/lebfss.html (2007)

3.1.5 Cultivo de *Bacillus sp* em substratos complexos

Visando selecionar componentes para a elaboração de um meio de cultivo economicamente viável, Cesare-Vidaure *et al.* (1997) testaram diferentes subprodutos agroindustriais como: melaço de cana (0,2-0,5%) como fonte de

carbono, calda de milho (0,2- 0,5%) como fonte de nitrogênio orgânico, fosfato de potássio (0,2-0,6%), sulfato de amônio (0,2-0,6%), cloreto de cálcio (0,1-0,2%) e cloreto de sódio (0,1-0,5%) como suplementos minerais. Incubando em agitador orbital, por 72 horas, 30ºC a 200 rpm, obtiveram uma concentração de células de 10^8 UFC/mL a 10^9 UFC/mL, concluindo que o melaço de cana tem efeito positivo no crescimento do *Bacillus subtilis.*

Li *et al.* (1997) demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* podem utilizar rafinose, galactose e sucrose como fontes de carbono. Oligossacarídeos que possuem ligações alfa-galactosídicas como rafinose e estaquiose são encontrados em grande quantidade nos vegetais, incluindo a soja e a beterraba. Altas concentrações de biomassa foram obtidas em pesquisas que utilizaram melibiose e a rafinose com adição de glicose como fonte de carbono, associadas ao extrato de carne, extrato de levedura ou triptona como fonte de nitrogênio (OSADCHAYA *et al.*,1977 WARRINER; WAITES 1999).

Luna *et al.* (2002) descreveram a fermentação do *B.subtilis* em um meio de cultivo com melaço de cana como um dos substratos e, respectivamente, extrato de levedura e uréia como fonte de nitrogênio. Esta pesquisa demonstrou que a biomassa obtida em 12 horas no cultivo com extrato de levedura foi três vezes maior que a obtida usando a uréia, e que a autoclavação conjunta ou separada dos componentes não afetou a produção da biomassa.

Neves *et al.* (2007), visando à produção de biosurfactante, cultivaram a cepa do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em shaker a 150 rpm, 35ºC por 24 horas, em meio contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e farinha de soja. Concluíram que esta cepa do *Bacillus atrophaeus* tem a capacidade de adaptar o seu metabolismo para utilizar diferentes nutrientes como fonte de energia.

3.1.6 Cultivo de *Bacillus sp* através de FES

A maioria dos trabalhos em FES concentra-se na utilização de fungos filamentosos. Em geral, acredita-se que tais organismos seriam mais adequados devido à capacidade de gerar hifas que penetram no substrato sólido e por sua maior adaptabilidade a condições de baixa atividade de água. Entretanto, já existem trabalhos que relatam sucessos no uso de bactérias em FES (HECK *et al.*, 2002).

A produção da enzima amilase pelo *Bacillus coagulans,* utilizando FES, foi descrita por Babu e Satyanarayana (1995). Pelizer (1997) utilizou resíduos da indústria de beneficiamento do arroz para a produção de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Goes e Sheppard (1999) descreveram a produção da enzima α-amilase pelo *Bacillus subtilis* ATCC 21556 usando casca de batata como substrato. Capalbo *et al*. (2001) cultivaram o *Bacillus thuringiensis* por fermentação em estado sólido utilizando arroz umedecido como substrato e sacos de polietileno como reator.

Kashyap *et al*. (2003) descreveram a produção da enzima pectinase em grãos de trigo suplementados com ácido poligalacturônico (PGA) e multivitaminas, e Chen *et al.* (2005) demonstraram a produção do ácido poli-γ-glutâmico pelo *Bacillus subtilis*. Soares *et al*. (2005), descreveram a produção de proteases utilizando torta de soja como meio de cultivo e Heck *et al*. (2005) a produção de xilanase usando resíduos da industrialização da soja como substrato para a FES. Pryor *et al.* (2007) otimizaram a produção de um lipopeptídeo com ação antifúngica, cultivando o *Bacillus subtilis* TrigoCor 1448 em farelo de trigo.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que descrevam a produção de esporos termorresistentes do *Bacillus atrophaeus* utilizando o cultivo em estado sólido.

3.3 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DO *Bacillus atrophaeus* EM ÁGAR ENRIQUECIDO COM SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

3.2.1 Introdução

O desenvolvimento de um meio de baixo custo, fácil acesso e que forneça além de um elevado índice de esporulação, a produção de esporos termorresistentes é ideal para reduzir os custos industriais de produção dos indicadores biológicos para esterilização pelo calor seco, conseqüentemente, ampliando o acesso ao produto pelos serviços de saúde. Pinto e Saito (1992) consideraram vantajoso o uso de meio sólido (ágar) em relação ao meio líquido para a esporulação devido ao elevado rendimento do primeiro, avaliado através da contagem do número de UFC mL^{-1} (unidades formadoras de colônias) nas suspensões obtidas pelos dois meios. Este é um dado relevante pensando-se na produção de esporos destinados à produção em escala industrial.

O uso de resíduos e subprodutos industriais como meio de cultivo para a produção de biomassa, enzimas, etc é bastante conhecido. Cesare-Vidaure *et al.* (1997) com o objetivo de selecionar componentes para um meio de cultivo economicamente viável testaram os subprodutos agroindustriais: melaço de cana como fonte de carbono e calda de milho como fonte de nitrogênio orgânico, concluindo que o melaço estimula o desenvolvimento do *Bacillus subtilis*. Osadchaya *et al.* (1977) e Warriner e Waites (1999) relataram aumento da produtividade do cultivo do *Bacillus subtilis* em meios contendo melaço e xaropes.

Este experimento objetivou o aproveitamento diferenciado dos subprodutos industriais provenientes de plantas de processamento de proteína isolada de soja (melaço e vinhaça) e do processamento da cana-de-açúcar (vinhaça ou vinhoto) como substratos para a produção de esporos termorresistentes e para a quantificação do *Bacillus atrophaeus* em ágar. Os resultados obtidos também serviram como base para a escolha dos substratos a serem testados em outros métodos de cultivo.

3.2.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 43

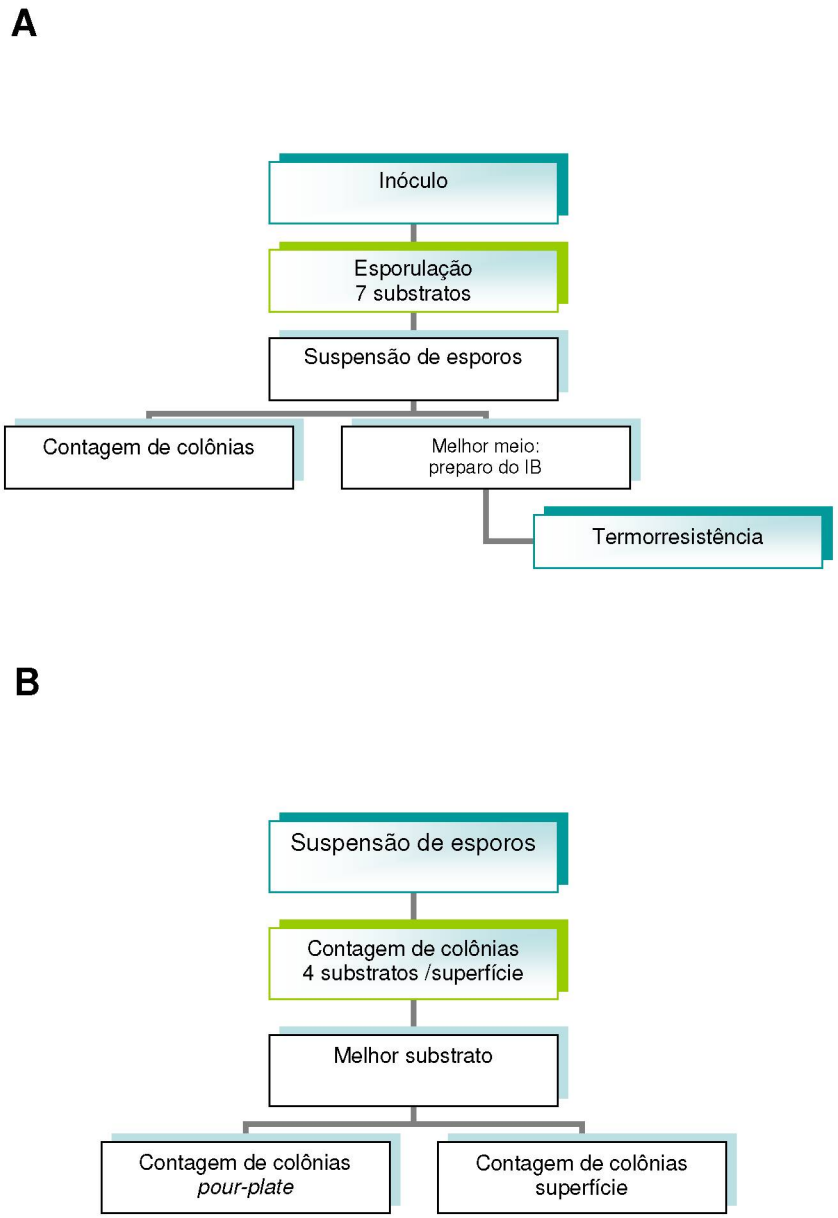


FIGURA 43 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES EM ÁGAR ENRIQUECIDO COM SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: (A) PRIMEIRA ETAPA; (B) SEGUNDA ETAPA

FONTE: O AUTOR

3.2.2.1 Inóculo

O inóculo foi produzido pela semeadura de 100 µL da suspensão de esporos (Lote 01/05-CPPI, N_o = 2,5 x 10^8 UFC.mL^{-1}) em tubo com 30 mL de caldo de soja tripticaseína, incubado por 18 horas a 36 ºC ± 2 ºC.

3.2.2.2 Esporulação

Foram testados diferentes subprodutos e resíduos agroindustriais sob distintas diluições, adicionados ou não de suplementos, em ágar (TABELA 25, FIGURA 44). Estas diluições foram calculadas objetivando fornecer concentrações de C e N aproximadas às do meio referência. 1,0 mL do inóculo foi semeado em garrafas de leite contendo 80 mL do ágar para esporulação a ser testado, inclinado. Incubado por 14 dias a 36ºC ± 2ºC.

TABELA 25 - DIFERENTES COMPOSIÇÕES DOS MEIOS CONTENDO RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* EM ÁGAR

MEIO/ COMP. (%)	**Ref.**	**(1)**	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(5)**	**(6)**	**(7)**
Caldo nutriente	0,4	-	-	-	-	-	-	-
Melaço de soja	-	1,2	1,0	2,0	0,7	-	-	-
Vinhaça de soja	-	-	-	-	-	2,9	-	-
Vinhaça de cana	-	-	-	-	-	-	q.s.p. 100,0	q.s.p. 100,0
Extrato de levedura	0,8	1,2	-	-	-	-	0,75	0,75
Triptona	-	-	-	-	-	-	0,6	-
Peptona de caseína	-	-	-	-	1,4	1,4	0,83	0,83
Fosfato de potássio	-	0,1	0,4	0,005	-	-	-	-
Sulfato de manganês	0,005		0,004	0,004		0,004	-	-
Cloreto de cálcio	0,005	-	-	0,004	0,004	0,004	0,017	-
Sulfato de magnésio	-	-	-	0,005	-	-	-	-
Ágar	3,0	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0

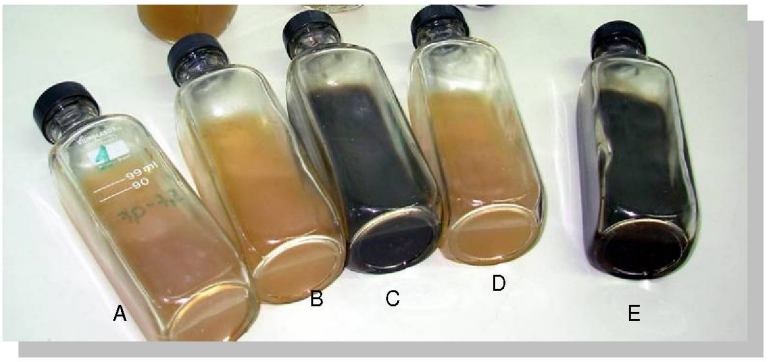


FIGURA 44 - DIFERENTES MEIOS DE ESPORULAÇÃO: (A) REFERÊNCIA; (B,D) COM MELAÇO DE SOJA; (C,E) COM VINHAÇA DE SOJA

FONTE: O AUTOR (2007)

O pH de todos os meios foi ajustado para 7,2 ± 0,2 com NaOH 0,1N. O acompanhamento da esporulação foi feito através de esfregaço corado pelo Método de coloração de Gram (nº de esporos ÷ 100 células contadas x 100). Nas culturas que apresentaram mais de 50% de esporulação, os esporos foram retirados do ágar, de forma asséptica, e suspensos em uma solução gelada de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7. Filtrados, lavados por 3 vezes em centrífuga refrigerada a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos a 4 ºC. Suspensos em 50 mL de uma solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7. A suspensão de esporos foi submetida ao aquecimento a 80ºC por 10 minutos para eliminação das formas vegetativas e contaminantes .

3.2.2.3 Quantificação

Foi realizada por diluição seriada decimal e inoculação, em duplicata, em superfície (método de Miles e Misra) e por *pour-plate*. Na inoculação em superfície foram inoculados 50 µL por diluição, o meio foi incubado a 36ºC ± 2ºC e a leitura foi realizada após 24 horas de incubação. Na inoculação por *pour-plate* foram utilizados 1,0 mL por diluição, o meio foi Incubado a 36ºC ± 2 ºC e a leitura foi realizada após 48 horas de incubação. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias, expresso em UFC.mL $^{-1}$. Os meios utilizados foram: (1) ágar de soja tripticaseína (referência); (2) melaço de soja 0,75%; triptona 0,75% e ágar 1,5%; (3) melaço de soja 2,0% e ágar 1,5%; (4) vinhaça soja 4,0%; extrato de levedura 0,1%; cloreto de sódio 0,1% e ágar 1,5%; (5) melaço de soja 0,75%;

peptona de caseína 0,75% e ágar 1,5%; (6) vinhaça de soja 5,0% e ágar 1,5%; (7) melaço de soja 0,1% e ágar 1,5% e (8) vinhaça de cana 8,0% e ágar 1,5%.

3.2.2.4 Preparo do indicador biológico

Foram inoculados em fitas estéreis de papel de filtro qualitativo de 48 g /m^2 medindo 2,5 x 1,0 cm, 10 µL das suspensões de esporos testadas. As fitas foram previamente tratadas com solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 11,0 (ajustado com hidróxido de cálcio), secadas por 2 horas em fluxo laminar e 18 horas a 24 horas em estufa a 45ºC. Após a secagem foram acondicionados assepticamente em frascos de 7 mL (tipo penicilina), estéreis, fechados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio. Mantidos a 5ºC ± 3ºC. O meio de recuperação foi preparado com caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bi-hidratado, 0,018%; amido solúvel, 0,1% e azul de bromotimol, 0,0015%, pH 6,8 ± 1,0. Envasado assepticamente, no volume de 3mL, em frasco-ampola de vidro neutro, estéril com capacidade para 7 mL. Armazenados a 5ºC ± 3ºC.

3.2.2.5 Resistência térmica

Em estufa com circulação de ar, pré-aquecida por no mínimo 30 minutos, foram expostas 10 unidades do indicador, à temperatura de 160ºC ± 2ºC, por diferentes tempos de exposição: 35, 30, 25, 20, 15 e 10 minutos. Os indicadores testados foram cultivados nos meio de recuperação, incubados a 36ºC ± 2ºC, por até 7 dias. O valor de *D* (tempo de redução decimal) e U_{sk} (tempo médio de morte) foram calculados pelo método da fração negativa e pelo método de Spearman-Kaber (USP 29, 2006). O teste foi realizado em duplicata.

3.2.2.6 Caracterização físico-química do melaço e da vinhaça de soja

A determinação da composição físico-química do melaço de soja (FIGURA 45),Lote MS01/07,e da vinhaça de soja , Lote VS 01/07, utilizados nos experimentos foram executadas:

1) No laboratório físico-químico do CPPI - o pH foi medido em potenciômetro digital, previamente calibrado e aferido; a concentração de carboidratos totais foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944); a umidade foi determinada pelo método termogravimétrico, usando estufa a 105ºC durante 24 horas (AACC Nº 44-20 ,1983).

2) Os ensaios para determinação do resíduo mineral fixo, proteínas, gordura total, graus Brix e sólidos totais, foram executados pelo laboratório do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - CEPPA da UFPR, de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz (IAL,2005).

FIGURA 45 - MELAÇO DE SOJA

FONTE: O AUTOR (2007)

3.2.3 Resultados e discussões

As características físico-químicas do melaço de soja e da vinhaça de soja utilizadas nos experimentos estão descritas na TABELA 26, demonstrando que o primeiro sofreu um processo de concentração até 75 ºBrix, como também a presença de 96% a 100% de açúcares não redutores em relação à concentração de açúcares totais, nos dois substratos.

Na primeira etapa da pesquisa foram testados sete diferentes meios contendo melaço de soja, vinhaça de soja e vinhaça de cana como substratos substitutos aos nutrientes sintéticos, para a esporulação do *Bacillus atrophaeus.* Como referência foi utilizado um meio sintético já reconhecido como fornecedor de uma alta produção de esporos. Os resultados demonstram que todos os substratos testados permitiram a esporulação (TABELA 27, FIGURA 46).

Os meios contendo melaço de soja não suplementado foram os que apresentaram os maiores índices de esporulação. Foi observado que a suplementação do melaço de soja com fontes adicionais de carbono e nitrogênio

tem ação negativa sobre a esporulação, inibindo-a, devido à presença de excesso de metabólitos produzidos ou de substratos não metabolizados.

TABELA 26 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MELAÇO DE SOJA E DA VINHAÇA DE SOJA

Produto/ Elementos	**Melaço de Soja -Lote MS01/07** (g /100,0mL)	**Vinhaça de Soja- Lote VS01/07** (g/100,0mL)
º Brix	75º	11°
Nitrogênio	0,8 ± 0,03	0,2 ± 0,007
Proteína (N x 6,25)	5,1 ± 0,2	1,3 ± 0,05
Resíduo Mineral Fixo	9,6 ± 0,2	2,0 ± 0,04
Gordura total	0,3 ± 0,006	1,9 ± 0,04
Açúcares totais	50,8 ± 1,8	8,3 ± 0,3
Açúcares redutores em glicose	2,0 ± 0,05	0
Açúcares não redutores em sacarose	48,8± 1,7	8,3 ± 0,3
Sólidos totais	76,2 ± 0,8	-
Umidade	12,3 ± 0,1	82,9 ± 0,7
pH	6,1± 0,1	4,7 ± 0,1
Densidade (g/mL)	1,338	1,054

Obs: Valor médio dos resultados da triplicata + desvio padrão
(-) não realizado

TABELA 27 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS CONTENDO SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM ÁGAR

Meio	**Controle da esporulação 7 dias**	**Controle da esporulação 14 dias**	**Esporos** (UFC.mL^{-1})
Referência - Meio sintético	Esporos: ±40%	Esporos: ±90%	1,4 x 10^9
(1) Melaço de soja 1,2% suplementado com extrato de levedura	Esporos: <10%	Esporos: ± 40%	-
(2) Melaço de soja 1,0% com fósforo e manganês	Esporos:±40%	Esporos: ±80%	6,0 x 10^8
(3) Melaço de soja 2,0% com sais	Esporos: ±40%	Esporos: ±90%	1,2 x 10^9
(4) Melaço de soja 0,7% suplementado com peptona de caseína	Ausência de Esporos	Ausência de Esporos	-
(5) Vinhaça de soja suplementada com peptona de caseína	Esporos: <10%	Esporos: ± 40%	-
(6) Vinhaça de cana suplementada com extrato de levedura e triptona	Esporos: <10%	Esporos: ± 40%	-
(7) Vinhaça de cana suplementada com extrato de levedura e peptona de caseína	Ausência de Esporos	Ausência de Esporos	-

O meio melaço de soja a 2,0% (~ 1,5 º Brix ou 0,5% de carboidratos totais) com adição de sais estimuladores da esporulação apresentou capacidade de produção de esporos similar ao meio de referência, podendo substituí-lo.

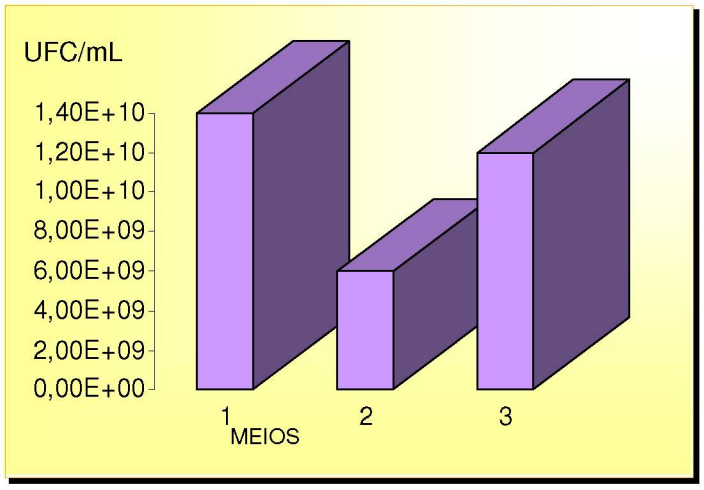


FIGURA 46 - ESPORULAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (1) REFERÊNCIA; (2) MELAÇO DE SOJA COM FÓSFORO E MANGANÊS; (3) MELAÇO DE SOJA 2,0% COM SAIS ESTIMULADORES DA ESPORULAÇÃO

O método oficial para a quantificação de esporos do *Bacillus atrophaeus* como indicador biológico para esterilização, preconiza o cultivo em ágar de soja tripticaseína. Para avaliar a aplicação dos resíduos e subprodutos industriais como nutrientes para a promoção da germinação e quantificação dos esporos, foram utilizados 11 lotes de suspensão de esporos com diferentes concentrações e foram avaliadas sete diferentes formulações de meios: (1) ágar de soja tripticaseína (referência); (2) melaço de soja 0,75%, triptona 0,75% e ágar 1,5%; (3) melaço de soja 2,0% e ágar 1,5%; (4) vinhaça soja 4,0%, extrato de levedura 0,1%, cloreto de sódio 0,1% e ágar 1,5%; (5) melaço de soja 0,75%, peptona de caseína 0,75% e ágar 1,5%; (6) vinhaça de soja 5% e ágar 1,5%; (7) melaço de soja 0,1% e ágar 1,5% e (8) vinhaça de cana 8%; ágar 1,5%.

O primeiro experimento utilizou a metodologia por semeadura de microgotas em superfície, por ser de mais rápida execução. Os meios nº 6 e 8, à base de vinhaças (vinhaça de soja 5,0% e vinhaça de cana 8,0%), não propiciaram o

desenvolvimento do microrganismo. O meio nº 7, melaço de soja 0,1%, apresentou contagem de colônias 50% inferior à do controle. A TABELA 28 demonstra os resultados dos meios nº 2, 3, 4 e 5, os quais apresentaram contagens semelhantes às do meio referência.

TABELA 28 - CONTAGEM DE COLÔNIAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (1) TSA-REFERÊNCIA; (2) MELAÇO DE SOJA E TRIPTONA; (3) MELAÇO DE SOJA 2,0%; (4) VINHAÇA SOJA E EXTRATO DE LEVEDURA; (5) MELAÇO DE SOJA E PEPTONA DE CASEÍNA, POR SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

AMOSTRA Nº	**TSA -ref.** (UFC.mL^{-1})	**MEL+TRIP** (UFC.mL^{-1})	**MEL 2%** (UFC.mL^{-1})	**VIN.+ LEV** (UFC.mL^{-1})	**MEL+PEP** (UFC.mL^{-1})
1	1,6 x 10^4	1,3 x 10^4	1,7 x 10^4	1,3 x 10^4	4,2 x 10^4
2	2,4 x 10^4	2,3 x 10^4	2,9 x 10^4	1,6 x 10^4	1,7 x 10^4
3	1,8 x 10^5	9,5 x 10^4	9,5 x 10^4	1,4 x 10^5	1,3 x 10^4
4	4,3 x 10^5	4,3 x 10^5	4,0 x 10^5	3,9 x 10^5	3,3 x 10^5
5	5,1 x 10^6	4,3 x 10^6	3,2 x 10^6	6,1 x 10^6	4,4 x 10^6
6	1,0 x 10^6	8,4 x 10^5	8,0 x 10^5	6,6 x 10^5	5,9 x 10^5
7	3,5 x 10^7	2,2 x 10^7	1,9 x 10^7	3,7 x 10^7	2,9 x 10^7
8	3,5 x 10^7	2,2 x 10^7	1,9 x 10^7	2,2 x 10^7	2,7 x 10^7
9	2,2 x 10^8	1,2 x 10^8	1,9 x 10^8	1,9 x 10^8	1,6 x 10^8
10	1,0 x 10^8	9,2 x 10^7	1,7 x 10^8	1,0 x 10^8	9,1 x 10^7
11	8,0 x 10^7	6,9 x 10^7	4,2 x 10^7	7,4 x 10^7	3,6 x 10^7

A análise estatística das variâncias (ANOVA) forneceu F= 0,1030, e $p \geq 0,05$, demonstrando que não existe diferença estatisticamente significativa entre os cinco meios, num nível de confiança de 95%, como está também demonstrado na FIGURA 47.

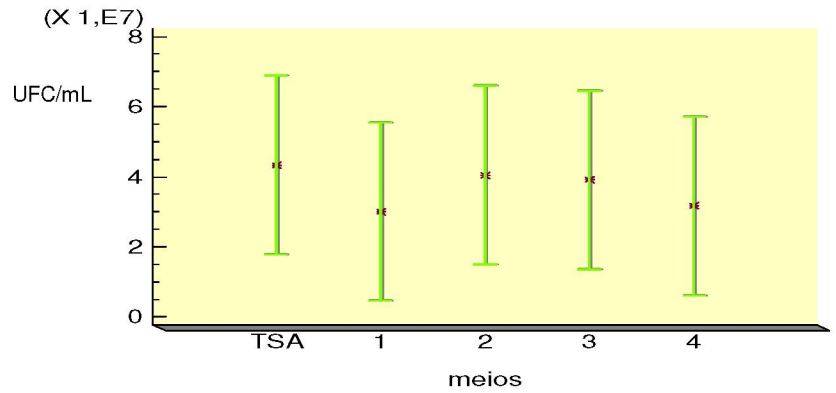


FIGURA 47 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER DA CONTAGEM DE COLÔNIAS DE SUSPENSÕES DE ESPOROS DO B*acillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (1) TSA-REFERÊNCIA; (2) MELAÇO DE SOJA E TRIPTONA; (3) MELAÇO DE SOJA 2,0%; (4) VINHAÇA DE SOJA E EXTRATO DE LEVEDURA; (5) MELAÇO DE SOJA E PEPTONA DE CASEÍNA

Um segundo experimento foi realizado comparando o meio controle com o meio melaço de soja a 2,0%, utilizando a semeadura por *pour-plate*. A escolha deste meio foi devido à ausência de suplementos e facilidade de preparo (redução de custo do meio). Os resultados (TABELA 29, FIGURA 48) demonstraram que o meio melaço 2,0% apresentou contagem de colônias semelhantes ao meio controle.

TABELA 29 - CONTAGEM DE COLÔNIAS DO *Bacillus atrophaeus* NOS MEIOS: TSA E ÁGAR MELAÇO

AMOSTRA	**TSA** (UFC.mL^{-1})	**ÁGAR MELAÇO 2,0%** (UFC.mL^{-1})
1	2,7 x 10^4	1,8 x 10^4
2	3,9 x 10^4	6,9 x 10^4
3	3,5 x 10^5	2,9 x 10^5
4	5,0 x 10^5	4,1 x 10^5
5	7,7 x 10^6	7,8 x 10^6
6	1,0 x 10^6	8,5 x 10^5
7	4,1 x 10^7	2,5 x 10^7
8	4,1 x 10^7	2,5 x 10^7
9	1,9 x 10^8	1,8 x 10^8
10	1,8 x 10^8	1,4 x 10^8
11	5,60 x 10^7	6,3 x 10^7
Média	4,7 x 10^7	4,0 x 10^7
Mediana	7,7 x 10^6	7,8 x 10^6
Variância	5,1 x 10^{15}	4,0 x 10^{15}

A aplicação do Teste F nos resultados forneceu: F= 1,2840, *p* = 0,7000, intervalo de confiança = 0,3454 a 4,7726, demonstrando que não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras num nível de confiança de 95%. A aplicação do teste *t*-Student forneceu: *t*= -0,2387*; p* = 0, 8137, intervalo de confiança =-5,3 x 10^7 a 6,4 x 10^7. Concluindo que, com 95% de confiança, não há uma diferença significativa nos resultados.

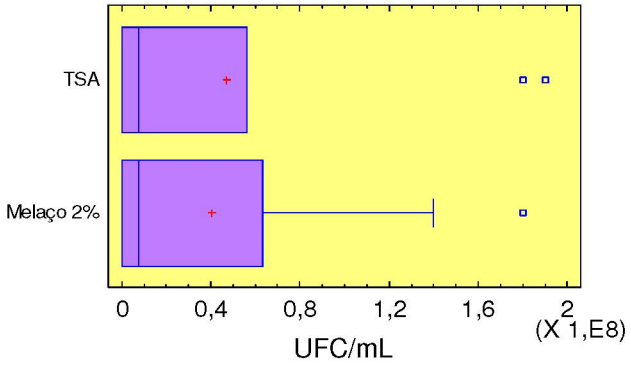


FIGURA 48 - BOX E WISKER PLOT DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO *Bacillus atrophaeus* OBTIDAS NOS MEIOS: REFERÊNCIA (TSA) E ÁGAR MELAÇO 2,0%

Indicadores biológicos produzidos a partir das suspensões de esporos originadas dos meios de esporulação nº 2 (melaço de soja e triptona), nº 3 (melaço de soja 2,0%) e do meio referência, foram submetidos à avaliação da sua resistência térmica ao calor seco (160ºC). Foram determinados os valores de *D*, ou tempo de redução decimal, e os valores de $U_{sk,}$ou tempo médio de morte, para todas as amostras.

Os resultados (FIGURA 49) demonstraram que todos os indicadores testados apresentaram resistência térmica superior aos valores mínimos preconizados pelas normas internacionais (*D*= 1,0 min a 3,0 min e U_{sk}= 10,0 min a 30,0 min), indicando que esporos produzidos com os resíduos e subprodutos testados como substrato, possuem a mesma resistência térmica que aqueles produzidos apenas em meios industrializados, nas mesmas condições de cultivo.

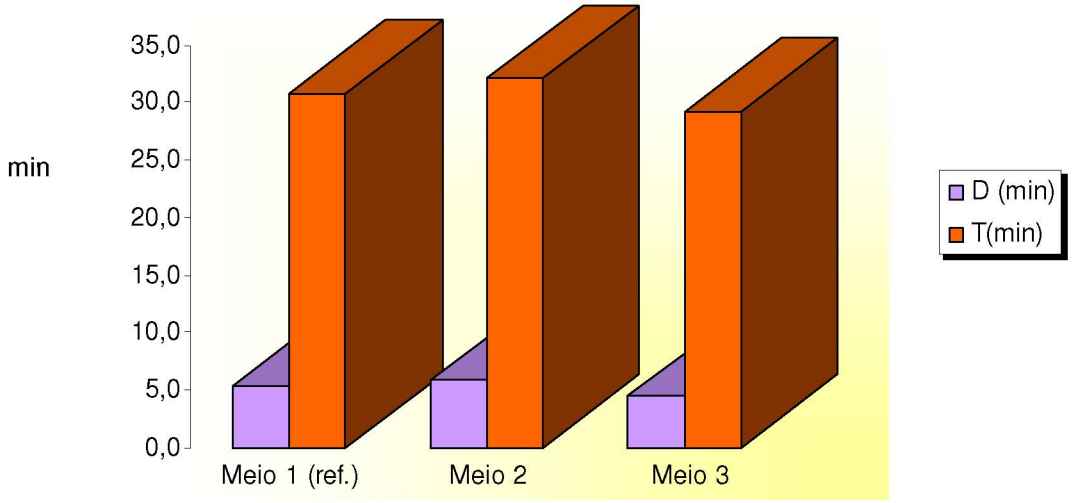


FIGURA 49 - RESISTÊNCIA TÉRMICA AO CALOR SECO, 160ºC (D e U_{sk}) DOS ESPOROS OBTIDOS COM OS MEIOS: (1) REFERÊNCIA- TSA; (2) MELAÇO DE SOJA COM FÓSFORO E MANGANÊS; (3) MELAÇO DE SOJA 2,0% COM SAIS

Estes resultados também indicam que o melaço de soja é um substrato potencial para outras metodologias de cultivo, como fermentação submersa e fermentação em estado sólido.

3.3 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* COM SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

3.3.2 Introdução

Os métodos descritos de produção de esporos para o preparo de indicadores biológicos, apresentam diferentes formulações para o meio de esporulação, tais como: ágar nutriente suplementado com $MnSO_4$ (LÓPEZ *et al.*, 1996); ágar para esporulação suplementado com metais (CAZEMIER *et al.*, 2001; FAILLE *et al.*, 1977); meio de esporulação de Schaeffer's ou SSM (SCHAEFFER *et al.*, 1965); ágar para contagem de colônias suplementado com amido solúvel, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e cloreto de cálcio (PENNA *et al.*, 1996). Estes métodos requerem um longo período de incubação, aproximadamente 14 dias, e o uso de substratos de alto custo.

O desenvolvimento de um método de cultivo simples, rápido, e que forneça uma alta quantidade de esporos (superior a 10^6 UFC.g $^{-1}$), reduzindo os custos da produção industrial e tornando o produto final mais acessível aos serviços de saúde, é altamente desejável. Soccol *et al.* (2001) obtiveram um importante melhoramento na produção de tecidos vegetais utilizando o bagaço de cana em substituição ao ágar no meio de crescimento, reduzindo os custos de produção. Muitos pesquisadores têm obtido bons resultados com o cultivo de bactérias do gênero *Bacillus* através da fermentação em estado sólido para obtenção de diferentes produtos, tais como: enzimas (α amilase, pectinase), bioinseticidas, ácido poli-glutâmico, lipopeptídeos antifúngicos, etc. Pesquisas utilizando a fermentação em estado sólido para a produção de esporos visando à produção de indicadores biológicos para a esterilização não foram encontradas na literatura.

Este experimento buscou o aproveitamento diferenciado dos resíduos industriais provenientes de plantas de processamento de proteína isolada de soja (melaço e vinhaça de soja) e de processamento da cana-de-açúcar (vinhaça de cana ou vinhoto) como substratos para testar diferentes metodologias para produção de esporos do *Bacillus atrophaeus.*

3.3.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 50

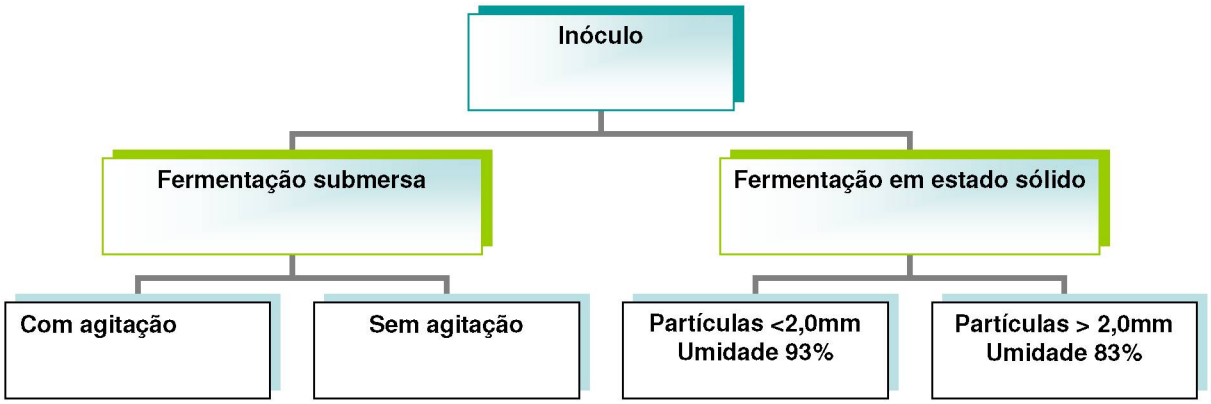


FIGURA 50 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS

FONTE: O AUTOR

3.3.2.1 Microrganismo

Cepa padrão do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 liofilizada, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –INCQS, Lote 1403349.

3.3.2.2 Inóculo

Foram semeados 50 µL da suspensão de esporos do *Bacillus atrophaeus,* Lote CPPI nº01/05 (2,5 x 10^8 UFC.mL^{-1}) em 3 tubos com 30 mL de caldo de soja tripticaseína cada. Incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC. Os meios de esporulação foram Inoculados com 1,0% a 3,0 % (v/v) do pool do inóculo produzido (1,0% para os meios em ágar e 3,0% para os meios líquidos).

3.3.2.3 Meio de esporulação de referência

O cultivo foi realizado em garrafa de leite, contendo 80 mL do meio de esporulação: extrato de levedura, 0,8g%; caldo nutriente, 0,4g%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005g%; $CaCl_2.6H_2O$, 0,005g%; ágar, 3,0g%, pH ajustado para 7,0 ± 0,2 com NaOH 0,1N. O meio foi autoclavado a 121ºC por 15 minutos. A temperatura de incubação foi 36ºC ± 2ºC, e o tempo de incubação foi de 9 dias a 14 dias.

3.3.2.4 Preparo da suspensão de esporos

Os meios que apresentaram mais de 50% de esporos e ausência de contaminantes, foram suspensos em 100 mL de água destilada estéril gelada, filtrados em funil com gaze e algodão, lavados por 4 vezes em centrífuga refrigerada a 2500 rpm (1048 g), por 20 min a 4 ºC, com água destilada estéril gelada (SELLA, 1995). Recuperados em 50 mL água destilada estéril gelada e envasados no volume de 5 mL em frasco-ampola de vidro neutro, de 7 mL, esterilizados. Lacrados e submetidos a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes. Armazenados a 5ºC ± 3º C. Na FES, foram adicionados ao fermentado 100 mL de água destilada gelada com Tween 80 (0,01%) e pérolas de vidro estéreis, a mistura foi agitada em shaker a 4 ºC por uma hora a 250 rpm, antes de ser filtrada.

3.3.2.5 Monitoramento da esporulação

O acompanhamento da esporulação foi feito através de microscopia, utilizando coloração de Gram. O resultado foi demonstrado pela porcentagem de esporos (% esporos = nº de esporos /nº de células [esporos+bacilos] x 100, contatos no mínimo em 5 campos). As amostras foram retiradas no 7.º, 10.º e 14.º dia de incubação.
Nos experimentos de FES, foram retiradas amostras, com uma pinça estéril, em cinco pontos eqüidistantes do fermentado. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro e 5 mL de água destilada estéril com 0,01% de Tween 80, agitadas em vortex por três minutos. Foram adicionados mais 5 mL de água destilada estéril com 0,01 % de Tween 80, as amostras foram agitadas em vortex por mais 3 minutos. Filtradas em papel de filtro. O filtrado foi centrifugado a

3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento fixado numa lâmina e corado pelo Método de Gram.
Na fermentação submersa, foram retirados 10 mL do fermentado, com pipeta estéril, este foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento fixado numa lâmina e corado pelo Método de Gram.

3.3.2.6 Quantificação

A quantificação foi realizada por diluição seriada decimal e inoculação, em duplicata, na superfície do ágar de soja tripticaseína. Na inoculação foram utilizados 50 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a 36ºC ± 2ºC por 18 horas a 24 horas. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias e expresso em UFC.mL $^{-1}$.

3.3.2.7 Esporulação pela técnica de fermentação submersa

Utilizaram-se diferentes tipos de meios complexos provenientes de resíduos agroindustriais como: melaço de soja (~75º Brix), vinhaça de soja (~11º Brix) e vinhaça de cana (~2º Brix), em diferentes concentrações, adicionados, ou não, de suplementos, com e sem agitação.
O meio de referência utilizado possuía a seguinte composição: caldo nutriente 0,4%; extrato de levedura 0,8%; sulfato de manganês mono-hidratado 0,0038%; cloreto de cálcio di-hidratado 0,0034%.
Os meios líquidos complexos para esporulação testados foram os seguintes:

1) Melaço de soja diluição 1/10 em água destilada;
2) Melaço de soja diluição 1/20 em água destilada;
3) Melaço de soja diluição 1/100 em água destilada;
4) Melaço de soja diluição 1/10 em água destilada, adicionado de sais indutores da esporulação;
5) Melaço de soja diluição 1/30 em água destilada, adicionado de sais indutores da esporulação;
6) Melaço de soja diluição 1/50 em água destilada, adicionado de sais indutores da esporulação;

7) Melaço de soja diluição 1/100 em água destilada, adicionado de sais indutores da esporulação;
8) Melaço de soja diluição 1/150 em água destilada, adicionado de sais indutores da esporulação;
9) Melaço de soja diluição 1/140+ peptona de caseína: melaço de soja 0,7%; peptona de caseína 1,4%; cloreto de cálcio bi-hidratado 0,0034%; água destilada.
10) Vinhaça de soja 1/35 + peptona de caseína: vinhaça de soja 2,9%; peptona de caseína 1,4g%; cloreto de cálcio bi-hidratado 0,0034g%; sulfato de manganês mono-hidratado 0,0038g%; água destilada .
11) Vinhaça de cana + extrato de levedura: extrato de levedura, 0,75g%; peptona de caseína 0,83g%; vinhaça de cana q.s.p.
12) Melaço de soja + extrato de levedura: extrato de levedura 1,2g%; melaço de soja, 1,2%; fosfato diácido de potássio anidro 0,1g%; água destilada.
13) Melaço de soja + fosfato e manganês: melaço de soja 1,0%; fosfato diácido de potássio anidro, 0,4g%; sulfato de manganês mono-hidratado 0,004g%; água destilada.

Foram preparados 100 mL de cada meio e acondicionados em frasco Erlenmeyer de 250 mL fechados com tampão de gaze. Autoclavados por 15 minutos a 121ºC. Mantidos na temperatura 5ºC ± 3ºC até a inoculação. Todas as culturas foram incubadas em estufa 36ºC ± 2ºC e mais uma amostra, com 100 mL, das culturas nº 1,7,8,13 e 14 também foram incubadas a 36ºC ± 2ºC, sob agitação orbital de 200rpm em agitador tipo shaker, por até 14 dias.

3.3.2.8 Esporulação pelo método de fermentação em estado sólido

O bagaço de cana moído, proveniente da COCAMAR de Cianorte-PR, foi classificado em tamis MESH 9, fornecendo assim partículas maiores e menores que 2,8 mm, lavado uma vez com água de torneira e duas vezes com água destilada, secado em bandejas por 24 horas a 90ºC, em estufa com circulação de ar (FIGURA 51). Os experimentos foram executados em frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, boca larga, tampão de algodão, onde foram adicionados 5,0 g do bagaço de cana seco. Os substratos foram preparados em tampão fosfato pH 7,8 (visando neutralizar a acidez do bagaço), o pH foi verificado após a adição de todos

componentes e corrigidos para pH 7,8com NaOH 0,1N. Os substratos foram adicionados ao suporte seco antes da autoclavação (121ºC por 15 min). O inóculo, a uma taxa de 6,4 x 10^7 UFC.g^{-1}, foi adicionado ao meio já esterilizado, e depois homogeneizado vigorosamente, em cabine de fluxo laminar. O cultivo foi incubado em estufa, a 36ºC ± 2ºC por 9 dias e 14 dias.

FIGURA 51 - SECAGEM DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR EM ESTUFA
FONTE: O AUTOR (2007)

A massa de água adicionada para o ajuste da umidade inicial foi calculada pela seguinte fórmula:

$$Umidade = \frac{massa_{H_2O}}{massa_{H_2O} + massa_{\sec a}}$$

Os substratos testados foram:

1) Substratos sintéticos: peptona de carne 0,3%; triptona 0,5%; extrato de carne 0,3%; extrato de levedura 0,5% e sais estimuladores da esporulação;
2) Sais estimuladores da esporulação;
3) Melaço de soja 1,0 %; sulfato de manganês 0,004 %; fosfato diácido de potássio 0,4% e sais estimuladores da esporulação;
4) Melaço de soja 2,0% e sais estimuladores da esporulação.

Os sais estimuladores da esporulação apresentaram a seguinte formulação: K_2HPO_4. H_2O, 0,005%; $MnSO_4$. H_2O, 0,004%; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,004%; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,005%.

Os cultivos (FIGURA 52) foram realizados em duplicata e os dados apresentados representam a média dos resultados.

FIGURA 52 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM FRASCO ERLENMEYER COM DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS

FONTE: O AUTOR (2007)

3.3.2.9 Determinação da composição centesimal do bagaço de cana

A composição química do bagaço de cana (denominado Lote BC 01/07) foi executada de acordo com os métodos da AOAC (AOAC, 2000). A determinação da atividade de água (A_w) foi executada no aparelho Aqualab CX-2. O pH foi obtido após a diluição de 1,0g do produto em 10 mL de água, a suspensão foi homogeneizada através de vortex e medido em potenciômetro digital. O conteúdo de lipídios foi fornecido pelo método de Soxhlet: determinado por gravimetria após extração com acetato de etila, após refluxo, por duas horas em extrator. O teor de nitrogênio total e de proteínas foi obtido pelo método de Kjeldahl. A concentração de carboidratos totais foi determinada pelo método titulométrico de Somogyi-Nelson. O conteúdo de cálcio e magnésio foi determinado por titulação com EDTA, e o de

fósforo pelo método do azul de molibdênio. A umidade e as cinzas foram determinadas pelo método termogravimétrico (AACC Nº 44-20 ,1983).

3.3.3 Resultados e discussões

Alguns pesquisadores vêm trabalhando no desenvolvimento de meios de cultivo que aumentem o grau de esporulação do *Bacillus subtilis.* Na literatura encontramos diferentes resultados: de 1,0 x 10^5 esporos.mL^{-1} (CAYUELA *et al.,* 1993) a 7,4 x 10^9 esporos.mL^{-1}, em batelada alimentada (MONTEIRO *et al.*, 2005), os quais também estão relacionados com a cepa utilizada e ao processo de cultivo. Nenhum estudo foi encontrado sobre a produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* resistentes ao calor seco por fermentação submersa.

Os resultados obtidos, demonstrados na TABELA 30, confirmaram os relatados por Hoxey *et al.* (1985) e Pinto e Saito (1992), que meios líquidos não produzem uma quantidade suficiente de esporos para uso em escala industrial.

TABELA 30 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA SEM AGITAÇÃO

MEIO DE CULTIVO	**9 dias de incubação** (esporos)	**14 dias de incubação** (esporos)	**pH final**
Meio Referência	< 10%	< 50	7,3
1- Melaço de soja 1/10	Ausência	Ausência	7,2
2- Melaço de soja 1/20	Ausência	< 10%	7,3
3- Melaço de soja 1/100	Ausência	± 40%	8,0
4- Melaço de soja 1/10, com sais estimuladores	Ausência	Ausência	7,2
5- Melaço de soja 1/30 com sais estimuladores	Ausência	< 10%	7,2
6- Melaço de soja 1/50 com sais estimuladores	Ausência	< 10%	7,3
7- Melaço de soja 1/100 com sais estimuladores	Ausência	Ausência	7,4
8- Melaço de soja 1/150 com sais estimuladores	Ausência	< 10%	8,0
9- Melaço de soja 0,7% com peptona de caseína	< 10%	± 40%	7,2
10-Vinhaça de soja 1/35 com peptona de caseína	Ausência	Ausência	7,3
11- Vinhaça de cana com extrato de levedura	Ausência	Ausência	7,2
11- Melaço de soja 1,2% com extrato de levedura	Ausência	Ausência	7,2
12- Melaço de soja 1,0% com sais estimuladores	Ausência	Ausência	7,3

Os dados obtidos (TABELA 31) demonstraram que a agitação não estimulou a esporulação, ao contrário, os mesmos meios quando cultivados sem agitação apresentaram melhores resultados. Também foi observada uma alcalinização do meio no final do processo. Vinter (1969) relaciona o aumento de pH do fermentado à contínua assimilação dos produtos ácidos pelos esporos durante o cultivo. Cita também que esta mudança de pH não afeta a concentração de esporos obtida.

TABELA 31 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM AGITAÇÃO

MEIO DE CULTIVO	**48 horas de incubação** (esporos)	**9 dias de incubação** (esporos)	**14 dias de incubação** (esporos)	**pH final**
Meio Referência	Ausência	<10%	Ausência	9, 0
3- Melaço de soja 1/100	Ausência	Ausência	Ausência	9,0
5- Melaço de soja 1/30 com sais estimuladores	Ausência	Ausência	Ausência	9,0
6- Melaço de soja 1/50 com sais estimuladores	Ausência	Ausência	Ausência	8,0
8- Melaço de soja 1/150 com sais estimuladores	Ausência	Ausência	Ausência	9,0
9- Melaço de soja 0,7% com peptona de caseína	Ausência	Ausência	Ausência	9,0

A escolha do bagaço de cana como suporte para a FES (FIGURA 53) deveu-se primeiramente à facilidade de obtenção , manuseio, armazenamento e estabilidade depois de seco. As características fisico-químicas do lote testado estão descritas na TABELA 32.

FIGURA 53 - BAGAÇO DE CANA LAVADO, SECO E TAMIZADO PARA USO EM FES
FONTE: O AUTOR (2007)

TABELA 32 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA SECA

Elementos	Peso em massa seca (%)
Nitrogênio total	0,17 ± 0,006
Proteína	1,43 ± 0,05
Cinzas	3,44 ± 0,07
Lipídios	1,49 ± 0,03
Fibra bruta	48,17 ± 4,77
Carboidratos totais	1,64 ± 0,06
Cálcio	0,22 ± 0,02
Fósforo	0,013 ± 0,01
Magnésio	0,20 ± 0,02
Umidade	3,4 ± 0,3
A_w	0,288 (t= 19,3ºC)
pH	5,2 ± 0,1

Obs: Valor médio dos resultados da triplicata+desvio padrão

A baixa concentração de íons inorgânicos (cálcio, fósforo e magnésio) em relação ao obtido por MacGregor (2000) , ver TABELA 20, provavelmente deveu-se à metodologia de preparo do bagaço para uso como suporte para a FES, que utilizou três lavagens sucessivas com água, retirando, desta forma, os sais solúveis do material.

O teor de fibra bruta encontrado foi similar ao observado por Silva *et al.*(2007) e MacGregor (2000), e inferior ao obtido por Martin *et al.* (2000) provavelmente foi devido à metodologia de doseamento empregada, que utilizou hidrólise ácida seguida de hidrólise básica. Neste processo a hemicelulose pode ser solubilizada pelo rompimento das ligações do tipo éster com a lignina. Uma hidrólise parcial da celulose também pode ter ocorrido no processo. A utilização de outros métodos, tais como fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido, é recomendada para uma determinação mais precisa.

A baixa atividade de água (0,288) e a umidade (3,4%) permitem uma maior absorção do substrato. Convém lembrar que a composição química do bagaço de cana pode variar de acordo com o tipo de cana, o tipo de solo, o clima, a região, as técnicas de colheita e até de manuseio e preparo.

No primeiro experimento de cultivo por fermentação em estado sólido foram utilizados quatro substratos diferentes, umidade inicial de 83% e 14 dias como período de incubação. As melhores produções de esporos foram observadas no meio nº 1 e no meio nº 4 (TABELA 33). No entanto, todos os substratos testados

apresentaram uma produção de esporos semelhante ao meio de referência. Além disso, o acompanhamento da esporulação demonstrou uma taxa de 40% a 90% de esporos em apenas nove dias de incubação.

No segundo experimento, foram testados somente os dois meios que apresentaram os melhores resultados na primeira etapa. A umidade inicial foi ajustada para 93% e o tempo de incubação foi fixado em nove e 14 dias. Os resultados obtidos, também demonstrados na TABELA 33, confirmaram a produção de uma alta esporulação em apenas nove dias de incubação. Além da redução do tempo de incubação em cinco dias, a FES promoveu um aumento de aproximadamente dois log (100 vezes) na biomassa de esporos produzidos, em relação ao meio de referência.

TABELA 33 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FES COM DIFERENTES SUBSTRATOS

	UMIDADE: 83% TAMANHO DA PARTÍCULA >2,0mm		**UMIDADE: 93% TAMANHO DA PARTÍCULA <2,0mm**	
SUBSTRATOS DA FES	**9 DIAS: ESPOROS** (UFC. g^{-1} massa seca)	**14 DIAS: ESPOROS** (UFC. g^{-1} massa seca)	**9 DIAS: ESPOROS** (UFC. g^{-1} massa seca)	**14 DIAS: ESPOROS** (UFC. g^{-1} massa seca)
1- Substratos sintéticos	$2,1 \times 10^{8}$	$3,2 \times 10^{8}$	$1,4 \times 10^{9}$	$4,4 \times 10^{9}$
2- Sais estimuladores	$1,1 \times 10^{7}$	$1,6 \times 10^{7}$	-	-
3- Melaço de soja 1,0% com sais estimuladores	$2,4 \times 10^{7}$	$3,6 \times 10^{7}$	-	-
4- Melaço de soja 2,0% com sais estimuladores	$1,1 \times 10^{8}$	$1,7 \times 10^{8}$	$2,8 \times 10^{9}$	$3,.0 \times 10^{9}$
Agar para esporulação (referência)	$3,2 \times 10^{6}$ (UFC. g^{-1} ágar)	$9,6 \times 10^{7}$ (UFC. g^{-1} ágar)	-	-

A FIGURA 54 mostra que partículas menores que 2,0 mm forneceram a melhor produção de esporos ($4,4 \times 10^{9}$ UFC.g^{-1} massa seca), com um período de incubação de 14 dias. Isso ocorre porque partículas menores apresentam uma maior superfície de contato, levando a uma maior capacidade de absorção do substrato e permitido o alcance de uma maior taxa de umidade, sem a presença de água livre.

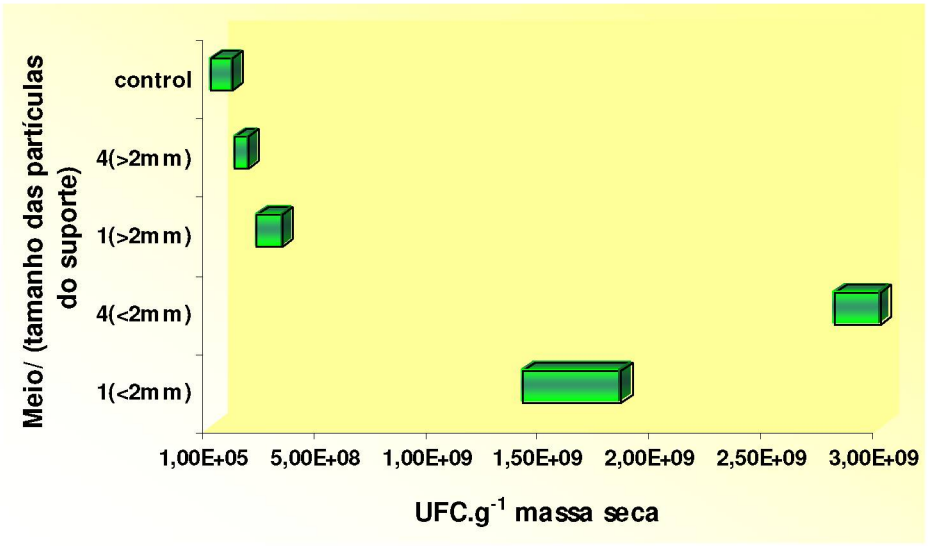


FIGURA 54 - ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM DIFERENTES SUBSTRATOS E TAMANHOS DE PARTÍCULA , 9 E 14 DIAS DE INCUBAÇÃO: (1) SUBSTRATOS INDUSTRIALIZADOS;(4) MELAÇO DE SOJA 2,0% COM SAIS ESTIMULADORES

A técnica de FES, com os substratos que forneceram uma contagem de esporos igual ou superior a 2,1 x 10^8 UFC.g^{-1} (mediana) pode substituir o método tradicional da esporulação em ágar. Os substratos nº 1 (industrializados) e nº 4 (melaço de soja 2,0% com sais estimuladores da esporulação) podem ser utilizados na FES, tendo o bagaço de cana com partículas menores que 2,0 mm como suporte e nove dias como período de incubação.

3.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES DO *Bacillus atrophaeus*

3.5.1 Introdução

Os processos fermentativos envolvem uma série de variáveis que podem interferir nos resultados desejados. Os dados obtidos na literatura sobre a fisiologia do microrganismo em estudo, bem como sua biologia molecular, são úteis para nortear os parâmetros iniciais do desenvolvimento do processo fermentativo. Porém, estudos minuciosos são necessários quando se deseja otimizar esses processos. Numa visão superficial, não se consegue perceber a interação entre vários destes fatores sem a realização de uma quantidade exagerada de análises (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Ao se pensar na otimização de um processo fermentativo, é importante que haja um planejamento prévio, pois este irá minimizar o tempo e o custo das experimentações necessárias para se obter os parâmetros ótimos. O uso de planejamentos experimentais, baseados em princípios estatísticos, pode extrair do processo em estudo o máximo de informação, com um número mínimo de experimentos (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Por meio de uma seqüência de planejamentos experimentais, diversos ensaios foram realizados com o objetivo de estudar os possíveis efeitos das variáveis do processo, seguido do uso de modelos estatisticamente válidos para descrever os efeitos e as possíveis interações existentes entre estas variáveis.

Delineamentos fatoriais completos e incompletos foram aplicados em várias etapas de otimização. As influências das seguintes variáveis independentes foram estudadas: tamanho da partícula do suporte; umidade inicial do sistema; pH inicial do substrato; tempo de incubação e tamanho do inóculo. Posteriormente também foi avaliado o efeito nos resultados das diferentes fontes de cálcio e o efeito do tamponamento.

As condições físicas e nutricionais do processo de esporulação determinam as características do esporo formado, tais como termorresistência e capacidade de germinação (FEAVERS, *et al.*,1990; RASO *et al.*,1998; REDMOND, *et al.*, 2004 VRIES, *et al.*,2005). Este experimento também avaliou a resistência térmica dos esporos formados através do processo de FES otimizado.

3.5.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 55.

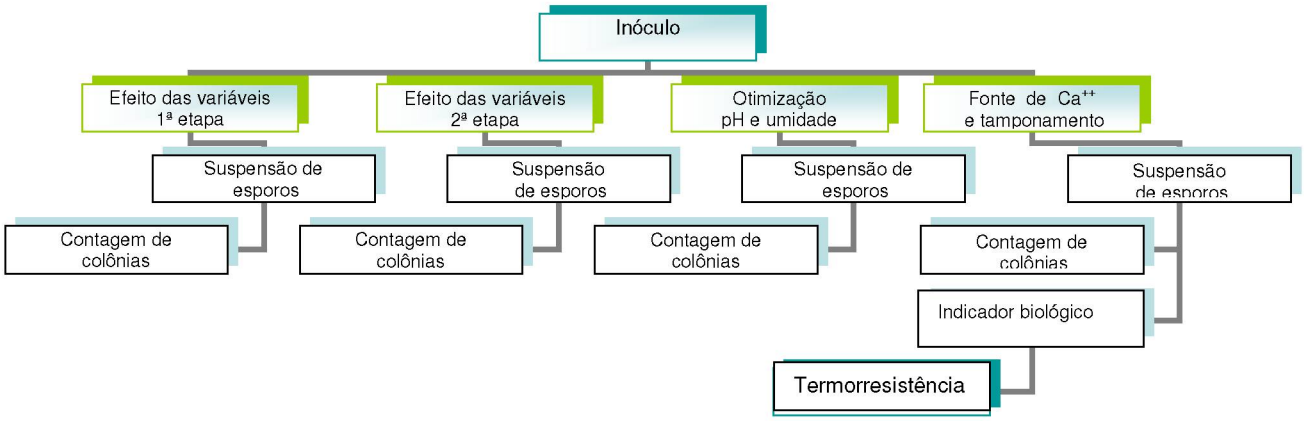


FIGURA 55 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS TERMORRESISTENTES

FONTE: O AUTOR

3.4.2.1 Microrganismo

Cepa padrão do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 liofilizada, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –INCQS,Lote 1403349.

3.4.2.2 Inóculo

Foram semeados 50 µL da suspensão de esporos do *Bacillus atrophaeus,* Lote CPPI nº 01/05 (2,5 x 10^8 UFC.mL^{-1}) em 3 tubos com 30 mL de caldo de soja tripticaseína cada. Incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC.

3.4.2.3 Fermentação em estado sólido

O bagaço de cana moído, proveniente de COCAMAR de Cianorte-PR, foi classificado em tamises com diferentes graduações, MESH 42 a MESH 9, fornecendo assim partículas entre 0,35 mm a 2,0 mm, lavado uma vez com água de torneira e duas vezes com água destilada, secado em bandejas, por 24 horas a 90ºC, em estufa com circulação de ar. Todos os experimentos foram executados em frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, boca larga, tampão de algodão, onde foram adicionados 5,0 g do bagaço de cana seco. O substrato utilizado foi melaço de soja 2,0g% (~ 1,5 º Brix ou 0,5% de carboidratos totais), adicionado de sais estimuladores da esporulação (K_2HPO_4. H_2O, 0,005%; $MnSO_4$. H_2O, 0,004%; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,004%; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,005%), conforme resultados obtidos em ensaio anterior (ver 3.3), preparado de acordo com a especificação de cada experimento, inicialmente diluído tampão fosfato (visando neutralizar a acidez do bagaço). O pH do substrato foi verificado após a adição de todos os componentes e corrigido de acordo com a especificação de cada experimento. Os substratos foram adicionados ao suporte seco antes da autoclavação (121 ºC por 15 minutos). O volume de inóculo foi calculado em relação ao volume do substrato e foi adicionado ao meio já esterilizado por homogeneização vigorosa, em cabine de fluxo laminar. O cultivo foi incubado em estufa, a 36ºC $\pm$ 2ºC.

3.4.2.4 Avaliação dos efeitos das variáveis independentes: primeira etapa

Para o estudo do efeito do tamanho da partícula do suporte, da taxa de inóculo, da umidade inicial do sistema, do tempo de fermentação e do pH inicial do substrato, foi utilizado um delineamento fatorial fracionado $2^{(5-2)}$. Composto de 5 fatores, 2 níveis e três pontos centrais, os 8 experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 19 experimentos, como mostrado nas TABELAS 34 e 35.

TABELA 34 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA 1.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Variáveis	Nível -1	0	+1
Tamanho médio da partícula (mm)	0,6	1,1	1,6
Umidade (%)	83	87	91
Tempo de incubação (dias)	9	12	15
pH inicial do substrato	7,2	7,6	7,8
Taxa de Inóculo (%)	3,0	6,0	9,0

TABELA 35 - DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONADO $2^{(5-2)}$ - 1.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	Replicata	Tamanho médio da partícula	Umidade	Tempo de incubação	pH inicial do substrato	Tamanho do Inoculo
1	1 e 2	+1	+1	+1	+1	+1
2	1 e 2	+1	+1	-1	+1	-1
3	1 e 2	+1	-1	+1	-1	+1
4	1 e 2	+1	-1	-1	-1	-1
5	1 e 2	-1	+1	+1	-1	-1
6	1 e 2	-1	+1	-1	-1	+1
7	1 e 2	-1	-1	+1	+1	-1
8	1 e 2	-1	-1	-1	+1	+1
9 (pto.central)	1 , 2 e 3	0	0	0	0	0

A taxa do inóculo de 3% em relação ao volume do substrato, correspondeu a 4,0 x 10^7 UFC.g^{-1} de massa seca; a de 6% correspondeu a 9,0 x 10^7UFC.g^{-1} de massa seca, e a taxa de 9% correspondeu a 2,0 x 10^8UFC.g^{-1} de massa seca.

3.4.2.6 Avaliação dos efeitos das variáveis independentes: segunda etapa

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa, foi utilizado um delineamento fatorial completo $2^{(2)}$. Composto de dois fatores, dois níveis e três pontos centrais, os quatro experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 11 experimentos. Foi avaliado o efeito do tamanho da partícula do suporte e do pH inicial do substrato, como mostrado na TABELAS 36 e 37. A umidade inicial foi estabelecida de acordo com a capacidade máxima de absorção do suporte a 121ºC: 93% para partículas com tamanho médio de 1,0 mm; 92% para partículas com tamanho médio de 1,7 mm e 91% para partículas com tamanho médio de 2,4 mm. O tempo de fermentação foi nove dias e a taxa de inóculo foi estabelecida em 3%, em relação ao volume do substrato, correspondendo a 2,3 x 10^7UFC.g^{-1} de massa seca.

TABELA 36 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA 2.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

	Nível		
Variáveis	**-1**	**0**	**+1**
Tamanho médio da partícula (mm)	1,0	1,7	2,4
pH inicial do substrato	7,2	7,6	8,0

TABELA 37 - DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^2 - 2.ª ETAPA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	**Replicata**	**Tamanho médio da partícula**	**pH inicial do substrato**
1	1 e 2	-1	-1
2	1 e 2	-1	+1
3	1 e 2	+1	-1
4	1 e 2	+1	+1
5 (pto.central)	1 , 2 e 3	0	0

3.4.2.7 Otimização: pH x umidade inicial

Esta etapa objetivou determinar o melhor pH inicial (antes da esterilização) e a melhor taxa de umidade do substrato. Foi utilizado um delineamento fatorial completo 3^2 (Box-Behnken Design), composto de dois fatores e três níveis, totalizando 9 experimentos, que foram executados em duplicata (TABELAS 38 e 39). O tempo de fermentação foi nove dias, a taxa de inóculo de 3% em relação ao volume do substrato, correspondendo a 2,5 x 10^7 UFC.g^{-1} de massa seca e o tamanho médio da partícula do suporte foi fixado em 1,0 mm.

TABELA 38 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

	Nível		
Variáveis	**-1**	**0**	**+1**
pH inicial do substrato	7,0	7,5	8,0
Umidade (%)	87	90	93

TABELA 39 - BOX-BEHNKEN DESING 3^2 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	Replicata	pH inicial do substrato	Umidade
1	1 e 2	-1	+1
2	1 e 2	-1	0
3	1 e 2	-1	-1
4	1 e 2	0	+1
5	1 e 2	0	0
6	1 e 2	0	-1
7	1 e 2	+1	+1
8	1 e 2	+1	0
9	1 e 2	+1	-1

3.4.2.7 Efeito das fontes de cálcio e do diluente do substrato

Para avaliar a interferência do efeito do tamponamento do substrato e a interferência de diferentes fontes de cálcio na produção de esporos, foram realizados seis ensaios, em duplicata, como demonstrado na TABELA 40.

TABELA 40 - DELINEAMENTO DOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA FONTE DE CÁLCIO E DO DILUENTE DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	Replicata	Fonte de cálcio	Diluente do substrato
1	1 e 2	Cloreto de cálcio	Água destilada
2	1 e 2	Carbonato de cálcio	Água destilada
3	1 e 2	Fosfato de cálcio	Água destilada
4	1 e 2	Cloreto de cálcio	Tampão fosfato
5	1 e 2	Carbonato de cálcio	Tampão fosfato
6	1 e 2	Fosfato de cálcio	Tampão fosfato

O tempo de fermentação foi nove dias, a taxa de inóculo de 3% em relação ao volume do substrato, correspondendo a 6,4 x 10^7 UFC.g^{-1} de massa seca , o tamanho médio da partícula do suporte 1,0 mm, a umidade inicial 93% e o pH inicial do substrato 8,0.

3.4.2.8 Preparo da suspensão de esporos

Foram adicionados ao fermentado 100 mL de acetato de cálcio 0,02M com Tween 80 (0,01%) pH 9,7 e pérolas de vidro estéreis. A mistura foi agitada em agitador orbital tipo shaker por uma hora, a 250 rpm, a 4ºC. A suspensão foi filtrada em funil com gaze e algodão. Os esporos foram lavados por três vezes em centrífuga refrigerada, a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos a 4ºC. Suspensos em 50 mL de

uma solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7. A suspensão foi submetida ao aquecimento a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes, armazenada a 5ºC ± 3ºC.

3.4.2.9 Quantificação

A quantificação foi realizada por diluição seriada decimal e inoculação, em duplicata, na superfície do ágar de soja tripticaseína. Na inoculação foram utilizados 50 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a 36ºC ± 2ºC por 18 horas a 24 horas. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias e expresso em UFC.mL $^{-1}$. O resultado, em UFC.mL^{-1} foi multiplicado pelo volume de recuperação (50 mL) e dividido pelo peso do suporte em matéria seca (5 g) fornecendo a quantificação em UFC.g^{-1} de massa seca.

3.4.2.10 Preparo do indicador biológico

Foram inoculados, em fitas estéreis de papel de filtro qualitativo de 48,0 g/m^2 medindo 2,5 cm x 1,0 cm, 10 uL da suspensão de esporos produzida pela FES otimizada (ensaio 1 do item 3.4.2.7). As fitas foram previamente tratadas com solução de acetato de cálcio 0,02M pH 11,0 (ajustado com hidróxido de cálcio), secadas por duas horas em fluxo laminar e 18 horas a 24 horas em estufa a 45ºC. Após a secagem foram acondicionadas assepticamente em frascos de 7 mL (tipo penicilina), fechados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio. Mantidos a 5ºC ± 3ºC. O meio de recuperação foi preparado com caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bi-hidratado, 0,018%; amido solúvel, 0,1% e azul de bromotimol, 0,0015%; pH 6,8 ±1 ,0. Envasados assepticamente no volume de 3 mL em frasco-ampola de vidro neutro, com capacidade para 7 mL. Autoclavado a 121ºC por 15 minutos, armazenados a 5ºC ± 3ºC.

3.4.2.11 Resistência térmica

A resistência térmica foi executada em estufa com circulação de ar, pré-aquecida por no mínimo 30 minutos. Foram expostas 10 unidades do indicador, à temperatura de

160ºC ± 2ºC, a diferentes tempos de exposição: 35, 30, 25, 20, 15 e 10 minutos. Os indicadores testados foram cultivados nos meio de recuperação, incubados a 36ºC ± 2 ºC, por até sete dias. O valor de *D* (tempo de redução decimal) e U_{sk} (tempo médio de morte) foram calculados pelo método da fração negativa e pelo método de Spearman-Kaber. O teste foi realizado em duplicata.

3.4.3 Resultados e discussões

Na primeira etapa da otimização foi avaliado o efeito do tamanho da partícula do suporte, taxa do inóculo, umidade inicial do sistema, tempo de fermentação e pH inicial do substrato. Os resultados, descritos nas TABELAS 41 e 42 sugeriram que apenas o tamanho da partícula (p= 0,0237), a umidade (p= 0,0196), e o pH inicial do substrato (p= 0,0235) apresentaram efeito na produção de esporos. O efeito positivo da umidade já era esperado, devido à característica dos *Bacillus sp.,* cuja atividade de água ideal para o seu crescimento é de 0,95 .

TABELA 41 - RESULTADOS DA 1.ª AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	**Repli-cata**	**Tamanho médio da partícula** (mm)	**Umidade** (%)	**Tempo de incubação** (dias)	**pH inicial do subst.**	**Taxa de Inoculo** (%)	**Esporos** (UFC.g $^{-1}$ materia seca)
pto. central	1	1,1	87,0	12	7,5	6,0	$3,7 \times 10^{7}$
1	1	1,6	91,0	15	7,8	9,0	$4,9 \times 10^{9}$
2	1	1,6	91,0	9	7,8	3,0	$5,4 \times 10^{8}$
3	1	1,6	83,0	15	7,2	9,0	$2,5 \times 10^{6}$
4	1	1,6	83,0	9	7,2	3,0	$8,2 \times 10^{5}$
5	1	0,6	91,0	15	7,2	3,0	$1,2 \times 10^{7}$
6	1	0,6	91,0	9	7,2	9,0	$3,8 \times 10^{7}$
7	1	0,6	83,0	15	7,8	3,0	$7,9 \times 10^{5}$
8	1	0,6	83,0	9	7,8	9,0	$3,3 \times 10^{6}$
9 (pto. central)	2	1,1	87,0	12	7,5	6,0	$1,1 \times 10^{7}$
1	2	1,6	91,0	15	7,8	9,0	$1,6 \times 10^{9}$
2	2	1,6	91,0	9	7,8	3,0	$1,7 \times 10^{9}$
3	2	1,6	83,0	15	7,2	9,0	$4,2 \times 10^{6}$
4	2	1,6	83,0	9	7,2	3,0	$6,0 \times 10^{5}$
5	2	0,6	91,0	15	7,2	3,0	$8,3 \times 10^{7}$
6	2	0,6	91,0	9	7,2	9,0	$4,0 \times 10^{7}$
7	2	0,6	83,0	15	7,8	3,0	$4,1 \times 10^{6}$
8	2	0,6	83,0	9	7,8	9,0	$7,5 \times 10^{6}$
9 (pto. central)	3	1,1	87,0	12	7,6	6,0	$6,3 \times 10^{7}$

O efeito não significativo da taxa de inóculo na produção de esporos não era esperado. De acordo com Mitchell *et al*. (2000), o tamanho do inóculo tem uma grande importância na FES, para microrganismos de crescimento rápido quanto maior o inóculo mais rápido será o consumo do substrato, seguindo da redução significativa dos nutrientes disponíveis, condições na qual a esporulação tem início. Outra hipótese é que a variação entre os valores testados da taxa de inóculo não seja significativa, porém taxas de inoculação superiores a 9% poderiam apresentar efeito negativo devido a maior adição dos nutrientes do meio do inóculo ao meio de esporulação.Objetivando a redução dos custos de produção, o valor do inóculo foi fixado em 3% ,correspondendo a uma concentração de 10^7 CFU. g^{-1} de massa seca.

TABELA 42 – ESTIMATIVA DOS EFEITOS DE DIFERENTES VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

	Efeito (UFC. g^{-1} massa seca)	**Erro Padrão**	***T (13)***	***p***	**Lim.conf. -90%**	**Lim.conf +90%**
Média	$4,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	2,4848	**0,0274**	$1,4 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$
Tamanho da partícula	$1,1 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	2,5615	**0,0237**	$3,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$
Umidade	$1,1 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	2,66028	**0,0196**	$3,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$
Tempo de fermentação	$5,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	1,2797	0,2230	$-2,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$
pH inicial do substrato	$1,1 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	2,5661	**0,0235**	$3,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$
Inóculo (%)	$5,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	1,2731	0,2253	$-2,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$

R^2=0,65

O fato do tempo de incubação não ter apresentado efeito nos resultados da produção de esporos, pode permitir a sua redução de 14 dias para nove dias, agregando economia de tempo energia.

O diagrama de Pareto (FIGURA 56) demonstra graficamente os efeitos calculados. A tendência positiva destes fatores podem ser observadas através pelo Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade (*Profiles for Predicted Values and Desirability)*, FIGURA 57, onde dois grupos de gráficos são apresentados: nos localizados acima se apresentam os valores desejáveis para os fatores de interesse considerando o limite de confiança respectivo ao valor ótimo. No segundo grupo, apresentam-se as tendências reveladas pelos fatores onde a linha azul tracejada representa o valor ótimo predito.

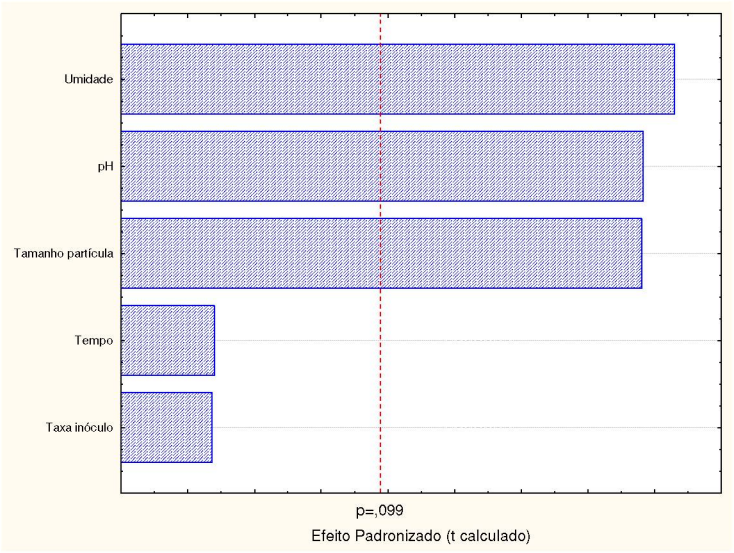


FIGURA 56 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

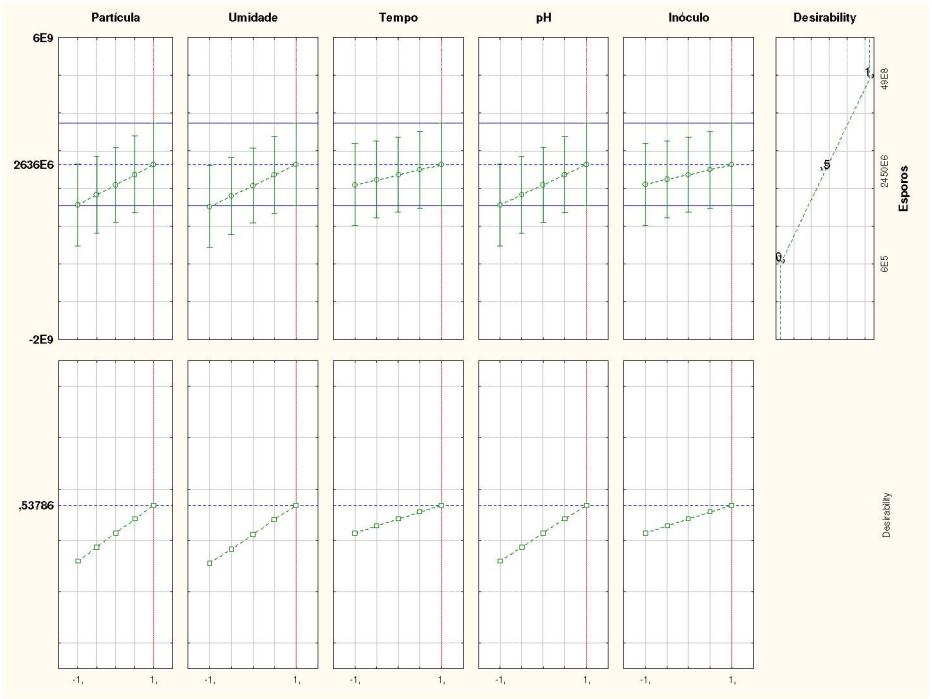


FIGURA 57 - PERFIS DE DESEJABILIDADE EM TERMOS DAS VARIÁVEIS CODIFICADAS NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* EM VALORES ÓTIMOS

Quanto menor a partícula, maior a superfície disponível para o crescimento microbiano e maior é o grau de absorção de volume do substrato. Porém, partículas muito pequenas permitem a compactação e, conseqüente baixo crescimento microbiano. Ao contrário, partículas grandes fornecem uma melhor aeração, porém menor absorção do substrato e menor superfície de crescimento, o que justifica a

busca experimental do tamanho ideal de partícula para cada processo. O indicativo do efeito positivo do tamanho da partícula neste processo nos leva à necessidade de avaliar o efeito de partículas de tamanho médio superior aos já estudados.

De acordo com Doelle (1985), o pH é um dos fatores que mais influencia o desenvolvimento microbiano na FES. Diversos pesquisadores afirmam que o pH ideal para que ocorra a esporulação, com a formação de esporos mais resistentes à temperatura, está na faixa de seis a oito, porém na formulação do substrato devemos levar em consideração a acidificação que ocorre durante a esterilização do bagaço de cana. A produção e a resistência térmica decrescem em presença de ácidos devido à remoção parcial do cálcio do esporo (PENNA *et al.*, 1996; KUJALA; KAUPPINEN, 1982). Um segundo delineamento fatorial foi executado para verificar os efeitos do pH inicial do substrato e do tamanho da partícula no processo estudado. Os resultados obtidos estão demonstrados nas TABELAS 43 e 44.

TABELA 43 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E DO pH NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	**Replicata**	**Tamanho médio da partícula** (mm)	**pH inicial do substrato**	**ESPOROS** (UFC.g $^{-1}$ matéria seca)
Pto.central	1	1,7	7,6	1,2 x 10^{8}
1	1	1,0	7,2	9,0 x 10^{7}
2	1	1,0	8,0	1,4 x 10^{9}
3	1	2,4	7,2	2,4 x 10^{8}
4	1	2,4	8,0	2,1 x 10^{9}
5 (pto.central)	1	1,7	7,6	8,8 x 10^{7}
1	2	1,0	7,2	8,7 x 10^{7}
2	2	1,0	8,0	1,1 x 10^{9}
3	2	2,4	7,2	1,6 x 10^{8}
4	2	2,4	8,0	1,1 x 10^{9}
5 (pto.central)	2	1,7	7,6	1,8 x 10^{8}

TABELA 44 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS DO TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E DO pH NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

	Efeito (UFC. g^{-1} massa seca)	**Erro Padrão**	***t (8)***	***p***	**Lim.conf-90%**	**Lim.conf +90%**
Média	6,8 x 10^{8}	1,3 x 10^{7}	4,6135	0,0018	3,6 x 10^{7}	8,5 x 10^{7}
Tamanho médio da partícula	1,2 x 10^{7}	1,5 x 10^{7}	0,7492	0,4752	-1,7 x 10^{7}	4,0 x 10^{7}
pH	6,4 x 10^{7}	1,5 x 10^{7}	4,1582	0,0032	3,5 x 10^{7}	9,3 x 10^{7}

R^2=0,69

Os resultados obtidos, expressos no diagrama de Pareto (FIGURA 58), demonstram que o pH apresenta um efeito estatisticamente significativo (p= 0,0032) e também a ausência de efeito do tamanho da partícula (p= 0,4752), na produção dos esporos.

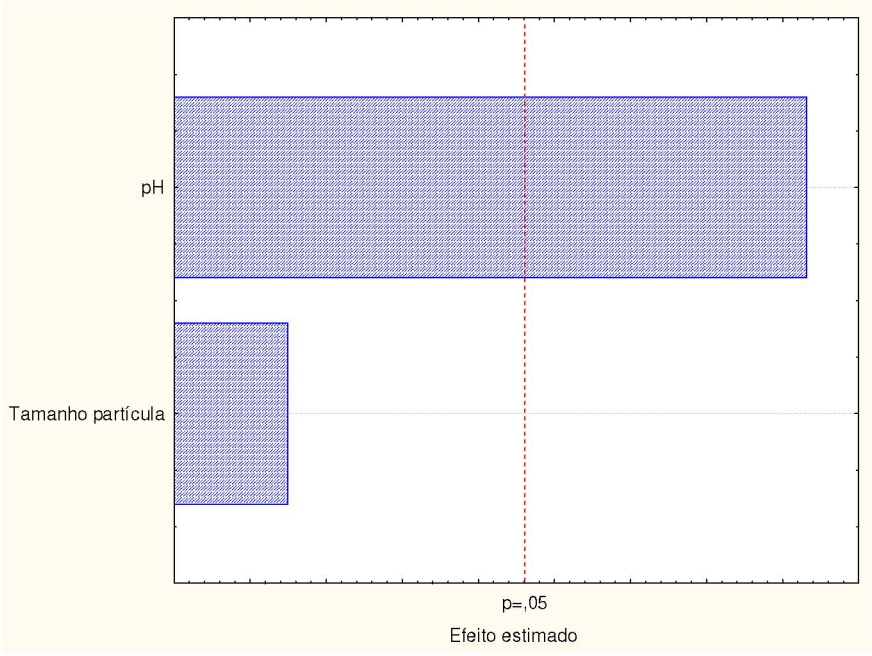


FIGURA 58 - DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS DO TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E DO pH NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

A tendência positiva destes fatores pode ser observada através pelo Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade (*Profiles for Predicted Values and Desirability)*, FIGURA 59.

Com base nestes resultados, e no resultado da primeira etapa da otimização, estabeleceu-se 1,0 mm como tamanho médio ideal da partícula do suporte, maior partícula com capacidade de absorver até 93% do substrato nas condições do ensaio.

Foram realizados novos ensaios, objetivando confirmar o efeito do pH e da umidade (de acordo com a capacidade de absorção da partícula do suporte, cujo tamanho foi definido no ensaio anterior). A análise dos efeitos (TABELAS 45 e 46) indicou ausência de efeito da variação do pH na faixa estudada.

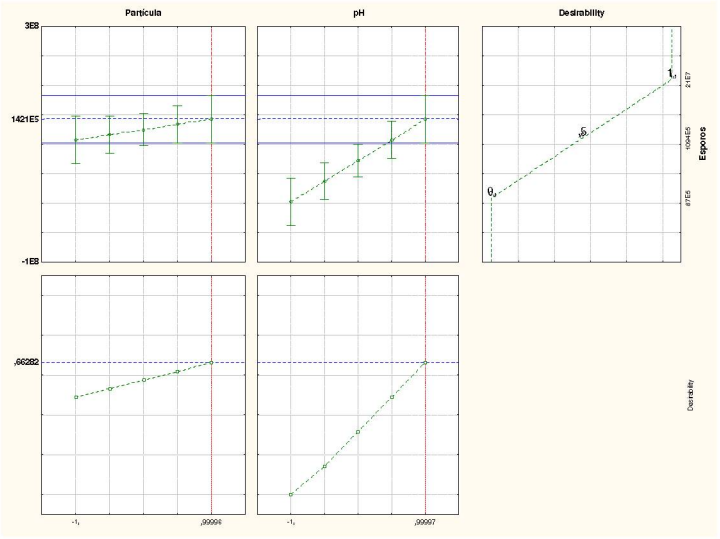


FIGURA 59 - PERFIS DE DESEJABILIDADE EM TERMOS DAS VARIÁVEIS CODIFICADAS, TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E pH, NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* EM VALORES ÓTIMOS

TABELA 45 - RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DO pH E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	**Replicata**	**pH inicial do substrato**	**Umidade** (%)	**ESPOROS** (UFC.g $^{-1}$ matéria seca)
1	1	7,0	87,0	8,1 x 10^{6}
2	1	7,0	90,0	5,2 x 10^{7}
3	1	7,0	93,0	1,1 x 10^{9}
4	1	7,5	87,0	2,0 x 10^{7}
5	1	7,5	90,0	5,8 x 10^{7}
6	1	7,5	93,0	5,1 x 10^{9}
7	1	8,0	87,0	1,2 x 10^{6}
8	1	8,0	90,0	3,4 x 10^{8}
9	1	8,0	93,0	6,3 x 10^{9}
1	2	7,0	87,0	5,4 x 10^{6}
2	2	7,0	90,0	2,5 x 10^{8}
3	2	7,0	93,0	2,0 x 10^{9}
4	2	7,5	87,0	1,8 x 10^{7}
5	2	7,5	90,0	2,1 x 10^{8}
6	2	7,5	93,0	2,5 x 10^{10}
7	2	8,0	87,0	2,6 x 10^{7}
8	2	8,0	90,0	8,5 x 10^{7}
9	2	8,0	93,0	4,6 x 10^{9}

Através dos resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão para a resposta do processo, calcular os valores da ANOVA (TABELA 46) , construir as superfícies de resposta (FIGURA 60) e estabelecer o modelo matemático com os valores codificados:

$Y_{\text{Esporos (UFC.g-1)}}$ = 2,5 x 10^{9} + 7,3 x 10^{9} %de umidade + 5,8 x 10^{9} pH^{2} x %umidade

TABELA 46 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O pH E UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Fonte de Variação	**Soma dos Quadrados**	**Graus de Liberdade**	**Quadrado Médio**	***F calc***	**p-valor**
Regressão	$4,0 \times 10^{20}$	8	$5,0 \times 10^{19}$		
Resíduos	$2,0 \times 10^{20}$	9	$2,2 \times 10^{19}$	2,27	0,161
Total	$6,0 \times 10^{20}$	17			

R^2=0,68 $F_{8;9;0,1}$= 2,56

A FIGURA 60 demonstra que a umidade tem efeito positivo, porém esta é limitada à capacidade máxima de absorção do suporte, e que não foi observado efeito significativo na variação de pH entre sete a oito. O pH foi fixado em oito para evitar a excessiva acidificação do sistema suporte/ substrato após a autoclavação, o que pode induzir a uma redução da resistência térmica dos esporos formados.

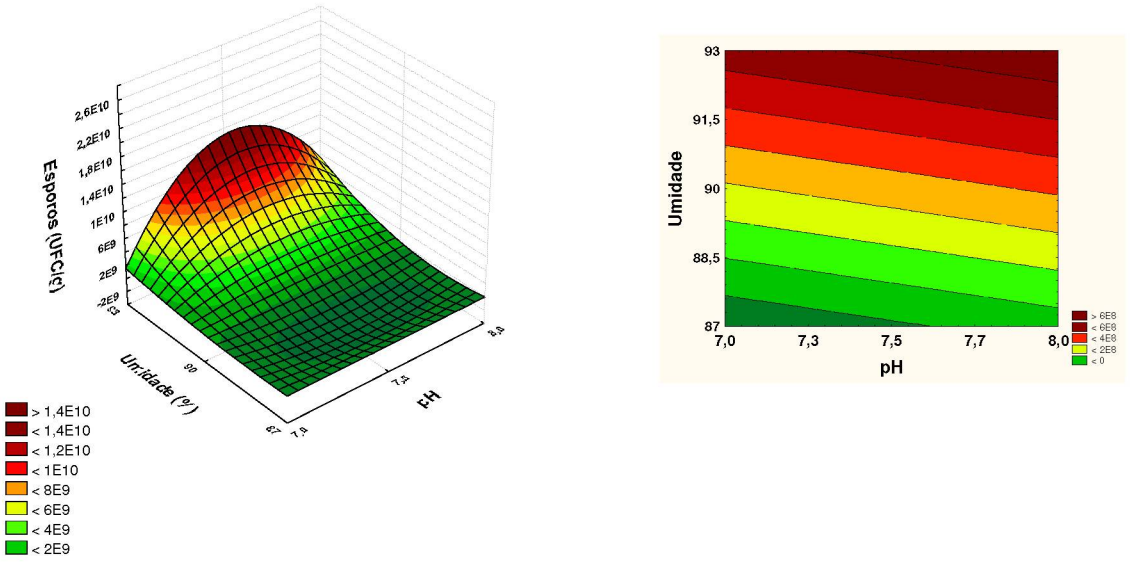


FIGURA 60 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTORNO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS EM FUNÇÃO DA UMIDADE E DO pH

A validação experimental dos resultados foi realizada através da repetição do ensaio em quintuplicata, nas condições ótimas estabelecidas (tempo de fermentação, nove dias; taxa de inóculo de 3%; tamanho médio da partícula do suporte 1,0 mm; umidade inicial 93% e pH inicial do substrato 8,0), apresentando respectivamente os seguintes resultados: 1,2 x 10^{10}; 4,7x 10^{10} ; 1,0 x 10^{10} ; 8,9 x 10^{9} e 1,7 x 10^{10}UFC. g^{-1} de matéria seca. A média dos resultados foi 1,9 x 10^{10} .

Quanto ao efeito das fontes de cálcio e do diluente do substrato, sabe-se que o cálcio é o maior componente dos esporos bacterianos, sendo freqüentemente relacionado à resistência térmica (MURRELL; WARTH, 1965). A composição mineral dos esporos pode ser modificada de acordo com as características dos minerais disponíveis do meio de esporulação (SLEPECKY; FOSTER, 1959). Não foram encontrados estudos sobre a influência das fontes de cálcio na produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* por FES. As fontes de cálcio também podem alterar o pH durante o crescimento microbiano e esporulação, conseqüentemente alterando sua produtividade. Os resultados da interferência da fonte de cálcio na produção de esporos são apresentados na TABELA 47.

O efeito do tamponamento também foi estudado objetivando a redução de custos do processo. Os resultados foram submetidos à análise estatística através da ANOVA (TABELA 48). O teste F apresentou um valor de p >0,05, indicando que não há diferença estatisticamente significativa com um nível de confiança de 95%.

TABELA 47- RESULTADOS DOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DA FONTE DE CÁLCIO E DO DILUENTE DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	Fonte de cálcio	Diluente do substrato	FES 1 Esporos (UFC.g $^{-1}$ matéria seca)	FES 2 Esporos (UFC.g $^{-1}$ matéria seca)
1	Cloreto de cálcio	Água destilada	1,1 x 10^{10}	1,2 x 10^{10}
2	Carbonato de cálcio	Água destilada	2,0 x 10^{9}	3,4 x 10^{9}
3	Fosfato de cálcio	Água destilada	1,6 x 10^{10}	4,4 x 10^{9}
4	Cloreto de cálcio	Tampão fosfato	1,8 x 10^{9}	3,2 x 10^{9}
5	Carbonato de cálcio	Tampão fosfato	4,4 x 10^{9}	2,1x 10^{9}
6	Fosfato de cálcio	Tampão fosfato	2,0 x 10^{9}	1,5 x 10^{9}

TABELA 48 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A FONTE DE CÁLCIO E DO DILUENTE

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	p
Regressão	1,9 x 10^{20}	5	3,8 x 10^{19}	3,11	0,1001
Resíduo	7,3 x 10^{19}	6	1,2 x 10^{19}		
Total	2,6 x 10^{20}	11			

O gráfico da menor diferença significativa da média de Fischer (FIGURA 61) demonstra também que todos os meios estudados apresentaram resultados estatisticamente semelhantes na produção de esporos. O meio 1 (cloreto de cálcio/

água destilada) e o meio 3 (fosfato de cálcio/ água destilada) foram os que forneceram as maiores concentrações, respectivamente: 1,2 x 10^{10} e 1,0 x 10^{10} UFC. g^{-1} de matéria seca.

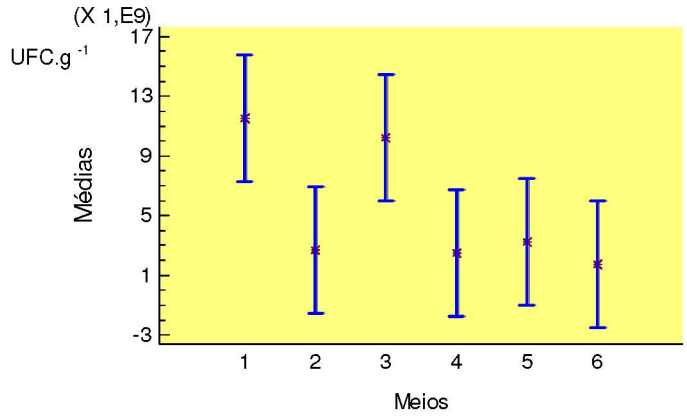


FIGURA 61 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* COM: (1) CLORETO DE CÁLCIO/ ÁGUA DEST.; (2) CARBONATO DE CÁLCIO/ ÁGUA DEST.; (3) FOSFATO DE CÁLCIO/ ÁGUA DEST.; (4) CLORETO DE CÁLCIO/ TAMPÃO; (5) CARBONATO DE CÁLCIO/ TAMPÃO; (6) FOSFATO DE CÁLCIO/ TAMPÃO

Estes resultados demonstraram um aumento da produção de esporos em três log (1000 vezes) quando comparados aos resultados fornecidos pela esporulação em ágar (9,6 x 10^{7} UFC. g^{-1} de ágar) e um log (10 vezes) quando comparados com o primeiro ensaio da FES (3,0 x 10^{9} UFC. g^{-1} de matéria seca)

A resistência térmica é o parâmetro de avaliação da qualidade do esporo. Para avaliar a termorresistência dos esporos produzidos através da FES otimizada, um lote de indicador biológico foi preparado com a suspensão de esporos produzida pelo processo otimizado e outro lote foi preparado com uma suspensão de esporos produzida em ágar de esporulação (meio de referência). Os valores da medida da resistência térmica ao calor seco (160ºC) obtidos foram: $D_{160ºC}$= 5,2 ± 0,2 min e 5,5 ± 0,3 min, respectivamente (FIGURA 62). Ambos estão acima dos valores de *D* encontrados nos indicadores biológicos comercializados, cujo *D* varia entre 1,0 min a 3,0 min (USP 29, 2006).

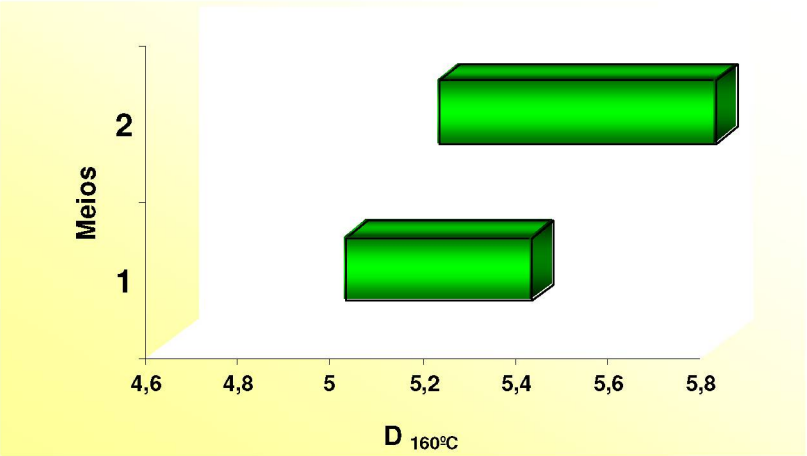


FIGURA 62 - RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PREPARADOS COM DIFERENTES MÉTODOS: (1) FES; (2) ESPORULAÇÃO EM ÁGAR

Os resultados da resistência térmica indicaram que a otimização do processo de fermentação em estado sólido não afetou a qualidade dos esporos produzidos, quanto à resistência ao calor seco a 160ºC, o que permite utilização da técnica de FES para a produção de esporos para uso na fabricação de indicador biológico para esterilização pelo calor seco.

3.5 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DO INÓCULO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS POR FES

3.5.1 Introdução

A primeira etapa do processo de produção de esporos é o preparo da cultura iniciadora, ou inóculo (PARANÁ, 2005). O meio de cultivo para o seu preparo deve atender à demanda nutricional do microrganismo e aos objetivos do processo (produção de biomassa), além de possuir baixo custo e fácil obtenção deve também promover uma alta produtividade (JUNGE *et al.*,2000;MORAES,2001; MONTEIRO *et al.*,2005).

Resíduos e subprodutos agroindustriais são utilizados comumente como matéria prima nos processos de fermentação. Trabalhos realizados por Cesare-Vidaurre *et al.*(1997), Fadele e Sabour (2002) e Full *et al.* (2006) apresentaram resultados positivos na produção de microrganismos do gênero *Bacillus*, utilizando como substrato o melaço de cana, o melaço de soja e a calda de milho. A capacidade de adaptação do *Bacillus atrophaeus* e do uso de muitos tipos de nutrientes como fonte de energia foi relatada por Neves *et al.*(2006).

A primeira parte deste experimento objetivou a avaliação de diferentes formulações de meios de cultivo, usando resíduos e subprodutos agroindustriais para substituir, com menor custo, o meio sintético na produção do inóculo para a esporulação do *Bacillus atrophaeus* na produção de indicador biológico para calor seco. Através do planejamento experimental a composição do meio eleito foi otimizada para ampliar a produção da biomassa.

A interferência da composição do meio de esporulação na resistência térmica dos esporos formados já foi demonstrada (HODGES *et al.,*1980*;* HOXEY,*et al.*,1985), no entanto existem poucos estudos relatando a influência das características do meio de cultivo do inóculo neste processo. Olson e Nottingham (1980) demonstraram que a resistência térmica dos esporos também está relacionada com a qualidade das células vegetativas de origem, esporos formados a partir de células provenientes da fase estacionária são mais sensíveis que os provenientes da fase exponencial de crescimento, devido a sua maior exposição aos metabólitos tóxicos.

A segunda parte deste experimento avaliou a resistência térmica dos esporos formados com a utilização do meio para inoculo já estabelecido e otimizado.

3.5.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 63.

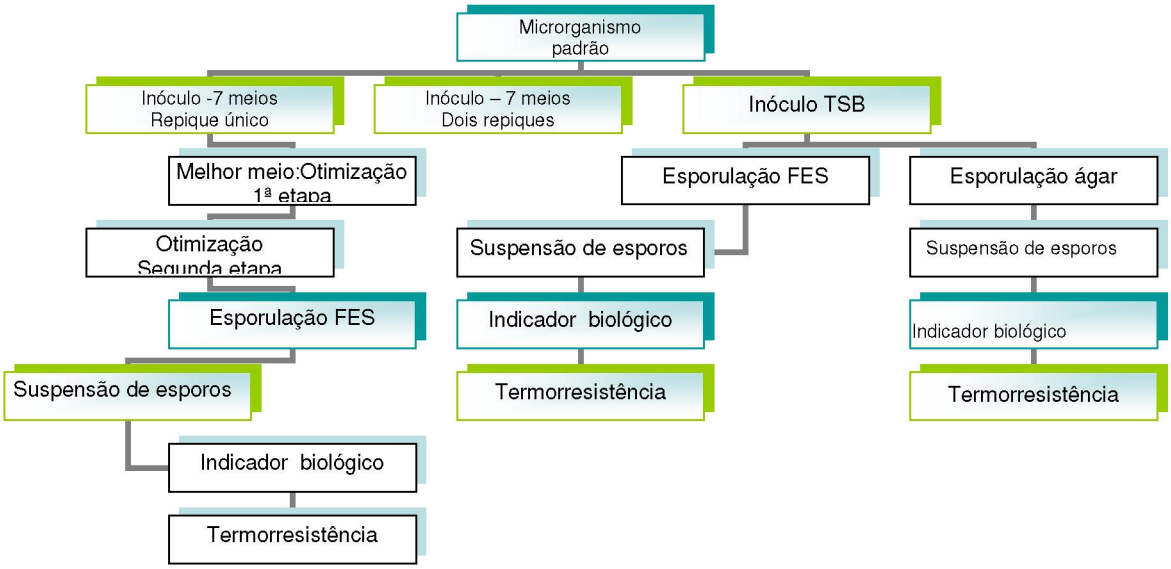


FIGURA 63 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA O DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO INÓCULO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS PRODUZIDOS

FONTE: O AUTOR

3.5.2.1 Microrganismo

Cepa padrão do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, lote 1403349, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –INCQS.

3.5.2.2 Meios de cultivo

As diferentes composições do meio e a adição de suplementos foram determinadas com base nas concentrações estimadas de nitrogênio e de carbono de cada substrato (TABELA 49).

TABELA 49 - CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES DOS COMPONENTES E SUPLEMENTOS DOS MEIOS DE CULTURA (SUBSTRATOS)

Componentes	**Carboidratos (%)**	**Nitrogênio (%)**
Melaço de soja ~75 º Brix [1]	50,8	0,8
Vinhaça de Soja ~11º Brix [1]	8,3	0,2
Vinhaça de Cana ~2º Brix [2]	0,62	0,04
Caldo de Soja Tripticaseína – TSB (preparado) [3]	0,33	0,25
Extrato de Carne (fonte de N, C, vitaminas e amino-ácidos) [3]	0,2	11,2
Triptona [3] (fonte de N e triptofano)	7,7	13,0
Extrato de Levedura (fonte de N,C, aminoácidos e vitaminas do complexo B) [3]	17,5	10,9
Peptona [3]	15,4	6,29

FONTES: (1) TABELA 26; (2) GRANATO(2003); (3) Bionutrient Technical Manual-BD (2004)

O crescimento do *Bacillus atrophaeus* foi testado em diferentes formulações com vinhaça de cana, melaço e vinhaça de soja, conforme demonstrado na TABELA 50. A vinhaça de cana foi clarificada por centrifugação (2000 rpm - 30 minutos) antes da diluição. O caldo de soja tripticaseína ou TSB (*Tripty Soy Broth*) foi utilizado como meio de referência. O melaço e a vinhaça de soja foram provenientes da empresa IMCOPA, de Araucária-PR e a vinhaça de cana foi fornecida pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR.

TABELA 50 - FORMULAÇÕES TESTADAS PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO DO *Bacillus atrophaeus*

Meios/ Formulas	**(1) Melaço de soja e peptona**	**(2) Vinhaça de soja e extrato de carne**	**(3) Vinhaça de cana e extrato de levedura**	**(4) Melaço de soja 1/50**	**(5) Melaço de soja 1/60**	**(6) Vinhaça de cana**	**(7) Vinhaça de soja**
Melaço de Soja	1,7%	-	-	2,0%	1,7%	-	-
Vinhaça de Soja	-	6,7%	-	-	-	-	6,7%
Vinhaça de Cana	-	-	97,6%	-	-	10,0%	-
Extrato de Carne		2,3%	-	-	-	-	-
Peptona de Caseína	1,8%	-	-	-	-	-	-
Extrato de Levedura	-	-	2,4%	-	-	-	-

Os meios foram preparados com água destilada e filtrados por algodão antes do uso, o pH foi ajustado para 7,2 ± 0, 1 com NaOH 0,1N, e autoclavados a 121ºC por 15 minutos. Mantidos a 5ºC ± 3ºC até a inoculação.

3.5.2.3 Preparo do inóculo

3.5.2.3.1 Primeiro ensaio (dois repiques)

a) Recuperação: 100 µL da suspensão de esporos(L1/06 CPPI) foi inoculada em três tubos contendo 30 mL de cada meio testado. O número inicial de microrganismo no cultivo foi calculado em como 3,3 x 10^5 UFC.mL^{-1}. Os tubos foram incubados por 24 horas a 36ºC ± 2 ºC.
b) Promoção da fase logarítmica de crescimento: 1,0 mL da cultura de 24 horas (células vegetativas) de cada meio foi inoculada em três tubos contendo 30mL de caldo de soja tripticaseína. Estes tubos foram incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC. O crescimento foi quantificado através da contagem de microrganismos viáveis.

3.5.2.3.2 Segundo ensaio (repique único)

Foram inoculados 100 µL da suspensão de esporos, L1/06 CPPI, em três tubos contendo 30 mL de cada meio testado. O número inicial de microrganismo no cultivo foi calculado em como 3,3 x 10^5 UFC.mL^{-1}. Os tubos foram incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC.Os cultivos foram realizados em duplicata e os resultados apresentados referem-se à média dos resultados obtidos

3.5.2.3.3 Meio de Referência

Foram inoculados 100 µL da suspensão de esporos, L1/06 CPPI, em três tubos contendo 30mL de caldo de soja tripticaseína(TSB). O número inicial de microrganismo no cultivo foi calculado em como 3,3 x 10^5 UFC.mL^{-1} . Os tubos foram incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC.

3.5.2.4 Otimização

Para avaliar a Influência da concentração do melaço de soja e da peptona, foi utilizado um delineamento fatorial $2^{(2-0)}$. Composto de dois fatores, dois níveis e um ponto central, em duplicata, totalizando 10 experimentos (TABELAS 51 e 52). A metodologia de cultivo está citada no item 3.5.2.3.2

TABELA 51 - VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO

	Nível		
Variáveis	**-1**	**0**	**+1**
Concentração do melaço de soja (v /v-%)	1,0	2,5	4,0
Concentração da peptona de caseína (p /v -%)	1,0	2,5	4,0

TABELA 52 - DELINEAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL $2^{(2-0)}$ - OTIMIZAÇÃO DO INÓCULO

Experimento	**Replicatas**	**Melaço de soja**	**Peptona de caseína**
1	1 e 2	+1	+1
2	1 e 2	+1	-1
3	1 e 2	-1	+1
4	1 e 2	-1	-1
5 (ponto central)	1 e 2	0	0

3.5.2.5 Influência da concentração de peptona

Para avaliar a influência do aumento da concentração da peptona, foi utilizado um delineamento fatorial $2^{(2)}$, composto de dois fatores e dois níveis, em duplicata, totalizando oito experimentos (TABELAS 53 e 54). A metodologia de cultivo está citada no item 3.5.2.3.2.

TABELA 53 – VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO FATORIAL -INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO

Variáveis	**Nível**	
	-1	**1**
Concentração do melaço de soja *(v /v-%)*	1,0	4,0
Concentração da peptona de caseína (*p /v -%*)	4,0	6,0

TABELA 54 – DELINEAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL 2^2 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO PARA PRODUÇÃO DO INÓCULO

Experimento	Replicatas	Melaço de soja	Peptona de caseína
1	1 e 2	-1	-1
2	1 e 2	-1	+1
3	1 e 2	+1	-1
4	1 e 2	+1	+1

3.5.2.6 Quantificação do crescimento

Realizada pela contagem de microrganismos viáveis na superfície de placas com ágar de soja tripticaseína. Após diluição seriada decimal em água destilada estéril, 50 µl de cada diluição foram inoculados, em duplicata. As placas foram incubadas a 36ºC ± 2 ºC, por 18 horas a 24 horas. A média do resultado das contagens de colônias foi expressa em $UFC.mL^{-1}$.

3.5.2.7 Esporulação

Nos experimentos de FES utilizou-se 5,0 g do bagaço de cana moído, lavado e seco, com tamanho médio da partícula de 1,0 mm. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade. O substrato adicionado foi melaço de soja 2,0%, com sais estimuladores da esporulação (K_2HPO_4. H_2O, 0,005%; $MnSO_4$. H_2O, 0,004%; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,004%; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,005%), diluídos em água destilada. O pH foi corrigido para oito. O substrato foi adicionado ao suporte seco antes da autoclavação (121 ºC por 15 minutos). O volume de inóculo foi de 3% em relação ao volume do substrato. O cultivo foi incubado em estufa, a 36ºC ± 2ºC por nove dias.

Na esporulação em Agar, utilizou-se garrafa de leite, com tampa de baquelite, contendo 80 mL do meio de esporulação: extrato de levedura, 0,8% ; caldo nutriente, 0,4%; $MnSO_4.4H_2O$, 0,005%; $CaCl_2.6H_2O$, 0,005%; ágar, 3,0%. O pH foi ajustado para 7,0 ± 0,2 com NaOH 0,1N. O meio foi autoclavado a 121ºC por 15 minutos. A temperatura de incubação foi 36ºC ± 3ºC, e o tempo de incubação foi 14 dias.

3.5.2.8 Preparo da suspensão de esporos

Foram adicionados ao fermentado 100 mL de acetato de cálcio 0,02M com Tween 80 (0,01%), pH 9,7 e pérolas de vidro estéreis. A mistura foi agitada em agitador orbital tipo shaker a 4,0 ºC, por uma hora, a 250 rpm. A suspensão foi filtrada em funil com gaze e algodão. Os esporos foram lavados por três vezes em centrífuga refrigerada, a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos a 4ºC, recuperados em 50 mL de uma solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7. A suspensão de esporos foi submetida ao aquecimento a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes. Armazenada a 5ºC ± 3º C.

3.5.2.9 Preparo do indicador biológico

O volume de 10 µL da suspensão de esporos foi inoculado em fitas estéreis de papel de filtro, previamente tratado com solução de acetato de cálcio 0,02M pH 11,0 (ajustado com hidróxido de cálcio), secadas por 2 horas em fluxo laminar e 18 horas a 24 horas em estufa a 45ºC. Após a secagem foram acondicionadas assepticamente em frascos de 7 mL (tipo penicilina) , fechados com rolha de borracha e lacrados com lacre de alumínio. Mantidos a 5ºC ± 3ºC. O meio de recuperação foi preparado com caldo de soja tripticaseína, 3,0%; cloreto de cálcio bi-hidratado, 0,018%; amido solúvel, 0,1% e azul de bromotimol, 0,0015%. pH 6,8 ± 1,0. Envasados assepticamente no volume de 3 mL, em frasco-ampola de vidro neutro, com capacidade para 7 mL. Autoclavados a 121ºC por 15 minutos. Armazenados a 5ºC ± 3ºC.

3.5.2.10 Resistência térmica

Em estufa com circulação de ar, pré-aquecida por no mínimo 30 minutos, foram expostas 10 unidades do indicador, à temperatura de 160ºC ± 2ºC, a diferentes tempos de exposição: 35, 30, 25, 20, 15 e 10 minutos. Os indicadores testados foram cultivados nos meio de recuperação, incubados a 36ºC ± 2ºC, por até sete dias. O valor de *D* (tempo de redução decimal) e U_{sk} (tempo médio de morte) foram

calculados pelo método da fração negativa e pelo método de Spearman-Kaber (USP29, 2006). O teste foi realizado em duplicata.

3.5.3 Resultados e discussões

Foram testadas diferentes formulações de meios de cultura para avaliar o crescimento do *Bacillus atrophaeus*. Os resultados, FIGURA 64, demonstraram que todos os meios testados, com exceção do meio nº 3 (vinhaça de cana com extrato de levedura), foram capazes de promover o crescimento do microrganismo, mesmo sem adição de suplementos.

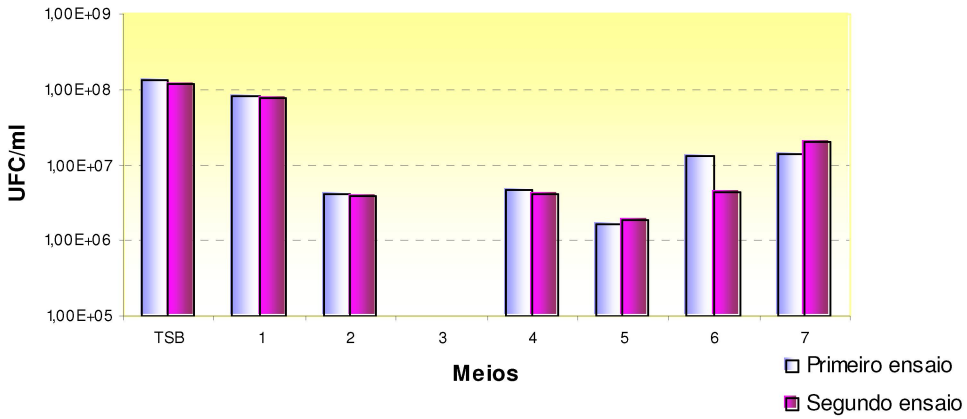


FIGURA 64 - CRESCIMENTO DO *Bacillus atrophaeus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA: (TSB-referência); (1) MELAÇO DE SOJA E PEPTONA ;(2) VINHAÇA DE SOJA E EXTRATO DE CARNE; (3) VINHAÇA DE CANA E EXTRATO DE LEVEDURA ; (4) MELAÇO DE SOJA 1/50 ; (5) MELAÇO DE SOJA 1/60;(6) VINHAÇA DE CANA; (7) VINHAÇA DE SOJA

A adição de fontes suplementares de carbono e nitrogênio às vinhaças de cana e de soja não promoveu um aumento de produção da biomassa. No entanto, a adição de peptona ao melaço de soja permitiu um aumento da biomassa em aproximadamente um log (10 vezes). Os resultados também demonstram que o melhor crescimento ocorreu no meio nº 1 (melaço de soja suplementado) e que a adição de peptona de caseína ao melaço de soja afetou positivamente a cultura, a qual apresentou resultados similares ao meio controle.

A aplicação do Teste F nos resultados obtidos forneceu F = 1,2269; *p* = 0,7942. A aplicação do Teste de Mann-Whitney (Wilcoxon) forneceu W= 32,0 e *p* = 0,9581, (>0,05) e a aplicação do Teste *t* de Student forneceu: *t*= 0,0952; *p*=0,9255. Estes resultados demonstraram que não existe diferença estatisticamente signoficativa entre as duas amostras num nível de confiança de 95%. O Box e Wisker Plot originado (FIGURA 65) demonstra graficamente esta igualdade.

Este conjunto de análises nos permitiu eliminar o segundo repique do processo, levando a uma redução de tempo, energia e consumo de meio de cultivo. Também indicaram que as formulações que forneceram biomassa igual ou superior a 1,5 x 10^7 UFC.mL^{-1} (mediana) podem substituir o meio de referência.

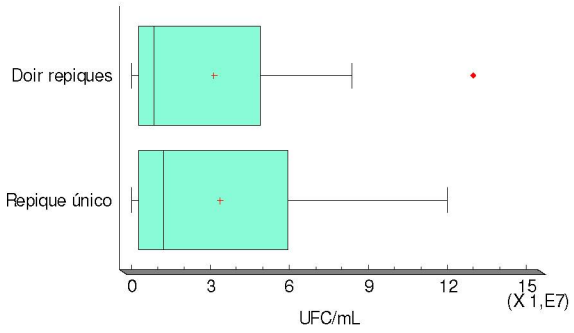


FIGURA 65 - BOX E WISKER PLOT DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO DO *Bacillus atrophaeus* CULTIVADO EM RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Após a eleição do meio melaço de soja suplementado com peptona, como meio para a substituição do meio industrializado, iniciou-se o processo de sua otimização. Os resultados obtidos no experimento referente ao primeiro delineamento fatorial foram submetidos à análise estatística das variâncias (ANOVA), e apresentaram F= 4, 07 e *p*= 0,0746 (*p*> 0,05) para o melaço de soja e p= 0,0005 (p< 0,05) para a peptona, indicando que a última é a fonte de nutrientes que influenciou a produção da biomassa (TABELA 55). O número máximo de células viáveis foi obtido com uma concentração de peptona de 4,0%.

TABELA 55 – RESULTADOS, EM UFC.mL $^{-1}$, DA OTIMIZAÇÃO DO INÓCULO

Meio	1	2	3	4	5
Biomassa	$4,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$
UFC.mL $^{-1}$	$4,3 \times 10^7$	$8,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
	$3,5 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$7,9 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
Mediana	$4,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$7,9 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
Média	$4,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$

A plotagem da menor diferença significativa da média de Fischer (*least significant difference*- LSD) ,FIGURA 66, demonstrou que apenas o meio nº 1 (que apresentou os melhores resultados) é estatisticamente diferente de todos os demais.

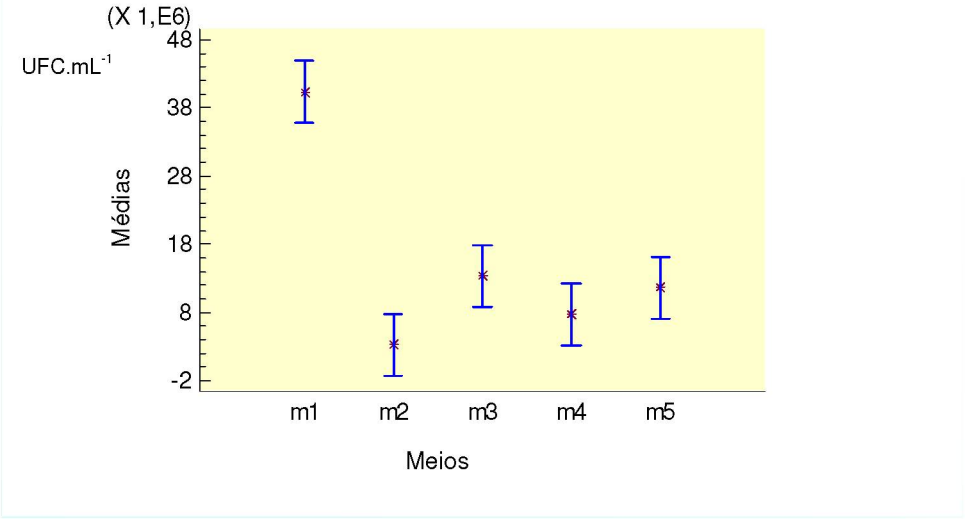


FIGURA 66 - MENOR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DA MÉDIA DE FISCHER PARA BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus* (EM % DE MELAÇO DE SOJA E PEPTONA) : m1 (4/4); m2 (4/1); m3 (1/4); m4 (1/1); m5 (2,5/2,5-=pto central)

A análise dos efeitos pelo gráfico de Pareto, FIGURA 67, confirma graficamente a influência da peptona na produção da biomassa.

Os resultados obtidos no segundo delineamento fatorial (2^2), TABELA 56, demonstraram que o aumento da concentração de peptona para 6,0% não proporcionou efeito positivo na produção da biomassa.

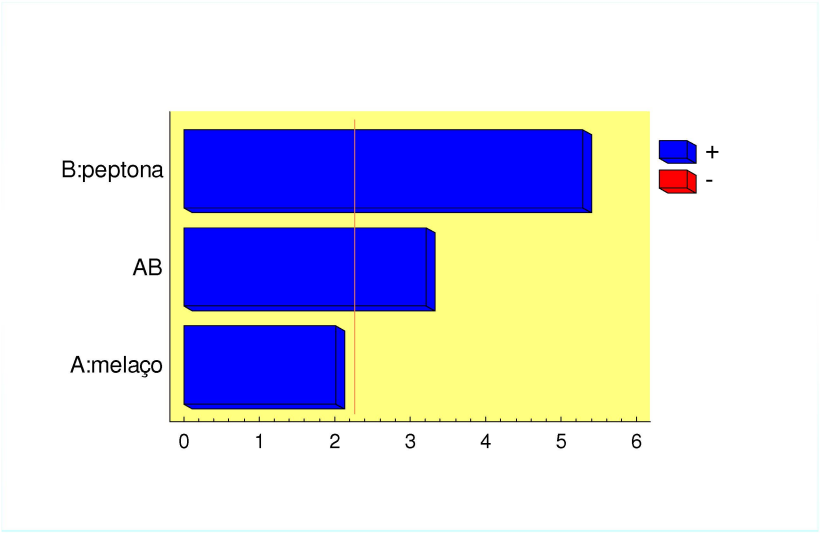


FIGURA 67 - GRÁFICO DE PARETO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus,* EM FUNÇÃO DO TESTE *t.*

TABELA 56 –CONCENTRAÇÃO DA PEPTONA DE CASEÍNA x BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus*

Meio	**Conc.melaço**	**Conc. peptona**	**Biomassa** (UFC. mL^{-1})
1	1,0%	4,0%	$1,3 \times 10^7$
2	1,0%	6,0%	$1,2 \times 10^7$
3	4,0%	4,0%	$4,0 \times 10^7$
4	4,0%	6,0 %	$2,3 \times 10^7$

A FIGURA 68 demonstra graficamente que a relação biomassa x concentração de peptona no meio de cultivo, e também que a concentração máxima de peptona que atuou como fator positivo na biomassa foi 4,0%.

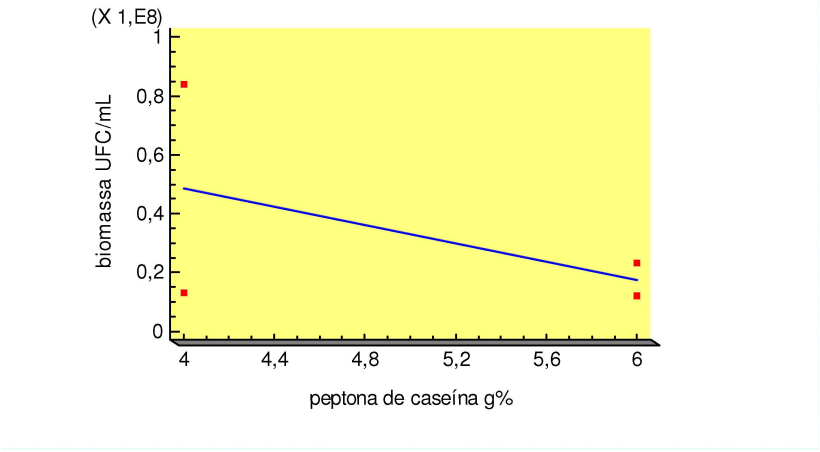


FIGURA 68 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO DE CULTIVO NA BIOMASSA DO *Bacillus atrophaeus*

Para avaliar a interferência do meio de cultivo do inóculo otimizado na resistência térmica dos esporos formados, foram preparados três lotes de indicadores biológicos com suspensões de esporos produzidas por FES, inoculada com células provenientes do meio melaço+triptona. Como controle, foram preparados mais dois lotes de indicador biológico: um com suspensão de esporos produzida por FES inoculada com células provenientes do meio TSB e outro com suspensão de esporos produzidos em ágar de esporulação inoculado com células provenientes do meio TSB. Estes indicadores foram submetidos ao ensaio de determinação da resistência térmica ao calor seco (160ºC). O número de esporos produzidos, em cada condição, e os valores indicativos da resistência térmica estão descritos na TABELA 57.

TABELA 57 – PRODUTIVIDADE E RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE INÓCULO

Lote	**Inóculo Cultivo 18 horas** (UFC.mL^{-1})	**Esporos** (CFU.g^{-1} massa seca)	***IB*** ***N_0*** (UFC. unid^{-1})	***$D_{160ºC}$*** (min)	***U_{sk}*** (min)	**Tempo de Sobrev.** (min)	**Tempo de morte** (min)
1-Inóculo: M+P	1,3 x 10 ^{8}	1,7 x 10 ^{10}	9,0 x 10 ^{6}	5,1±0,2	37,0±1,3	25,3±1,0	55,9 ± 2,2
2- Inóculo: M+P	2,1 x 10 ^{8}	1,2 x 10 ^{10}	6,8 x 10 ^{6}	5,2±0,2	37,0±1,3	25,1±1,0	56,3 ± 2,2
3- Inóculo: M+P	2,1 x 10 ^{8}	1,9 x 10 ^{10}	8,1 x 10 ^{6}	5,2±0,2	37,2±1,5	25,5±1,0	56,7 ± 2,2
4-FES-Controle Inóculo: TSB	1,8 x 10 ^{8}	1,2 x 10 ^{10}	7,2 x 10 ^{6}	5,2±0,2	37,1±1,6	25,3±1,0	56,5 ± 2,2
5-Agar Esp.Controle Inóculo: TSB	2,4 x 10 ^{8}	1,1 x 10 ^{8} UFC.g^{-1} agar	4,0 x 10 ^{6}	5,5±0,3	37,4±1,5	26,7±1,2	59,7 ± 2,7

M+P= melaço de soja 4.0% +peptona de caseína 4.0% TSB= caldo de soja tripticaseína

.

Todos os cultivos de 18 horas para a produção do inóculo, tanto em TSB como no meio otimizado, forneceram uma biomassa de 10 ^{8} UFC. mL^{-1}, confirmando a sua equivalência.

A concentração de esporos formados nos meios controles variou de 1,1 x 10^{8} a 1,2 x 10^{10} UFC.g^{-1} suporte seco , e de 1,2 x 10^{10} a 1,9 x 10^{10} UFC.g^{-1} massa seca nos meios testados, demonstrando que o meio de cultivo do inóculo não

interferiu significativamente na esporulação. Na FIGURA 69 observamos a demonstração gráfica destes resultados.

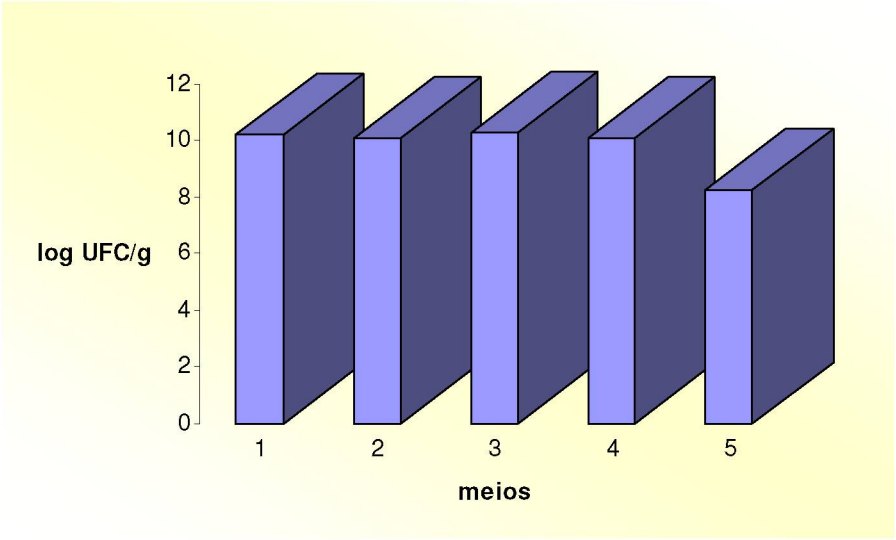


FIGURA 69 – PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PRODUZIDOS POR FES A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE INÓCULO: (1, 2, 3)MELAÇO DE SOJA MAIS PEPTONA ;(4) TSB; (5)TSB/ÁGAR (REFERÊNCIA)

Os resultados dos valores de $D_{160ºC}$ (TABELA 58) foram submetidos à análise estatística das variâncias (ANOVA), e apresentaram F= 0,46 e p= 0,7641 (p> 0,05), indicando que não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados num nível de confiança de 95%.

TABELA 58 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA OS VALORES DE $D_{160ºC}$

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	*p*
Regressão	0,184	4	0,046	0,46	0,7641
Resíduo	0,500	5	0,100		
Total	0,684	9			

A plotagem dos resultados pela menor diferença significativa da média de Fischer (FIGURA 70) demonstrou graficamente que todos os inóculos testados levaram à produção de esporos com a mesma resistência térmica ao calor seco (160ºC).

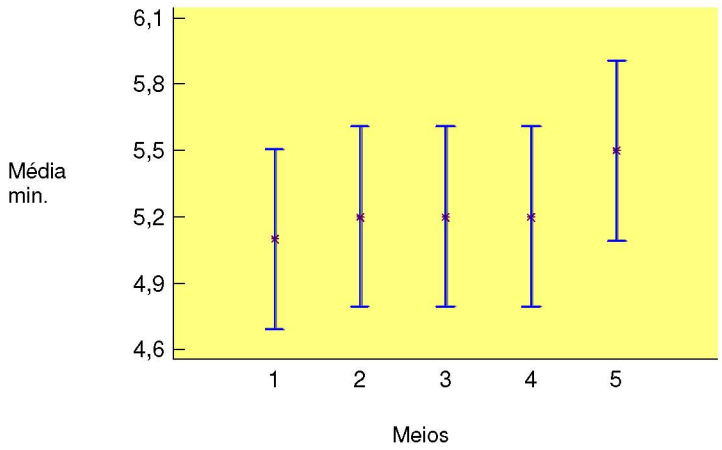


FIGURA 70 - RESISTÊNCIA TÉRMICA ($D_{160^{o}C}$) DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* PRODUZIDOS POR FES A PARTIR DE DIFERENTES MEIOS DE INÓCULO: (1-3) MELAÇO DE SOJA MAIS PEPTONA; (4) TSB; (5) TSB/ÀGAR (REFERÊNCIA)

Os resultados da resistência térmica indicaram que a utilização do meio complexo otimizado na produção do inóculo, no processo de fermentação em estado sólido, não afetou a qualidade dos esporos produzidos quanto à resistência ao calor seco a 160ºC, podendo substituir o meio industrializado.

3.6 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO , DO TIPO DE REATOR, DO MEIO DO INÓCULO E DA CONCENTRAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA NA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS POR FES

3.6.1 Introdução

O ambiente gasoso pode afetar significativamente os níveis de produção de biomassa, alguns microrganismos podem se desenvolver melhor em taxas de aeração mais elevadas, outros podem ter seu crescimento inibido. Del Bianchi *et al.* (2001) citam que "para um bom rendimento e uma rápida fermentação em substrato sólido é necessário o uso de uma grande área superficial do meio de cultura, no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar".

A área superficial do meio varia de acordo com modelo do reator utilizado, porém uma melhor aeração do substrato pode ser obtida através da redução da espessura da camada de substrato, pelo uso de bandejas ou reatores perfurados, pela agitação ou pela introdução de ar forçado estéril. A aeração pode ocasionar perda de umidade durante o processo, sendo necessário o uso de umidificadores de ar antes da sua introdução no reator.

Na primeira etapa deste experimento, a fermentação em estado sólido (já otimizada em frasco Erlenmeyer) foi realizada em colunas de leito empacotado com aeração forçada, denominadas de Colunas de Raimbault. Foram utilizadas oito colunas, aeradas constantemente com ar umidificado e colocadas dentro de um banho termostático para manter a temperatura constante. A influência de variáveis como umidade e aeração foram estudadas através do planejamento experimental, visando uma nova otimização da produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* nas condições do experimento.

A segunda etapa do experimento foi realizada em saco de polietileno autoclavável, fechado com lacre. Além de avaliar a interferência do efeito dos reatores, foi avaliada a interferência de outra concentração de melaço no substrato (3%), do meio de cultivo do inóculo e da redução do tempo de incubação na produção dos esporos.

Hipóteses propondo que *Bacillus* esporulam em resposta ao "stress" nutricional têm sido reportadas com freqüência na literatura (FOESTER, 1956; BERNLOHR; LEITZMANN, 1969; VINTER, 1969; WALDERBURGER, *et al.*,1993). Para avaliar a relação do consumo de nutrientes e das alterações físico-químicas do

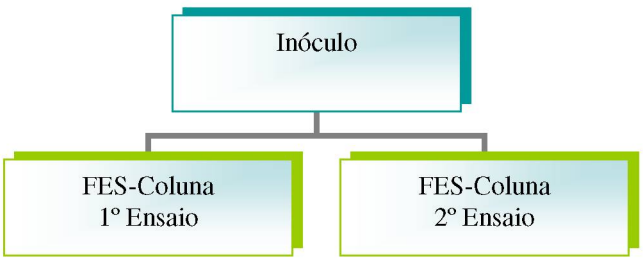
substrato com a produção de esporos foi realizada a cinética de esporulação do *Bacillus atrophaeus.*

A cinética foi executada em diferentes reatores: frasco Erlenmeyer com inóculo proveniente de meio sintético, frasco Erlenmeyer e saco de plástico autoclavável com inóculo proveniente de meio complexo. Durante os nove dias de fermentação, a cada 48 horas, foram avaliados os seguintes parâmetros: produção de biomassa total, produção de esporos, alteração do pH, umidade, atividade de água (A_w) e consumo de açúcares totais.

3.6.2 Material e métodos

O experimento foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na FIGURA 71-A e 71-B

A



B

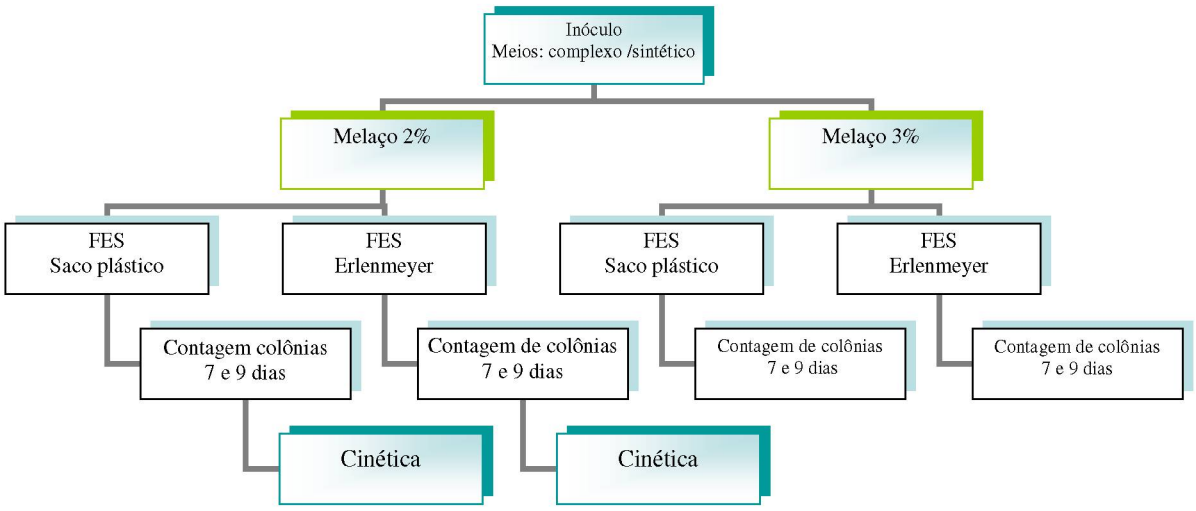


FIGURA 71 – FLUXGRAMA DOS EXPERIMENTOS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO, DO TIPO DE REATOR, DO MEIO DO INÓCULO E DA CONCENTRAÇÃO DO MELAÇO DE SOJA NA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ESPOROS POR FES: (A) PRIMEIRA ETAPA; (B) SEGUNDA ETAPA

FONTE: O AUTOR

3.6.2.1 Fermentação em estado sólido

3.6.2.1.1 Colunas com aeração forçada

Foram utilizadas colunas de vidro de baixa capacidade, acopladas a um sistema de aeração, semelhante ao desenvolvido por Raimbault e Alazard (1980). Estes biorreatores são constituídos por colunas de vidro de 4,0 cm de diâmetro e 20,0 cm de comprimento, com volume útil de aproximadamente 250 mL. As colunas preenchidas com o substrato ficam sobre um umidificador dentro de um banho-maria termostatizado com temperatura controlada. O controle de fluxo de ar saturado em água é feito por intermédio de microválvulas. O equipamento permite a instalação de oito colunas (BRAND, 2006).

As colunas de Raimbault e os umidificadores foram esterilizados a 121ºC durante 20 minutos. A inoculação do substrato estéril foi realizada em copo de Becker de 1000 mL e após uma intensa homogeneização, as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar (FIGURA 72).

FIGURA 72 - COLUNAS DE RAIMBAULT PREENCHIDAS COM O SUBSTRATO INOCULADO

FONTE: O AUTOR (2007)

Cada coluna foi pesada antes e após preenchimento com o substrato e colocada sobre os umidificadores, contendo aproximadamente 150 mL de água destilada estéril, para umidificar o ar antes da sua passagem pelo reator. As colunas foram introduzidas nas cubas de FES equipadas com regulação de temperatura e fluxo de ar. A temperatura da água da cuba foi ajustada para 36ºC ± 2ºC, e mantida com auxílio de um termostato. Cada coluna foi ligada a uma válvula de ar que permitiu o ajuste do fluxo de ar ao valor desejado (0-90 mL/min), controlado através de um aerômetro ou rotâmetro colocado na saída de cada coluna (FIGURA 73).

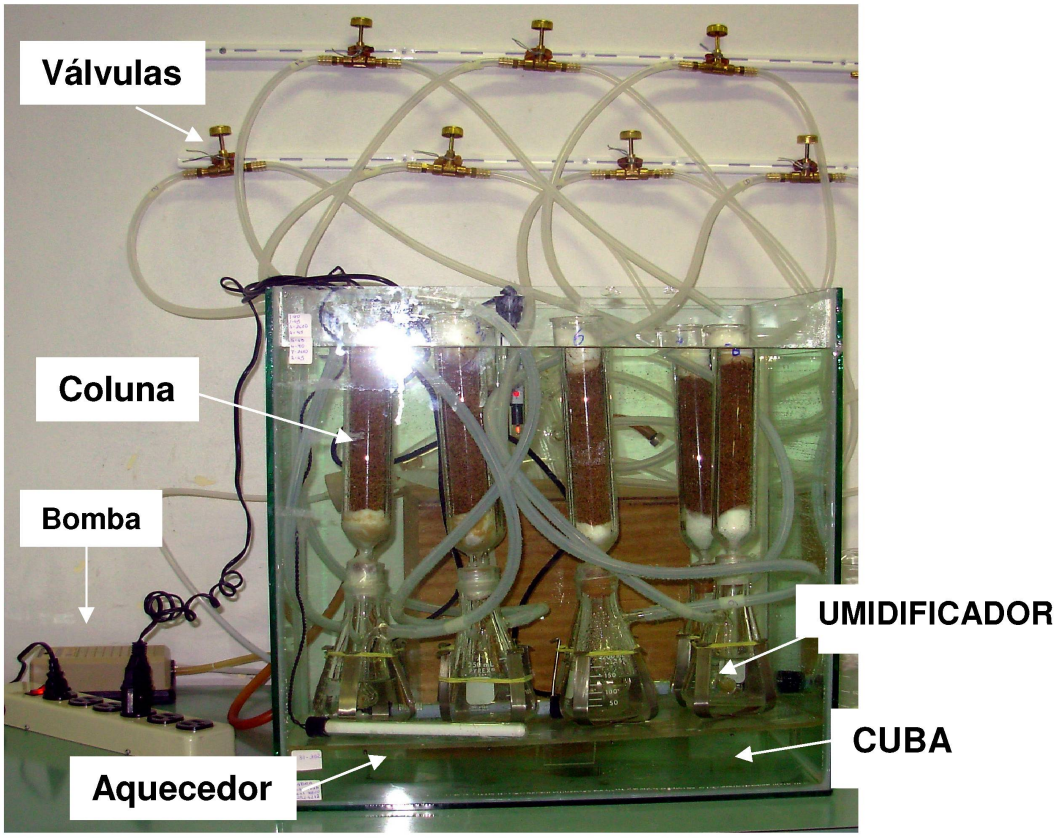


FIGURA 73 - SISTEMA DE FES EM COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA
FONTE: O AUTOR (2007)

Como suporte foi utilizado o bagaço de cana moído, lavado e seco, com tamanho médio da partícula de 1,0 mm. O substrato adicionado foi o melaço de soja (~75ºBrix a 20 ºC) na concentração de 2%, com sais estimuladores da esporulação (K_2HPO_4. H_2O, 0,005%; $MnSO_4$. H_2O, 0,004%; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,004%; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,005%), diluído em água destilada. O pH foi corrigido para oito com NaOH 0,1N. O substrato foi adicionado ao suporte seco antes da autoclavação (121 ºC por 15 minutos). No preparo do inóculo, 50 µL da suspensão de esporos do *Bacillus atrophaeus* Lote CPPI nº.01/06 (8,0 x 10^7 UFC.mL^{-1}) foram semeados em frasco Erlenmeyer com 200 mL de caldo de soja tripticaseína cada. Incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC. A produção de esporos, a umidade final e o pH foram determinados após nove dias de incubação.

3.6.2.1.2 Efeito da umidade inicial e da aeração: primeiro ensaio

Para o estudo da influência da umidade e da aeração, foi utilizado um delineamento fatorial misto, compostos de dois fatores , dois e três níveis e um ponto central. Foi

realizado também um controle sem aeração, totalizando oito experimentos, como mostrado nas TABELAS 59 e 60. O inóculo foi cultivado em TSB. A taxa de inóculo foi de 3% em relação ao volume do substrato, correspondendo a 7,5 x 10^8 UFC.g^{-1} de massa seca.

TABELA 59 - VALORES UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO FATORIAL DO 1º ENSAIO DA FES EM COLUNA

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
Umidade (%)	86	88	90
Aeração (mL/min)	30	60	90

TABELA 60 - DELINEAMENTO FATORIAL DO 1.º ENSAIO DA FES EM COLUNA

Ensaio	Replicata	Umidade	Aeração
1	1	0	0
2	1	+1	+1
3	1	+1	-1
4	1	-1	-1
5	1	-1	+1
6	1	0	+1
7	1	0	-1
8	2	0	0

Em paralelo foram realizados três cultivos em frasco Erlenmeyer, de 250 mL de capacidade, boca larga com tampão de algodão, sob as mesmas condições de cultivo das colunas, exceto as de aeração.

3.6.2.1.3 Efeito da umidade inicial e da aeração: segundo ensaio

Para dar continuidade ao estudo da influência da umidade e da aeração, foi utilizado um delineamento fatorial 2^2. Composto de dois fatores, dois níveis e um ponto central (em duplicata), totalizando oito experimentos, como mostrado nas TABELAS 61 e 62. Nesta etapa o inóculo foi produzido em meio complexo(subproduto agro-industrial suplementado). A taxa de inóculo foi de 3% em relação ao volume do substrato, correspondendo a 2,1 x 10^7UFC.g^{-1} de massa seca.

TABELA 61 - VALORES UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO FATORIAL DO 2.º ENSAIO DA FES EM COLUNA

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
Umidade (%)	84	86	88
Aeração (mL/min)	0	45	90

TABELA 62 - DELINEAMENTO FATORIAL DO 2º ENSAIO DA FES EM COLUNA

Ensaio	Replicata	Umidade	Aeração
1	1	+1	+1
2	1	+1	0
3	1	+1	-1
4	1	0	0
5	2	0	0
6	1	-1	+1
7	1	-1	0
8	1	-1	-1

Em paralelo foram realizados cinco cultivos em frasco Erlenmeyer de 250 mL, com diferentes taxas de umidade, sob as mesmas condições de cultivo das colunas, exceto as de aeração.

3.6.2.2 Sacos de polietileno

Como reatores foram utilizados sacos de polietileno de alta densidade autoclaváveis, marca Descarpack, largura 39 cm e comprimento 50 cm, lote G07/05. Os sacos foram fechados com lacre de plástico após inoculação. Foram adicionados ao saco vazio 12,0g de bagaço de cana moído, lavado e seco, com tamanho médio da partícula de 1,0 mm. O substrato foi adicionado ao suporte seco antes da autoclavação (121 ºC por 15 minutos). A umidade inicial foi estabelecida em 91% (capacidade máxima de absorção à quente do lote de bagaço utilizado).

Os substratos adicionados foram: (a) melaço de soja 2,0%, adicionado de sais estimuladores da esporulação (K_2HPO_4. H_2O, 0,005%; $MnSO_4$. H_2O, 0,004%; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,004%; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,005%); (b) melaço de soja 3,0%, adicionado de sais estimuladores da esporulação, diluídos em água destilada. O pH foi corrigido para oito com NaOH 0,1N. A taxa de inoculo foi 3% em relação ao volume do substrato:

a) Cultivado em meio industrializado (TSB), correspondendo a 5,0 x 10^7 UFC.g^{-1} de massa seca;

b) Cultivado em meio complexo: 50,0 µL da suspensão de esporos do *Bacillus atrophaeus,* Lote CPPI nº 01/06 (8,0 x 10^7 UFC.mL^{-1}) foram semeados em frasco Erlenmeyer com 200 mL de caldo constituído de melaço de soja 4,0% e triptona 4,0%, pH 7,2 ± 0,1. Incubados por 18 horas a 36ºC ± 2ºC. A taxa de inóculo correspondeu a 7,2 x 10^7UFC.g^{-1} de massa seca.

A produção de esporos, a umidade final e o pH foram determinados no início e após nove dias de incubação, a 36ºC ± 2ºC. Em paralelo foram realizados cultivos em frasco Erlenmeyer, de 250 mL, sob as mesmas condições de fermentação das colunas .

Foi realizado um delineamento fatorial 2^2 (dois fatores, dois níveis) para a avaliar a interferência da concentração de melaço do substrato e do tempo de incubação na produção de esporos para cada tipo de reator e para cada composição do meio do inóculo (TABELA 63),em um total de 16 ensaios, como demonstrado na TABELA 64.

TABELA 63 - PARÂMETROS DO DELINEAMENTO FATORIAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA % DE MELAÇO E DO TEMPO, POR MEIO DO INÓCULO E REATOR NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Variáveis	**Nível**	
	-1	**1**
%melaço no substrato	2,0	3,0
Tempo de Incubação	7 dias	9 dias

TABELA 64 - DELINEAMENTO DOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EFEITO DA % DE MELAÇO E DO TEMPO, POR MEIO DO INÓCULO E REATOR NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES

Ensaio	**Reator**	**Meio de cultivo do inóculo**	**% de melaço**	**Tempo de incubação**
1	Erlenmeyer	Sintético	-1	-1
2			+1	-1
3			-1	+1
4			+1	+1
5		Complexo	-1	-1
6			+1	-1
7			-1	+1
8			+1	+1
9	Saco plástico	Sintético	-1	-1
10			+1	-1
11			-1	+1
12			+1	+1
13		Complexo	-1	-1
14			+1	-1
15			-1	+1
16			+1	+1

3.6.2.3 Umidade e atividade de água (A_w)

Entre 1,0g a 5,0 g das amostras fermentadas foram pesadas em cápsulas de porcelana previamente secas em estufa e taradas em balança de precisão. Cada amostra foi seca durante 24 horas à 105ºC, resfriada em dessecador e pesada novamente. A perda em água da amostra expressa a matéria seca (quantidade de sólidos por 100 g de amostra fresca) e a quantidade de água (massa de água contida em 100 g de amostra fresca). A umidade foi calculada pela equação:

$$Umidade(g\%) = \frac{Ax100}{P}$$

Onde:

A = diferença entre o peso da amostra úmida e peso da amostra seca,

P = peso da amostra úmida,

A determinação da atividade de água (Aw) foi executada no aparelho Aqualab CX 2, no laboratório de bioprocessos da UFPR.

3.6.2.4 pH

A medida do pH foi realizada diretamente em uma suspensão obtida de 1,0g da amostra em 10 mL de água destilada. Agitada em vortex. Deixada em repouso até a sedimentação. Foi realizada por meio de pHmetro digital calibrado e aferido.

3.6.2.5 Cinética

a) Cultivo em frasco Erlenmeyer *:* 5,0 g do bagaço de cana moído, lavado e seco, com tamanho médio da partícula de 1,0 mm, foram adicionados a nove frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade. O substrato adicionado foi melaço de soja (~75ºBrix a 20ºC) na concentração de 2,0%, com sais estimuladores da esporulação (K_2HPO_4. H_2O, 0,005%; $MnSO_4$. H_2O, 0,004%; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,004%; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,005%), diluídos em água destilada. O

pH foi corrigido para oito com NaOH 0,1N. A umidade inicial foi estabelecida em 91% (capacidade máxima de absorção à quente do lote de bagaço utilizado). O substrato foi adicionado ao suporte seco antes da autoclavação (121 ºC por 15 minutos). A taxa de inóculo foi de 3% em relação ao volume do substrato. O cultivo foi incubado em estufa, a 36ºC ±2ºC por até nove dias. Após 24 horas e a cada 48 horas foi retirado um frasco para a avaliação dos parâmetros estudados.

b) Cultivo em saco plástico*:* foram utilizados sacos de polietileno autoclavável, marca Descarpack, largura 39,0 cm e comprimento 50,0 cm, lote G07/05. Fechados com lacre de plástico após inoculação. Foram adicionados a cada saco vazio 50,0g de bagaço de cana moído, lavado e seco, com tamanho médio da partícula de 1,0 mm. As condições de cultivo foram às mesmas descritas para os frascos Erlenmeyer. Após 24 horas e a cada 48 horas, em fluxo laminar, foi retirada uma amostra, correspondendo a aproximadamente 5,0g de massa seca, para a avaliação dos parâmetros estudados.

3.6.2.6 Preparo da suspensão de esporos

Foram adicionados ao fermentado 100 mL de acetato de cálcio 0,02M com Tween 80 (0,01%), pH 9,7, e pérolas de vidro estéreis. A mistura foi agitada em agitador orbital tipo shaker a 4ºC por uma hora, a 250 rpm. A suspensão foi filtrada em funil com gaze e algodão. Os esporos foram lavados por três vezes em centrífuga refrigerada, a 2500 rpm (1048 g), por 20 minutos a 4ºC. Suspensos em 50 mL de uma solução de acetato de cálcio 0,02M, pH 9,7. A suspensão foi submetida ao aquecimento a 80ºC por 10 minutos, para eliminação das formas vegetativas e contaminantes, armazenada a 5ºC ± 3º C.

3.6.2.7 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa foi realizada por diluição seriada decimal e inoculação, em duplicata, de 50 µL de cada diluição na superfície do ágar de soja tripticaseína. As placas foram incubadas a 36ºC ± 2ºC por 18 horas a 24 horas. O resultado foi considerado como a média das duas contagens de colônias e expresso em UFC.mL

$^{-1}$. O resultado em UFC.mL^{-1} foi multiplicado pelo volume de recuperação (50,0mL) e dividido pelo peso do suporte em matéria seca (5,0g) fornecendo a quantificação em UFC.g^{-1} de massa seca. Para a quantificação dos esporos, a suspensão foi submetida previamente a um tratamento térmico em banho-maria a 80ºC por 15 minutos, para eliminar todas as formas vegetativas.

3.6.2.8 Dosagem de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi,1945) após hidrólise ácida. Foi pesado 1,0 g do substrato e acondicionado em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de água destilada e 1,0 mL de HCl concentrado. Os frascos foram colocados em banho-maria a 100°C durante 20 minutos. O pH foi neutralizado com uma solução de NaOH 3M. O volume foi completado para 100,0 mL em balão volumétrico e a suspensão foi homogeneizada e filtrada. A amostra, quando necessário, foi diluída a 1/2 e 1/3 de modo a se obter uma absorbância entre 0,2 a 0,8. A 1,0 mL desta diluição, adicionou-se 1,0 mL do reativo de Somogyi. Incubou-se em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. Depois de resfriado, adicionou-se 1,0 mL do reativo de Nelson. A mistura foi homogeneizada e se adicionou mais 7,0 mL de água destilada. A densidade ótica foi lida a 535 nm. A curva padrão foi feita com solução de glicose 10,0 mg%.

3.6.3 Resultados e discussões

.

Na execução do primeiro ensaio, utilizando colunas como reator, observou-se que os cultivos nº 2 e nº 3 (com 90% de umidade) perderam as características da FES, formando água livre durante a incubação, levando-nos a concluir que esta taxa de umidade foi muito elevada para a FES utilizando reator em coluna. A perda de umidade no processo foi no máximo de 5,0% , enquanto que a atividade de água foi mantida e o pH aumentou entre 0,5 a 1,8. A maior produção de esporos foi observada na coluna sem aeração (6,1 x 10^7 UFC. g^{-1} de massa seca), como demonstrado na TABELA 65.

TABELA 65 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM COLUNA: PRIMEIRO ENSAIO

Ensaio coluna	Umidade (%)	Aeração (mL/min)	Aw Inicial (21 a 22ºC)	pH inicial	Massa Úmida (g)	Massa Seca (g)	Umidade final (%)	Aw Final (21 a 22ºC)	pH final	Esporos ($UFC.g^{-1}$)
1	88	60	0,974	6,4	58,9	7,1	87	0,974	8,0	$2,6 \times 10^{7}$
2	90	90	0,973	6,1	56,5	5,7	87	0,972	7,3	$2,1 \times 10^{6}$
3	90	30	0,973	6,1	59,9	6,0	87	0,972	6,6	$1,8 \times 10^{6}$
4	86	30	0,968	6,0	40,3	5,6	81	0,971	6,9	$3,7 \times 10^{6}$
5	86	90	0,968	6,0	52,5	7,3	83	0,974	7,8	$3,9 \times 10^{6}$
6	88	90	0,974	6,4	56,5	6,8	87	0,972	7,3	$3,1 \times 10^{7}$
7	88	30	0,974	6,4	50,6	6,1	84	0,972	6,6	$2,0 \times 10^{7}$
8 (1)	88	-	0,974	6,4	49,9	6,0	85	0,976	7,9	$6,1 \times 10^{7}$

OBS: (1) Controle:cultivo em frasco Erlenmeyer

O diagrama de Pareto dos resultados obtidos (FIGURA 74) demonstrou que nenhuma das variáveis estudadas afetou significativamente o processo.

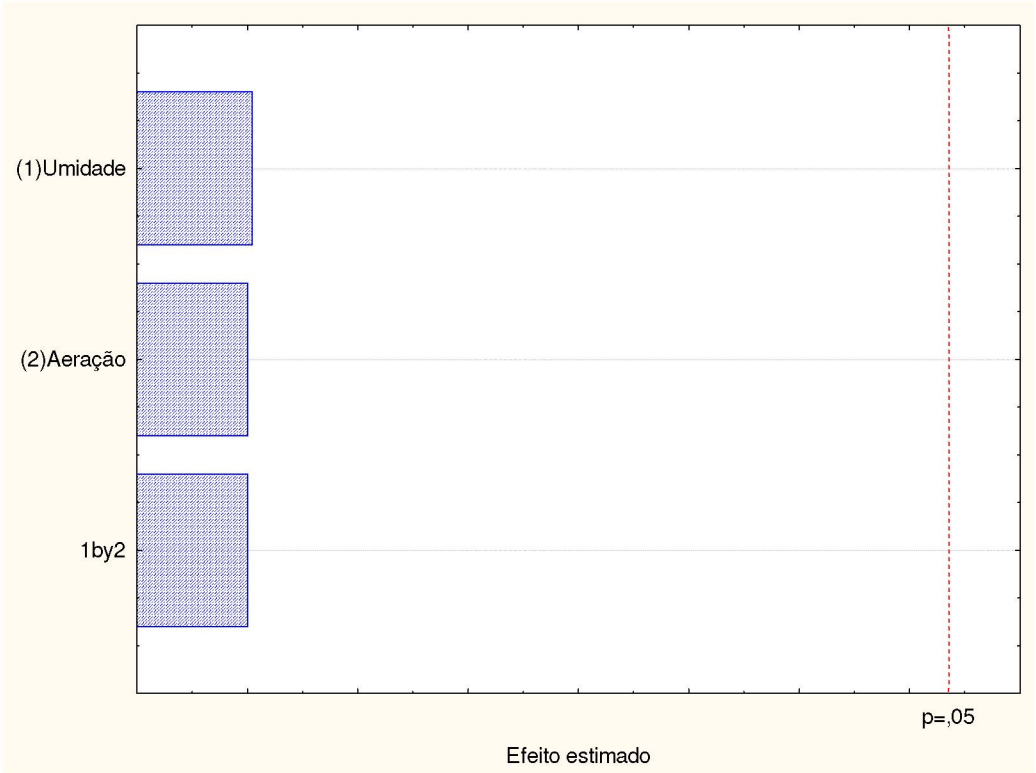


FIGURA 74 - DIAGRAMA DE PARETO DO EFEITO DA AERAÇÃO E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* -1º ENSAIO

A plotagem dos principais efeitos (FIGURA 75) demonstra que a umidade de 88% propiciou uma melhor esporulação, e que a variação de aeração entre 30 mL/min a 90 mL/min não gerou efeitos estatisticamente significativos na esporulação.

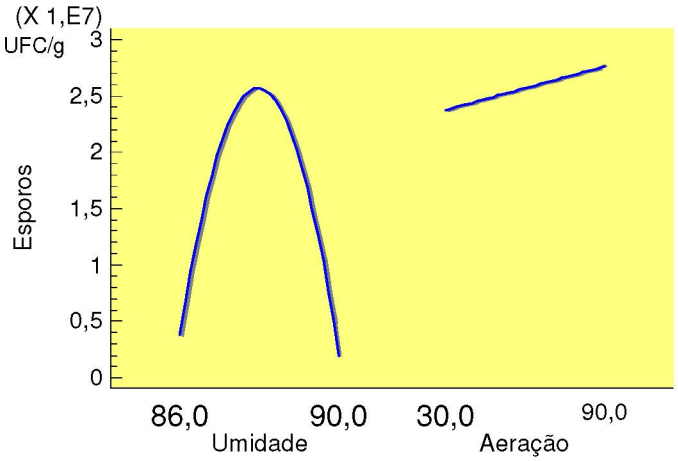


FIGURA 75 - PRINCIPAIS EFEITOS DA INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

A FES em frasco Erlenmeyer como reator, apresentou uma perda de umidade mais acentuada, de 3% a 27%, enquanto que a atividade de água foi mantida e o pH aumentou entre 1,2 a 2,7. A maior produção de esporos foi observada na maior umidade de 90% (1,7 x 10^9 UFC. g^{-1} de massa seca), como demonstrado na TABELA 66.

TABELA 66 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM ERLENMEYER: PRIMEIRO ENSAIO

Ensaio Erlen.	**Umi-dade** (%)	**Aw Inicial** (21 a 22ºC)	**pH inicial**	**Massa Úmida** (g)	**M. Seca** (g)	**Umi-dade final** (%)	**Aw Final** (21 a 22ºC)	**pH final**	**Esporos** (UFC.g^{-1})
1	86	0,968	6,0	30,3	5,9	61	0,969	7,9	1,1 x 10^8
2	88	0,973	6,1	33,6	5,3	78	0,975	8,8	6,9 x 10^8
3	90	0,973	6,1	52,0	6,5	87	0,976	7,3	1,7 x 10^9

Nas condições do ensaio, a produção em frasco Erlenmeyer foi aproximadamente dois log (100 vezes) maior que a produção em coluna.

No segundo ensaio foram avaliados os efeitos, em outras condições de umidade e aeração. No final do processo, na FES utilizando reator em coluna a perda de umidade foi no máximo de 7%, enquanto que a atividade de água foi mantida e o pH aumentou entre 1,3 a 1,9. A maior produção de esporos foi

observada na coluna sem aeração, com umidade de 88% (3,7 x 10^{10} UFC. g^{-1} de massa seca), como demonstrado na TABELA 67.

TABELA 67 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM COLUNA: SEGUNDO ENSAIO

Ensaio coluna	Umidade (%)	Aeração (mL/min)	Aw Inicial (21 a 22ºC)	pH inicial	Massa Úmida (g)	M. Seca (g)	Umidade final (%)	Aw final (21 a 22ºC)	pH final	Esporos (UFC.g^{-1})
1	88	90	0,970	5,7	78,1	10,9	86	0,970	7,0	1,7 x 10^{10}
2	88	45	0,970	5,7	89,5	14,3	84	0,974	7,6	1,7 x 10^{10}
3	88	0	0,970	5,7	98,7	17,8	82	0,975	7,0	3,7 x 10^{10}
4	86	45	0,974	5,7	63,1	11,4	82	0,975	7,2	1,7 x 10^{10}
5	86	45	0,974	5,7	61,3	12,3	80	0,976	7,0	6,7 x 10^{9}
6	84	90	0,974	5,7	65,8	11,8	82	0,975	7,6	6,8 x 10^{8}
7	84	0	0,974	5,7	69,2	15,9	77	0,975	7,0	3,3 x 10^{7}
8	84	45	0,974	5,7	60,4	12,1	80	0,976	7,6	6,5 x 10^{7}

Os resultados foram submetidos à análise estatística das variâncias (ANOVA), e apresentaram $p > 0,05$, indicando que não existe diferença estatisticamente significativa entre eles, num nível de confiança de 90% (TABELA 68).

TABELA 68 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O EFEITO DA AERAÇÃO E DA UMIDADE: SEGUNDO ENSAIO

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	*p*
(1) Umidade	2,8 x 10^{20}	1	2,8 x 10^{20}	0,8021	0,4650
(2) Aeração	1,1 x 10^{17}	1	1,1 x 10^{17}	0,0003	0,9875
(1)/(2)	1,1 x 10^{17}	1	1,1 x 10^{17}	0,0003	0,9875
Erro	6,9 x 10^{20}	2	3,5 x 10^{20}		
Total	9,7 x 10^{20}	5			

R^2=0,94

A FIGURA 76, diagrama de Pareto da produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* : aeração x umidade, demonstra que não foi observado efeito na variação da aeração entre 0 a 90 mL /min e da umidade entre 84% a 88%.

A análise conjunta dos resultados dos dois ensaios realizados, nos níveis estudados, conclui que a aeração não exerce efeito positivo na produção de esporos do *Bacillus atrophaeus*.

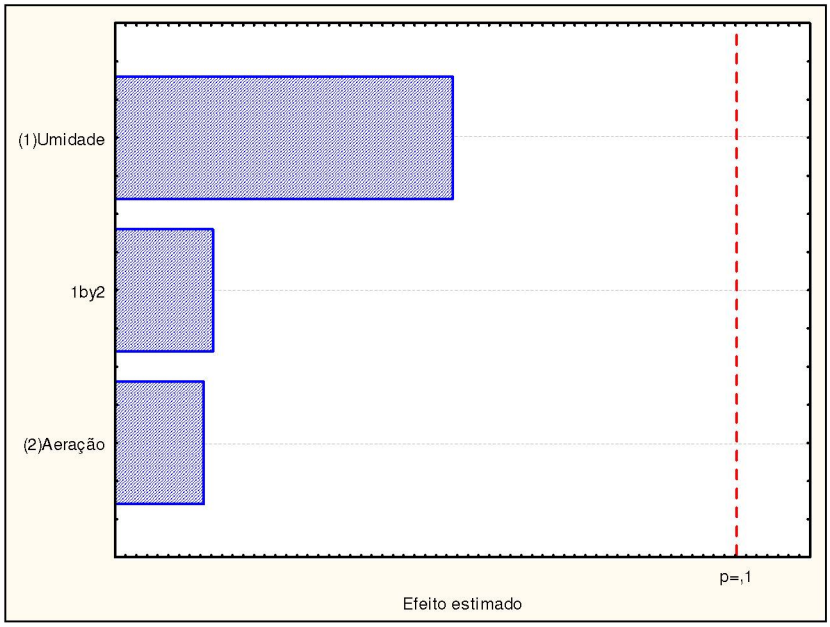


FIGURA 76 - DIAGRAMA DE PARETO DO EFEITO DA AERAÇÃO E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* -2º ENSAIO

A FES em frasco Erlenmeyer, como reator, apresentou uma perda de umidade de até 15%, a atividade de água foi mantida e o pH aumentou de 1,1 a 1,9. A maior produção de esporos foi observada na umidade de 91% (2,0 x 10^{10} UFC. g^{-1} de massa seca), como demonstrado na TABELA 69.

TABELA 69 – PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES EM ERLENMEYER: SEGUNDO ENSAIO

Ensaio Erlen.	**Umid.** (%)	**Aer.**	**Aw In.** (21 a 22ºC)	**pH in.**	**Massa Úmida** (g)	**M. Seca** (g)	**Umid fin.** (%)	**Aw fin.** (21a22 ºC)	**pH final**	**Esporos** (UFC.g^{-1})
1	84	-	0,974	5,7	29,7	7,4	75	0,974	7,5	3,9 x 10^{7}
2	86	-	0,974	5,7	29,8	7,5	75	0,975	7,2	1,2 x 10^{7}
3	88	-	0,970	5,7	29,4	7,9	73	0,974	7,0	1,9 x 10^{10}
4	91	-	0,976	5,9	30,7	8,5	73	0,977	7,0	2,0 x 10^{10}
5	93	-	0,977	5,9	39,9	8,8	78	0,977	7,8	1,7 x 10^{10}

Nas condições do ensaio, a produção em frasco Erlenmeyer foi semelhante à produção em coluna. A análise conjunta dos resultados dos dois ensaios realizados indica uma produção de esporos do *Bacillus atrophaeus* maior ou igual quando se utilizou o frasco Erlenmeyer como reator, comparada com a FES em coluna.

No segundo ensaio foi avaliado como reator o saco plástico autoclavável, (FIGURA 77) foram também avaliadas: a interferência de nova concentração de melaço do substrato (3%), o efeito da composição do meio de cultivo do inóculo e o resultado da redução do tempo de incubação na produção de esporos de nove para sete dias. Os resultados estão demonstrados na TABELA 70.

FIGURA 77 - FES EM FRASCO ERLENMEYER E EM SACO PLÁSTICO AUTOCLAVÁVEL

FONTE: O AUTOR (2007)

TABELA 70 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES COM VARIAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPO DE INCUBAÇÃO ,POR MEIO DO INÓCULO E TIPO DE REATOR

Ensaio	**Reator**	**Inoculo**	**% melaço**	**Tempo Incubação** (dias)	**Esporos** (UFC.g^{-1})
1	Erlenmeyer	sintético	2	7	8,5 x 10^9
2			2	9	8,3 x 10^9
3			3	7	6,0 x 10^9
4			3	9	9,7 x 10^9
5	Erlenmeyer	complexo	2	7	7,3 x 10^9
6			2	9	5,6 x 10^9
7			3	7	9,9 x 10^8
8			3	9	1,3 x 10^9
9	Saco plástico	sintético	2	7	8,3 x 10^9
10			2	9	9,0x 10^9
11			3	7	5,3 x 10^8
12			3	9	5,2 x 10^8
13	Saco plástico	complexo	2	7	5,0 x 10^8
14			2	9	5,3 x 10^8
15			3	7	8,9 x 10^8
16			3	9	2,4 x 10^9

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística das variâncias (ANOVA), e apresentaram *p*> 0,05, indicando que não existe diferença estatisticamente significativa entre eles.

TABELA 71 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O EFEITO DA VARIAÇÃO DO SUBSTRATO E TEMPO DE INCUBAÇÃO ,POR MEIO DO INÓCULO E TIPO DE REATOR

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	*p*
(1) Reator	$3,9 \times 10^{19}$	1	$3,9 \times 10^{19}$	3,6050	0,1161
(2)% Melaço	$4,1 \times 10^{19}$	1	$4,1 \times 10^{19}$	3,8398	0,1074
(3) Meio do inoculo	$6,1 \times 10^{19}$	1	$6,1 \times 10^{19}$	5,7053	0,0625
(4) Tempo incubação	$1,2 \times 10^{18}$	1	$1,2 \times 10^{18}$	0,1120	0,7514
(1)/(2)	$3,3 \times 10^{17}$	1	$3,3 \times 10^{17}$	0,0646	0,8096
(1)/(3)	$6,7 \times 10^{17}$	1	$6,7 \times 10^{17}$	0,0285	0,8725
(1)/(4)	$9,0 \times 10^{14}$	1	$9,0 \times 10^{14}$	0,0000	0,9965
(2)/(3)	$5,1 \times 10^{18}$	1	$5,1 \times 10^{18}$	0,4625	0,5267
(2)/(4)	$2,8 \times 10^{17}$	1	$2,8 \times 10^{17}$	0,0917	0,7743
(3)/(4)	$1,0 \times 10^{18}$	1	$1,0 \times 10^{18}$	0,2629	0,6300
Erro	$5,4 \times 10^{19}$	5	$1,1 \times 10^{19}$	-	-
Total	$2,0 \times 10^{20}$	15	-	-	-

R^2=0,74

O diagrama de Pareto dos resultados obtidos (FIGURA 78) demonstrou que nenhuma das variáveis estudadas afetou significativamente o processo.

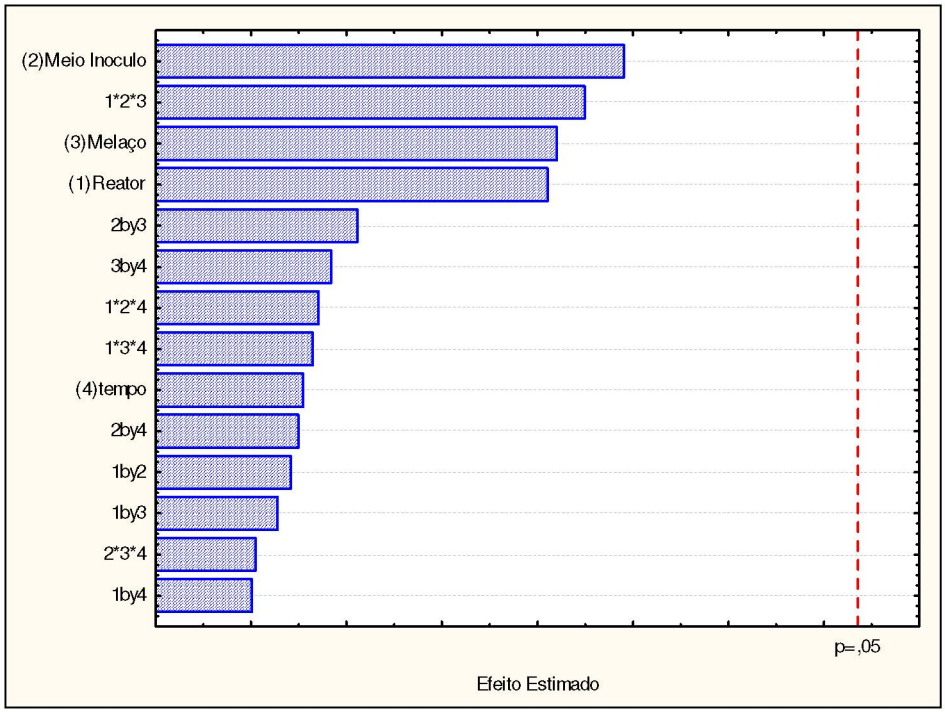


FIGURA 78 - DIAGRAMA DE PARETO DO EFEITO DO REATOR, SUBSTRATO, MEIO DO INÓCULO E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*

As alterações físico-químicas do processo foram demonstradas através do:

a) pH, que variou de 5,5 até 8,3 em sete dias, entre o 7.ºdia e o 9.º dia foi observada uma leve queda no pH (de até 0,7) na maioria das fermentações;
b) consumo de açucares, que foi em média 1,1 g% em sete dias e 1,3 g% em nove dias;
c) umidade, que sofreu redução, em até 4% (TABELA 72).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os processos executados em frasco e em saco plástico.

TABELA 72 - PRODUÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* POR FES: ALTERAÇÃO DO pH;CONSUMO DE CARBOIDRATOS E UMIDADE

Ensaio	**Reator**	**% melaço**	**Inóculo**	**t**	**pH_i**	**pH_f**	**Carb.$_i$** (g%)	**Carb.$_f$** (g%)	**Umid. Final** (%)
1	1	2	Industrial.	7	5,5	7,7	2,23	1,22	88
2	1	2	Complexo	7	5,6	7,8	2,05	0,99	87
3	1	3	Industrial.	7	5,7	8,3	2,47	1,41	88
4	1	3	Complexo	7	5,7	7,4	2,85	1,09	88
5	2	2	Industrial.	7	5,5	7,7	2,26	1,16	90
6	2	2	Complexo	7	5,6	8,1	1,95	0,97	89
7	2	3	Industrial.	7	5,8	8,4	2,14	1,45	88
8	2	3	Complexo	7	5,8	8,3	2,49	1,43	87
9	1	2	Industrial.	9	5,5	7,2	2,23	1,28	88
10	1	2	Complexo	9	5,6	7,6	2,05	0,93	86
11	1	3	Industrial.	9	5,7	7,9	2,47	1,36	88
12	1	3	Complexo	9	5,7	7,0	2,85	0,93	88
13	2	2	Industrial.	9	5,5	8,0	2,26	0,84	80
14	2	2	Complexo	9	5,6	8,1	1,95	0,87	89
15	2	3	Industrial.	9	5,8	8,1	2,14	1,07	88
16	2	3	Complexo	9	5,8	8,3	2,49	0,83	87

OBS: Reator: 1=Frasco Erlenmeyer,2=Saco plástico; t= tempo de incubação (dias);
Carb.=Carboidratos totais; *i*= inicial;*f* =final

Os resultados analisados permitiram a redução o tempo de incubação de nove para sete dias, bem como a utilização de saco plástico autoclavável como reator, e também confirmaram os dados obtidos em experimentos anteriores:

a) 2,0% como concentração ideal de melaço de soja (~75ºBrix) na composição do substrato (menor concentração que propicia uma alta produtividade);
b) o meio de cultivo do inóculo (melaço de soja 4%, peptona de caseína 4%) pode substituir o meio industrializado (TSB);
c) o processo não necessita de aeração.

A primeira cinética de esporulação foi realizada utilizando o frasco Erlenmeyer como reator, TSB como meio de cultivo do inóculo e o bagaço de cana Lote 01/07 (0,4 g% de carboidratos totais em massa úmida) como suporte. Os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 73 e FIGURAS 79 e 80.

TABELA 73 - 1ª CINÉTICA DE ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus:* BIOMASSA TOTAL;ESPOROS; CÉLULAS VEGETATIVAS E CARBOIDRATOS

Tempo Incubação (horas)	**Biomassa Total** (UFC.g^{-1})	**Esporos** (UFC.g^{-1})	**Células Vegetativas** (UFC.g^{-1})	**Carboidratos Totais** (g%)
0	1,3 x 10^{7}	0	1,3 x 10^{7}	1,70
24	1,2 x 10^{10}	4,0 x 10^{3}	1,2 x 10^{10}	1,30
72	7,1 x 10^{9}	4,8 x 10^{7}	7,0 x 10^{9}	0,89
120	4,5 x 10^{9}	7,6 x 10^{8}	3,9 x 10^{9}	0,81
168	4,2 x 10^{9}	2,9 x 10^{9}	2,6 x 10^{9}	0,77
276	3,9 x 10^{9}	3,1 x 10^{9}	8,0 x 10^{8}	0,75

A segunda cinética de esporulação foi realizada utilizando o frasco Erlenmeyer como reator, o melaço de soja + peptona como meio de cultivo do inóculo e o bagaço de cana Lote 02/07 (0,7 g% de carboidratos totais em massa úmida) como suporte. Os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 74 e FIGURAS 79 e 80.

TABELA 74 - 2ª CINÉTICA DE ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus:* UMIDADE, ATIVIDADE DE ÁGUA, BIOMASSA TOTAL, ESPOROS, CÉLULAS VEGETATIVAS E CARBOIDRATOS

Tempo Incubação (horas)	**Umidade** (%)	**Aw (20-22ºC)**	**pH**	**Celulas Veg.** (UFC.g^{-1})	**Esporos** (UFC.g^{-1})	**Biomassa Total** (UFC.g^{-1})	**Carb. Totais** (g%)
0	86	0,971	6,0	8,4 x 10^{6}	0	8,4 x 10^{6}	2,13
24	87	0,965	6,1	8,6 x 10^{9}	8,8 x 10^{3}	8,6 x 10^{9}	1,96
72	86	0,964	7,2	1,6 x 10^{9}	1,0 x 10^{9}	2,6 x 10^{9}	1,53
120	86	0,969	7,4	9,0 x 10^{8}	1,0 x 10^{9}	1,9 x 10^{9}	1,37
168	87	0,966	7,6	3,0 x 10^{8}	3,2 x 10^{9}	3,5 x 10^{9}	1,30
276	86	0,966	7,1	3,0 x 10^{6}	3,8 x 10^{9}	3,8 x 10^{9}	1,30

A terceira cinética de esporulação foi realizada utilizando o saco de polietileno como reator, o melaço de soja + peptona como meio de cultivo do inóculo e o bagaço de cana Lote 02/07 (0,7 g% de carboidratos totais em massa úmida) como suporte. Os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 75 e FIGURAS 79 e 80.

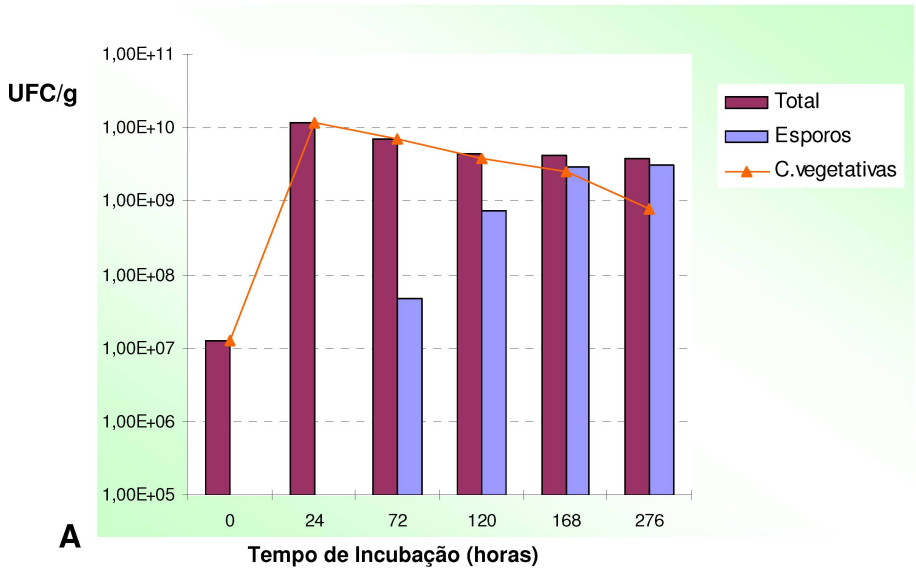
TABELA 75 - 3ª CINÉTICA DE ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus*: UMIDADE, ATIVIDADE DE ÁGUA, BIOMASSA TOTAL, ESPOROS, CÉLULAS VEGETATIVAS E CARBOIDRATOS

Tempo Incubação (horas)	**Umidade** (%)	**Aw** (20 a 22ºC)	**pH**	**Celulas Veg.** ($UFC.g^{-1}$)	**Esporos** ($UFC.g^{-1}$)	**Biomassa Total** ($UFC.g^{-1}$)	**Carb. Totais** (g%)
0	89	0,968	5,9	$8,4 \times 10^{6}$	x	$8,4 \times 10^{6}$	2,17
24	88	0,979	6,0	$8,4 \times 10^{10}$	$6,6 \times 10^{4}$	$8,4 \times 10^{10}$	1,92
72	88	0,968	6,5	$9,0 \times 10^{8}$	$1,2 \times 10^{9}$	$2,1 \times 10^{9}$	1,29
120	89	0,969	7,2	$8,0 \times 10^{8}$	$4,0 \times 10^{9}$	$4,8 \times 10^{9}$	1,29
168	89	0,967	7,3	$2,0 \times 10^{4}$	$2,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	1,24
276	89	0,967	7,1	$5,6 \times 10^{3}$	$4,7 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^{10}$	1,28

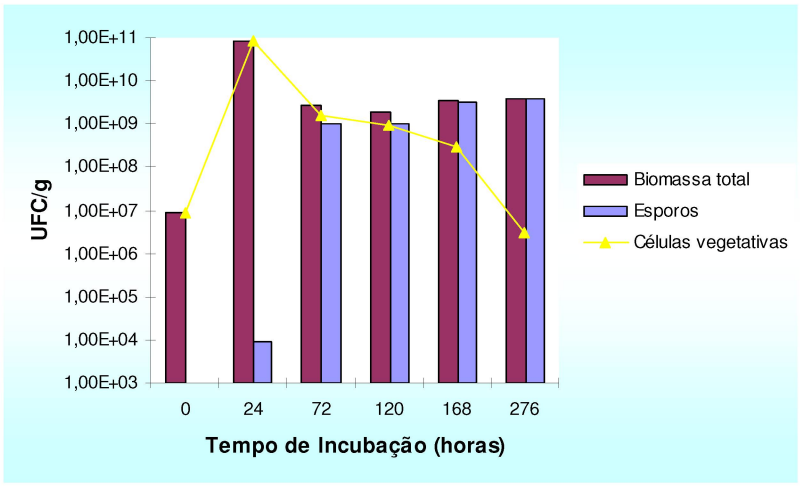
Os resultados das três cinéticas mostraram um aumento da biomassa total de três a quatro log (mil a dez mil vezes) após 24 horas de incubação, que corresponde à fase exponencial de crescimento das células vegetativas. A esporulação teve início, aproximadamente, após 24 horas de incubação e ficou estabilizada após 168 horas (7 dias). O aumento observado na produção de esporos entre o sétimo e o nono dia de incubação (276 horas) foi inferior a um log, confirmando os dados obtidos anteriormente e possibilitando a redução do tempo de incubação em mais dois dias sem comprometimento da produtividade do processo.

O consumo total de carboidratos foi entre 0,83g% a 0,95 g%. Observamos que a esporulação teve início ainda quando havia grande oferta de carboidratos, indicando que, neste caso, a falta de fonte de carbono não foi o fator indutor da esporulação.

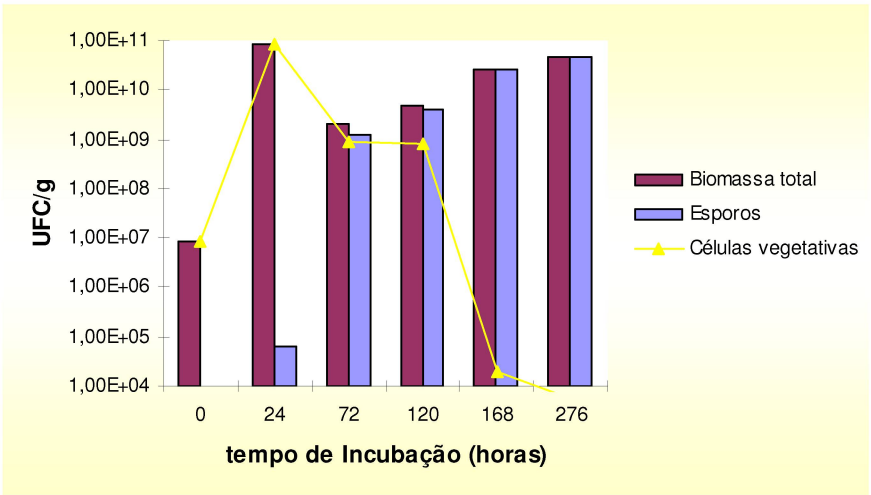
Foi observado um aumento no pH até o sétimo dia de incubação (entre 1,4 e 1,6), seguido de um leve decréscimo entre o sétimo e o nono dia (0,2 a 0,5). Warriner e Waites (1975) também observaram um acréscimo no pH durante a esporulação do do *Bacillus subtilis* em ágar , atribuindo-o à reabsorção dos ácidos formados para a produção de novas proteínas.



A

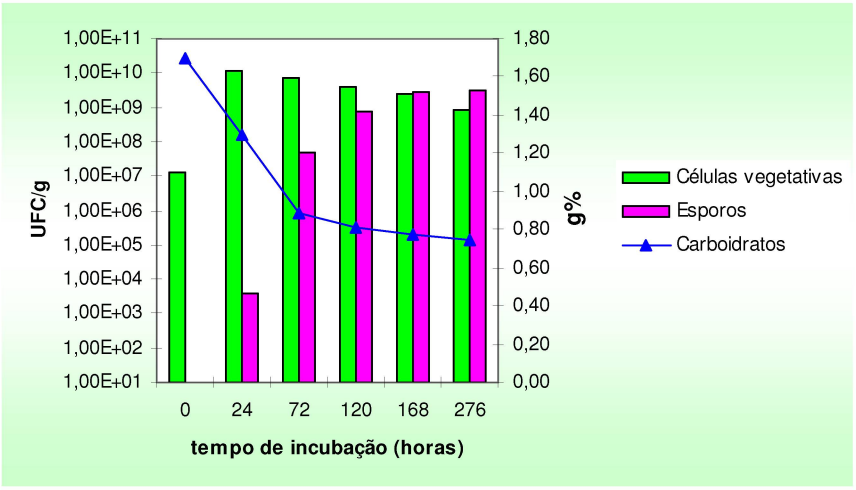


B

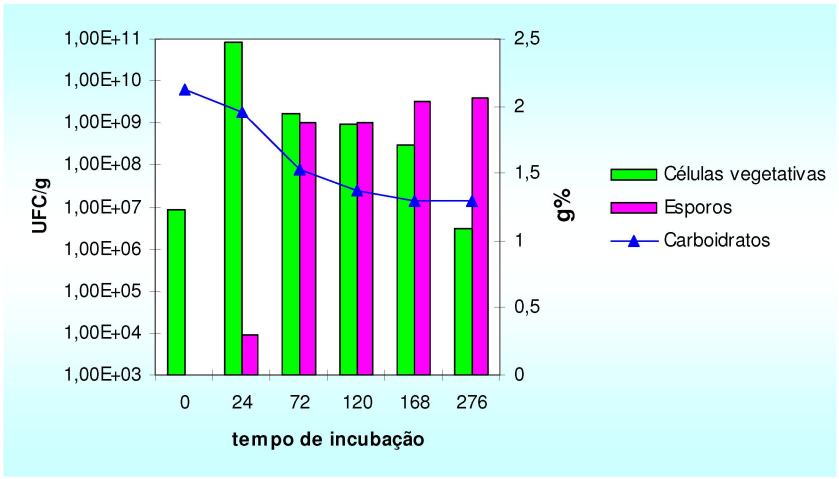


C

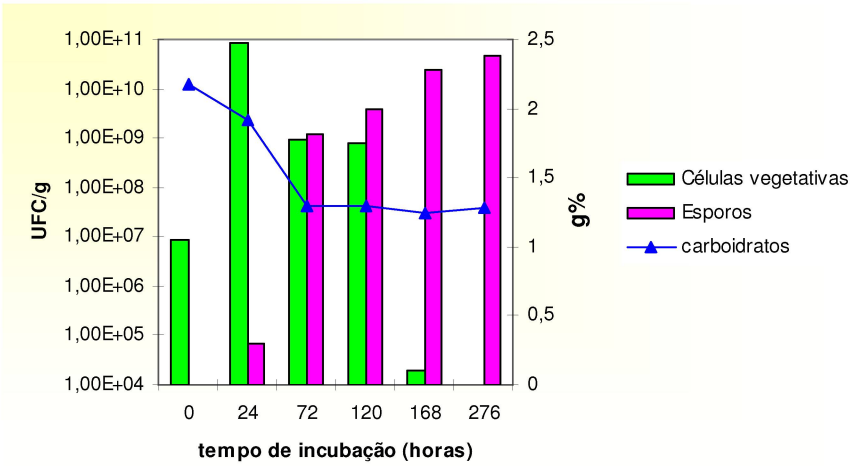
FIGURA 79 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* : (A) EM FRASCO ERLENMEYER COM INÓCULO EM TSB; (B) EM FRASCO ERLENMEYER COM INÓCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA;(C) EM SACO DE POLIETILENO COM INÓCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA



A



B



C

FIGURA 80 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus* X CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS: (A) EM FRASCO ERLENMEYER COM INÓCULO EM TSB; (B) EM FRASCO ERLENMEYER COM INÓCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA;(C) EM SACO DE POLIETILENO COM INÓCULO EM MELAÇO DE SOJA E PEPTONA

A diferença entre a umidade calculada (91%) e a obtida após a inoculação foi entre 3,0% e 5,0%, possivelmente causada pela perda de água durante o processo de esterilização do substrato. A umidade foi mantida durante todo o tempo de incubação do processo de esporulação, tanto em frasco Erlenmeyer quanto em saco plástico.

Na esporulação em saco plástico foi observada a presença quase que exclusivamente de esporos no final do processo, que pode ser justificada por um maior índice de esporulação ou pela ausência, ou redução, da germinação parcial dos esporos produzidos. Porém este fator não propiciou diferença significativa no número total de esporos produzidos, em relação ao processo executado em frasco.

A velocidade de formação da biomassa total (r_X), velocidade de formação de esporos (r_P), velocidade de formação de células vegetativas (r_C) e da velocidade de consumo de carboidratos (r_S), calculadas com a média dos valores obtidos das três cinéticas, está demonstrada na TABELA 76 .

TABELA 76 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus:* VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL (r_X); VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DE ESPOROS (r_P); VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DE CÉLULAS VEGETATIVAS (r_C) E DA VELOCIDADE DE CONSUMO DE CARBOIDRATOS (r_S)

Tempo de Incubação (horas)	r_X (UFC.g^{-1}.h^{-1})	r_P (UFC.g^{-1}.h^{-1})	r_C (UFC.g^{-1}.h^{-1})	r_S (mg%.g^{-1}.h^{-1})
24	2,0 x 10 ^{9}	5,0 x 10 ^{2}	1,3 x 10 ^{9}	11,4
72	- 6,3 x 10 ^{8}	7,9 x 10 ^{6}	- 6,3 x 10 ^{8}	6,8
120	-2,5 x 10 ^{2}	3,2 x 10 ^{7}	- 5,0 x 10 ^{7}	6,6
168	1,3 x 10^{3}	1,0 x 10 ^{8}	-1,6 x 10 ^{7}	2,8
276	8,0 x 10 ^{2}	2,5 x 10 ^{7}	-4,0 x 10 ^{5}	1,7

A plotagem conjunta destes dados está demonstrada na FIGURA 81, onde podemos observar uma alta velocidade de formação de células vegetativas nas primeiras 24 horas de incubação, seguida de uma queda até 72 horas, quando ocorre a maior taxa de esporulação, e depois de um pequeno crescimento, que pode ser justificado pela germinação e multiplicação de pequena parte dos esporos. A taxa de esporulação é crescente nas primeiras 72 horas e depois se mantém praticamente constante.

Nas primeiras 72 horas de incubação a taxa de formação da biomassa acompanha a de formação das células vegetativas, voltando a aumentar devido à

reprodução das células que não esporularam e/ou à germinação parcial dos esporos formados.

A taxa de consumo de carboidratos também acompanha a de formação das células vegetativas nas primeiras 24 horas de cultivo e vai sofrendo redução gradativa durante o processo.

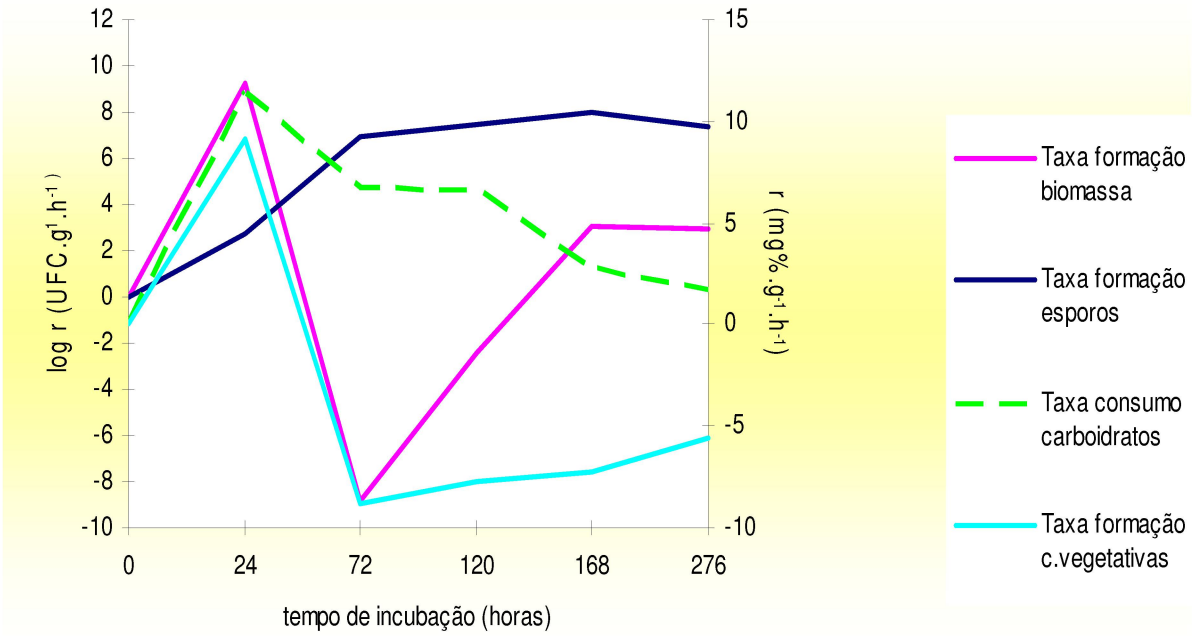


FIGURA 81 - CINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DO *Bacillus atrophaeus,* FORMAÇÃO DE: BIOMASSA; ESPOROS; CÉLULAS VEGETATIVAS E CONSUMO DE CARBOIDRATOS

A FES otimizada, independentemente do reator utilizado, formou esporos que, quando germinados em meio gelosado (ágar de soja tripticaseína), apresentaram colônias com características morfológicas diferentes das dos esporos produzidos em ágar como suporte (FIGURA 82).

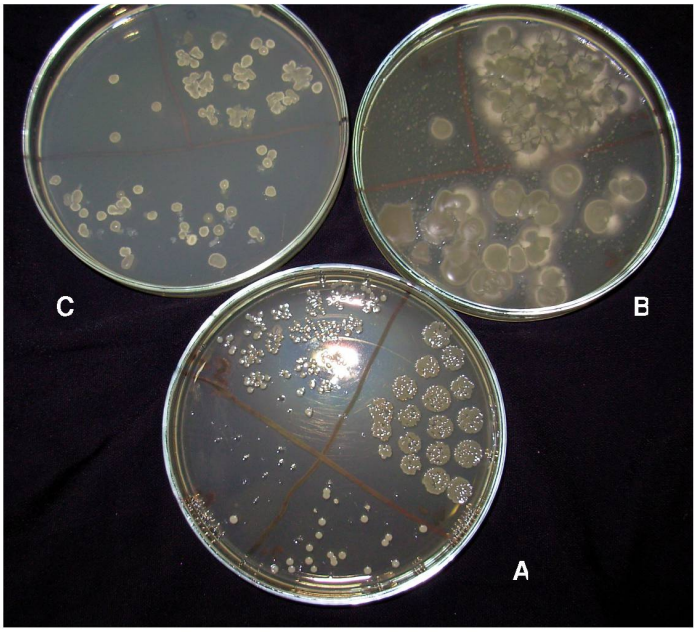


FIGURA 82- COLÔNIAS DO *Bacillus atrophaeus* EM TSA: (A) INOCULADO COM ESPOROS PRODUZIDOS EM ÁGAR DE ESPORULAÇÃO; (B) INOCULADO COM ESPOROS PRODUZIDOS POR FES; (C) EM TSA ADICIONADO DE MAIS 2% DE ÁGAR BACTERIOLÓGICO E INOCULADO COM ESPOROS PRODUZIDOS POR FES

FONTE: O AUTOR (2007)

As colônias da cepa padrão produzidas em ágar para esporulação (PINTO;SAITO,1992) quando cultivada em TSA apresentaram-se menores e bem delimitadas, enquanto que as que foram produzidas por FES apresentaram-se mucóides, grandes e se sobrepuseram em menos de 24 horas, dificultando a sua enumeração, a qual só foi possível aumentando-se a concentração de ágar do TSA de 2% para 4% e reduzindo o tempo de leitura para 18 horas.

Branda *et al.* (2001) descreveram a formação destas colônias em cepas selvagens do *Bacillus subtilis* (FIGURA 83), e associaram a sua morfologia à produção de surfactinas e exopolissacarídeos. Também relacionaram estas características ao uso de uma via metabólica que adicionalmente propicia o crescimento em comunidades estruturadas, denominadas biofilmes, e à formação de esporos através de estruturas aéreas chamadas corpos de frutificação.

A observação microscópica de células das colônias obtidas por cultivo em FES, coradas pelo Método de Gram, mostrou a formação de cadeias, enquanto que as colônias provenientes de esporos cultivados em ágar para esporulação (PINTO;SAITO,1992) apresentam células isoladas sugerindo o crescimento em biofilme (FIGURA 83).

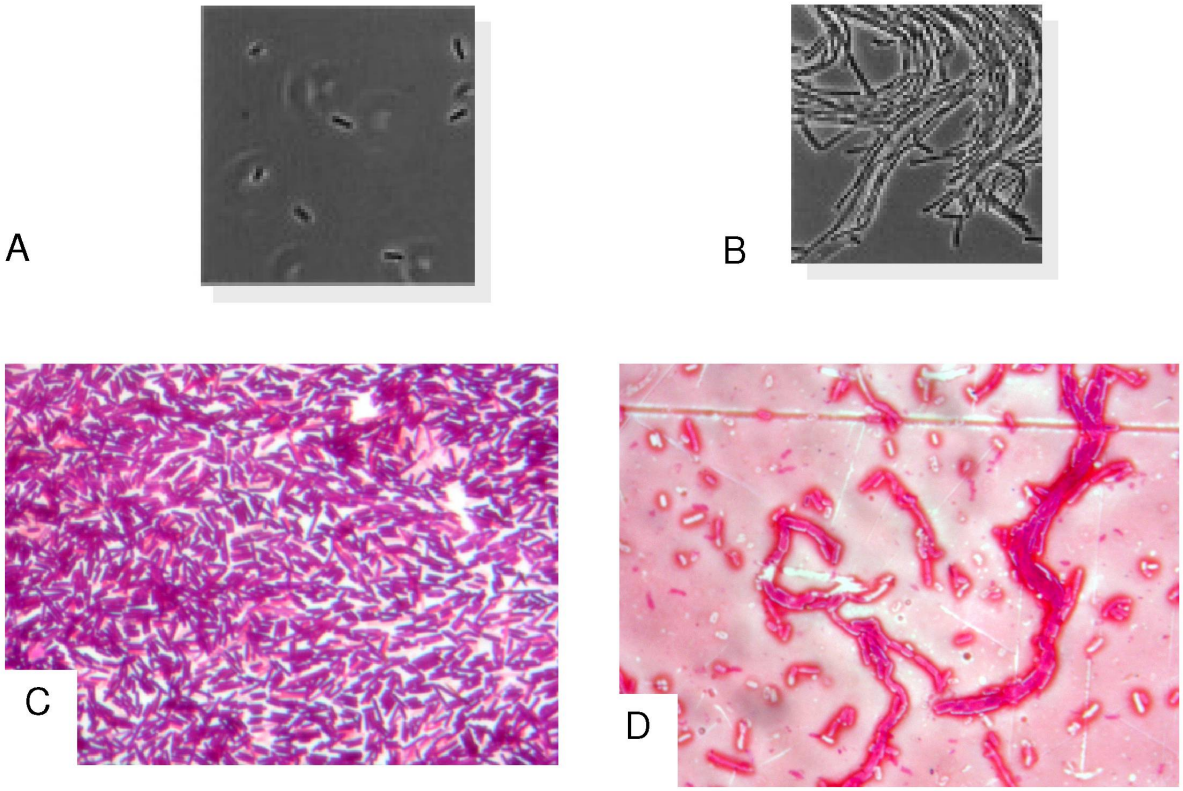
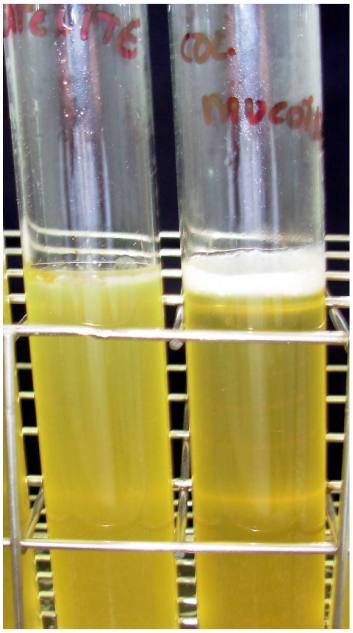


FIGURA 83 - OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE CÉLULAS DIFERENTES COLÔNIAS DO: *Bacillus subtilis* (A) CÉLULAS ISOLADAS; (B) CÉLULAS EM CADEIA; *Bacillus atrophaeus* (C) CÉLULAS ISOLADAS; (D) CÉLULAS EM CADEIA

FONTES: Fotos A e B :BRANDA *et al.* (2005); fotos C e D:O AUTOR (2007)

Foi realizado um cultivo destas colônias em meio líquido (TSB) por até 72 horas. A observação do tipo de crescimento confirmou a capacidade destas células de germinarem e se reproduzirem na forma de biofilme, através da formação de uma película espessa na superfície e da formação de esporos em 24 horas de cultivo, confirmada pela microscopia do esfregaço da película corado pelo Gram. A cepa controle cultivada em paralelo, sob as mesmas condições, apresentou a formação de uma película fina, apresentando apenas células vegetativas (FIGURA 84).



A B

FIGURA 84 - CULTIVOS DE 72 HORAS DO *Bacillus atrophaeus* EM TSB INOCULADO COM SUSPENSÃO DE ESPOROS PRODUZIDOS: (A) EM ÁGAR; (B) POR FES

FONTE: O AUTOR (2007)

O observado foi similar ao citado por Branda *et al.*(2001), que relataram o início da formação da película em 24 horas de cultivo da cepa selvagem do *Bacillus subtilis* em meio líquido, seguida de redução do crescimento na fase líquida e aumento substancial da película. Após 60 horas, as células da película, na forma de cadeias começaram a esporular, enquanto que na parte líquida inferior do meio não foi observada a presença de esporos.

A formação de biofilmes e a descrição dos genes que regulam esta via metabólica, também foi descrita por Hamon e Lazazzera (2001), Hamon *et al* . (2004), Branda *et al.*(2004) e Kearns *et al.*(2005) e a produção de surfactantinas pelo *Bacillus atrophaeus ATCC 9372*, tendo a farinha de soja como uma das fontes de nutrientes, foi estudada por Neves *et al.*(2007).

Nagel *et al.*(2002) citado por Plomp *et al.(*2005) afirmaram que: "Embora muito pouco seja conhecido sobre a base mecanística das diferenças observadas entre a FES e a fermentação submersa (FSM), é sabido que a expressão gênica na FES pode ser diferente daquela em FSm*".*

Uma nova categoria de FES foi proposta por Gutierrez-Correa e Villena (2003): fermentação pela adesão à superfície ou fermentação por biofilme. Esta categoria foi proposta com a aplicação do conceito de biofilme (comunidade de

microrganismos aderidas a superfícies) à fermentação em estado sólido. A adesão e subseqüente diferenciação da expressão gênica, gerando diferentes fenótipos dos observados em microrganismos não aderidos foram citadas como características deste tipo de fermentação.

Estudos complementares são sugeridos para melhor caracterização desta alteração fenotípica observada nas colônias provenientes de esporos produzidos por FES e para melhor avaliação da sua capacidade de produção de surfactinas (proteínas com potencial aplicação em boirremediação: tratamento de substâncias orgânicas e recuperação de óleos).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita pela descrição, exploração e comparação dos dados por análise de variâncias e comparação entre as médias , utilizando o programa SGWIN (Statgraphics plus 5.0 for Windows version 5.0, Statistical Graphics Co., 2000).

O planejamento fatorial experimental e os gráficos com a análise estatística dos resultados foram feitos através do uso do programa Statistic 5.0 (Statsof Inc. 1984).

3.8 DIMENSIONAMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS

Dimensionamento da matéria prima necessária para a produção de esporos para a confecção de 200.000 unidades do indicador biológico-calor seco (demanda projetada para fornecimento aos serviços públicos do Estado do Paraná por 1 ano).

3.8.1 FES

a) Suporte: uma unidade do IB contém aproximadamente 5,0 x 10^6 esporos (10 µL de uma suspensão de esporos com 5,0 x 10^8 UFC/mL). 5,0 g de bagaço de cana (massa seca) fornecem cerca de 50 mL de uma suspensão de esporos com aproximadamente 5,0 x 10^9 UFC/mL, ou 500 mL de uma suspensão de esporos com 5,0 x 10^8 UFC/mL. O volume inoculado no papelote é 10µL, assim sendo 500mL da suspensão produzem 50.000

unidades de IB. Para produzir 200.000 unidades de IB serão utilizadas 2,0g de massa seca, ou cerca de 285,0g de massa úmida (umidade considerada = 93,0%). Correspondendo a um lote de produção (cálculo com base na capacidade instalada do CPPI em 2007);

b) Substrato: considerando a umidade 93,0%, o volume necessário do substrato seria 270 mL. Constituído de: melaço de soja, 5,4 mL (2,0%) e sais para esporulação, K_2HPO_4. H_2O, 0,14 g; $MnSO_4$. H_2O, 0,11 g; $CaCl_2$. $6H_2O$, 0,11g; $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,14g;

c) Inóculo: a taxa do inoculo é 3%, que corresponde a aproximadamente 10 mL, constituído de melaço de soja 0,4 mL (4,0%) e peptona 0,4g (4,0%).

3.8.2 Cultivo em ágar para esporulação (PINTO;SAITO,1992)

a) Suporte: uma unidade do IB contém aproximadamente 5,0 x 10^6 esporos (10 µL de uma suspensão de esporos com 5,0 x 10^8 UFC.mL^{-1}). Cada garrafa de Roux contém 12,0g ágar (massa seca), que fornecem cerca de 50 mL de uma suspensão de esporos com 5,0 x 10^8 UFC.mL^{-1}. O volume inoculado no papelote é 10 µL, assim sendo 50 mL da suspensão produzem 5.000 unidades de IB. Para produzir 200.000 unidades de IB serão utilizadas 480,0g de ágar, ou seja 40 garrafas de Roux, correspondendo a sete lotes de produção (cálculo com base na capacidade instalada do CPPI em 2007).

b) Substrato: considerando a fórmula padrão do meio de esporulação, serão necessários: extrato de levedura,128,0g; caldo nutriente, 64,0g; $MnSO_4.4H_2O$, 0,8 g e $CaCl_2.6H_2O$, 0,8 g;

c) Inóculo: a taxa de inóculo é igual a 4,0%, o que corresponde a 4,0 mL por Garrafa de Roux, ou seja ~200,0 mL de caldo de soja tripiticaseina, que corresponde a 6,0g do produto.

Os dados expostos na TABELA 77 demonstram que com a FES obtêm-se significativa redução no nº de lotes e tempo de produção, que geram redução de custos em controle de qualidade, recursos humanos (horas trabalhadas) e consumo de energia.

TABELA 77- COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS POR FES E POR CULTIVO EM ÁGAR, PARA CONFECÇÃO DE 200.000 UNIDADES DE IB

	FES	Cultivo em Ágar Para Esporulação	Obs:
Matéria prima			Preço por Kg (R$)
Bagaço de cana	20,0g	-	- (1)
Melaço de Soja	6,0mL	-	U$ 10,0 a tonelada
Peptona de Caseína	0,4 g (R$ 0,28)	-	717,00
Agar Bacteriológico	-	480,0g (R$264,0)	549,00
Caldo nutriente	-	64,0g (R$39,1)	611,00
Sulfato de Manganês	0,11g(R$ 0,003)	0,8 g (R$ 0,025)	28,00
Cloreto de Cálcio	0,11g(R$ 0,008)	0,8 g (R$ 0,062)	70,00
Extrato de Levedura	-	128,0g (R$ 46,7)	365,00
Fosfato de Potássio	0,14g (R$ 0,004)	-	30,0
Caldo de Soja Tripticaseína		6,0g (R$ 1,04)	173,00
Sulfato de Magnésio	0,14g (R$ 0,002)	-	14,0
Água destilada (30 litros de água tratada para cada litro de água destilada)	~280,0 mL X30= 8,4L (R$ 0,16)	~15,5 litros x 30= 465L (R$ 8,62)	3,20 o m^3 da água tratada;1,33kwh p/1 L de água dest.; R$ 0,40 o Kwh
Volume de produção	~300,0g	~16,0 litros	-
Reator	1 saco plástico autoclavavel de 20,0L	06 garrafas de Roux/lote	-
Lotes de produção	1	7	-
Testes de controle de qualidade:			Fonte: TABELA IAL 2008
Contagem de colônias	2 (R$ 60,0)	14(R$ 420,0)	
Viabilidade	1(R$ 30,0)	7(R$ 210,0)	
Resistência Térmica	1 (R$ 150,0)	7(R$1.050,0)	Termorresistência:Estimado
Controle ambiental	2 (R$ 60,0)	14 (R$ 420,0)	
Tempo de produção	20 dias	7 meses	-
Tempo de Incubação	7dias	14 dias	NC
Custo direto estimado	**R$ 300,46**	**R$ 2.459,54**	

OBS:CUSTO PARCIAL,NÃO FOI CALCULADO AS PERDAS DO PROCESSO; HORAS TRABALHADAS, EMBALAGEM E CUSTOS INDIRETOS; (1) CUSTO DE SECAGEM, MOAGEM E TAMISAÇÃO; NC: NÃO CALCULADO; MÉDIA DE PREÇOS DE JANEIRO DE 2008

3.9 CONCLUSÃO

Quanto aos estudos para o **cultivo e quantificação em ágar como suporte** pode-se concluir que:

O melaço de soja (~75ºBrix a 20ºC), na concentração de 2,0%, sem adição de fontes complementares de carbono e nitrogênio, foi o substrato que forneceu os melhores resultados na produção (superior a 10^9 UFC. mL^{-1}) e na quantificação de esporos do *Bacillus atrophaeus*.

Os esporos produzidos em ágar com melaço de soja e sais estimuladores

da esporulação apresentaram resistência térmica de D= 4,5min e 5,9 min e U_{sk}= 29,2min e 32,1 min, superiores aos padrões mínimos preconizados pela USP (D= 3,0 min e U_{sk}= 14 min), indicando que o melaço de soja pode ser utilizado como substituto dos substratos industrializados, com menor custo, tanto para esporulação quanto para a quantificação dos esporos termorresistentes do *Bacillus atrophaeus*.

Entre os substratos testados, o melaço de soja 2,0% foi o que apresentou maior potencialidade para ser testado para uso como substrato em outras metodologias de cultivo, como fermentação submersa e fermentação em estado sólido.

Os estudos para a **avaliação de métodos e meios de cultivo** permitiram concluir que:

O método de fermentação submersa, com e sem agitação, utilizando diferentes substratos, não proporcionou uma produção de esporos similar ou superior à obtida com o meio de referência (ágar).

A técnica de FES, utilizando o bagaço de cana como suporte (partículas inferiores a 2,0mm), adicionado de substratos industrializados ou do melaço de soja 2,0% com sais estimuladores da esporulação, forneceu uma contagem de esporos superior a 2,1 x 10^8 UFC.g^{-1} de massa seca, após nove dias de incubação. Podendo substituir o método tradicional da esporulação em ágar, que apresentou uma produção de esporos de 9,6 x 10^7UFC. g^{-1} de ágar, em 14 dias de incubação.

Estes resultados permitiram reduzir o tempo de incubação para nove dias, cinco dias a menos em relação à fermentação tradicional (que utiliza o ágar como suporte) agregando economia de tempo energia.

Os resultados dos estudos da **produção de esporos por FES**, nos levam à conclusão que:

A taxa de inóculo (entre 3,0% a 9,0% em relação ao volume do substrato) e o tempo de incubação (entre nove dias a 15 dias) não apresentaram interferência significativa no processo. Ficando estabelecido, nesta etapa, 3,0% como taxa de inóculo (correspondendo a 10^7 UFC.g^{-1} de matéria seca) e nove dias como tempo de incubação. As demais condições ótimas de cultivo foram estabelecidas em: 1,0 mm como tamanho médio da partícula do suporte; 93% (ou a capacidade máxima de

absorção do suporte à quente) como umidade inicial; 8,0 como pH inicial e a água como diluente do substrato, não havendo necessidade de tamponamento. As fontes de cálcio avaliadas não afetaram quantitativamente a produção de esporos.

A produção de esporos obtida a partir do processo fermentativo otimizado, foi 10^{10} UFC.g^{-1} de massa seca, resultando num acréscimo de até três log (mil vezes) em relação à produção em ágar e um log (dez vezes) em relação aos resultados iniciais.

A análise da resistência térmica dos esporos produzidos forneceu um $D_{160ºC}$ = 5,2 ± 0,2 min, superior ao preconizado pela USP (D= 3,0 min), indicando que os parâmetros otimizados aumentaram a produtividade do processo sem interferir na qualidade dos esporos formados.

Os resultados dos estudos para o **desenvolvimento e a otimização do meio para produção do inóculo**, nos levam à conclusão que:

O melaço de soja (~75ºBrix a 20ºC) e a vinhaça de soja (~11ºBrix a 20ºC) demonstraram promover o crescimento do *Bacillus atrophaeus.* A adição do suplemento peptona (1,8%) ao melaço de soja permitiu um aumento da biomassa em aproximadamente um log (dez vezes). Os resultados sugeriram que as concentrações mais adequadas para o desenvolvimento da biomassa foram melaço de soja entre 1,0% a 4,0% e peptona de caseína entre 4,0% a 6,0%. A formulação que proporcionou o maior rendimento, em relação meio referência, foi melaço de soja 4,0% e peptona de caseína 4,0%, apresentando, no conjunto dos resultados, uma formação de biomassa entre 8,4 x 10^{7} UFC.mL^{-1} a 2,1 x 10^{10} UFC.mL^{-1} , em 18 horas de cultivo, enquanto o meio referência apresentou entre 1,1 x 10^{8} UFC.mL^{-1} a 2,4 x 10^{8} UFC.mL^{-1}, no mesmo tempo de cultivo.

O conjunto dos resultados também permitiu eliminar o segundo repique do processo de produção do inóculo, levando a uma redução de tempo, energia e consumo de meio de cultivo.

A análise da resistência térmica dos esporos do *Bacillus atrophaeus* produzidos por FES a partir do meio para o inóculo otimizado, forneceu $D_{160ºC}$ = 5,2 ± 0,2 min, superior ao preconizado pela USP (D= 3,0 min), indicando que o meio de cultivo otimizado (melaço de soja 4,0% e peptona de caseína 4,0%) não interfere na qualidade dos esporos formados.

Os resultados dos estudos da **influência da aeração, do tipo de reator, do meio do inóculo e da concentração do melaço de soja na cinética** da **esporulaçã**o nos permitem concluir que:

Na FES utilizando colunas como reator, a maior produção de esporos observada foi de 3,7 x 10^{10} UFC.g^{-1} de massa seca, que foi obtida na coluna sem aeração e com umidade de 88%. A análise estatística dos resultados permitiram concluir que a aeração não exerceu efeito positivo na produção de esporos .

Os cultivos preparados com 90% de umidade perderam as características da FES, formando água livre durante a incubação, concluindo que esta taxa de umidade foi muito elevada para FES utilizando reator em coluna.

No cultivo paralelo, em frasco Erlenmeyer como reator, a maior produção de esporos foi 2,0 x 10^{10} UFC. g^{-1} de massa seca, na umidade de 91%, não apresentando diferença significativa em relação ao resultado obtido em coluna.

A avaliação comparativa do cultivo em frasco Erlenmeyer e em saco autoclavável de polietileno, com novas variações dos parâmetros de concentração melaço de soja na composição do substrato, meio de cultivo do inóculo e tempo de incubação, confirmaram os dados obtidos em experimentos anteriores: 2,0% como concentração ideal de melaço de soja na composição do substrato (menor concentração que propicia uma alta produtividade) e que o meio de cultivo do inoculo testado (melaço de soja 4,0%, peptona de caseína 4,0%) pode substituir o meio industrializado (TSB). Os dados obtidos também indicaram a possibilidade da redução do tempo de incubação de nove dias para sete dias, posteriormente confirmada pela cinética da esporulação, propiciando uma redução de 50% do tempo de incubação em relação ao cultivo em ágar.

A observação da ausência de efeito positivo do tipo de reator no processo permite utilização o saco plástico autoclavável como reator, com as seguintes vantagens:

- material descartável de baixo custo;
- não está sujeito à quebra durante o processo;
- permite trabalhar com um maior volume de suporte/substrato;
- facilita a retirada de amostras para o acompanhamento do processo;
- permite melhor homogeneização do inóculo.

A cinética da esporulação demonstrou uma maior velocidade de formação de células vegetativas nas primeiras 24 horas, seguida de uma redução em 72 horas, quando ocorre a maior taxa de esporulação. A velocidade de esporulação é crescente nas primeiras 72 horas e depois se mantém praticamente constante.

A taxa de consumo de carboidratos acompanha a taxa de formação das células vegetativas nas primeiras 24 horas de cultivo e vai sofrendo redução gradativa. O consumo total de carboidratos foi entre 0,83g% a 0,95 g%. A falta de fonte de carbono não foi confirmada como fator indutor da esporulação, pois a esporulação tem início quando ainda há grande oferta de carboidratos.

Analisando o conjunto dos resultados obtidos em todos os experimentos, pode-se concluir que a FES utilizando bagaço de cana e melaço de soja como suporte e substrato, respectivamente, e saco plástico como reator, permitiu a produção de esporos termorresistentes para a produção de IB para o calor seco, com as seguintes vantagens:

- Redução do tempo de incubação;
- Uso de matéria-prima de baixo custo;
- Redução do volume de trabalho, do número de lotes e do tempo de produção;
- Ausência de investimentos para aquisição de reator e de seus respectivos custos de manutenção, limpeza e esterilização, bem como dos de validação destes processos (exigida pelas Boas Práticas de Fabricação).

Estas vantagens têm conseqüência direta nos custos do processo de esporulação, refletindo na redução dos custos do produto final.

A aplicação industrial desta tecnologia, aliada a outras complementares a serem desenvolvidas, como o uso de subprodutos agroindustriais na composição do meio de recuperação e novos métodos para a conservação e a quantificação dos esporos, possibilitará ainda maior redução nos custos de produção e permitirá ampliação da sua escala para atendimento das demandas do setor público e privado de saúde em âmbito estadual e nacional.

4.0 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

4.1 RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SELLA S. R .B. R.; DLUGOKENSKI, R.; HOLLVEG, R.; VANDENBERGUE, L. P. S. ; MEDEIROS, A. P.; SOCCOL, C. R. Produção e Quantificação de Esporos Termorresistentes do *Bacillus atrophaeus* em Agar enriquecido com Subprodutos e Resíduos Agroindustriais. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia,** 2007. Brasília. GRAFFITI, 2007. CD. p. 1-1. *Classificação do evento:* Nacional; Brasil/ Português; *Meio de divulgação:* Magnético

SELLA S.R. B.R; DLUGOKENSKI, R.; FURIE,C.; VANDENBERGUE, L. P. S.; MEDEIROS, A. P.; SOCCOL, C. R. Modificação da metodologia oficial (USP) para contagem total de esporos viáveis em Indicadores Biológicos para Esterilização. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia,** 2007. Brasília: GRAFFITI, 2007. v. CD. p. 1-1. *Classificação do evento:* Nacional; Brasil/ Português; *Meio de divulgação:* Magnético.

LACERDA, L.G.; AZEVEDO, J.A.M.; MARANHO, L.T.; FONTOURA,P.S.G..; SELLA, S.R.B.R.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Caracterização Termoanalítica de Resíduos da Agroindústria : Bagaço de Cana-de-açúcar. In: **VII Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos** (SLACA), 2007, Campinas. Ligando a agricultura a saúde. Unicamp : Editora da Unicamp, 20074.1

SELLA S.R.B.R.; VANDENBERGUE, L.P.S.; MEDEIROS, A.P.; PANDEY,A.; SOCCOL, C. R. Enhanced Production of *Bacillus atrophaeus'* Spores by Solid-State Fermentation using Agro-industrial By-products. In: **International Conference on New Horizons in Biotechnology** 2007, Trivandrum, India.

SELLA S.R. B.R; DLUGOKENSKI, R.; GUIZELINI ,B.P.,VANDENBERGUE, L. P. S. ; MEDEIROS, A. P. ; PANDEY,A;SOCCOL, C. R. Selection and Optimization of *Bacillus atrophaeus* Inoculum Medium and its Effect on Spore Yield and Thermal Resistance. In: **International Conference on New Horizons in Biotechnology** 2007, Trivandrum, India.

SELLA S. R .B. R.; VANDENBERGUE, L. P. S.; MEDEIROS, A. P.; SOCCOL, C. R. Substituição de Meios de Cultura Sintéticos por Subprodutos Agroindustriais da Soja e da Cana-de-açúcar na Produção de Indicador Biológico para Esterilização pelo Calor Seco. In: Fórum Internacional do Complexo Agroindustrial Orgânico e Biotecnologias da Orgânica 2008, Curitiba. **Anais do Fórum Internacional do Complexo Agroindustrial Orgânico e Biotecnologias da Orgânica,** 2008. Curitiba. TECART, 2008. CD. p. 1-1. *Classificação do evento:* Nacional; Brasil/ Português; *Meio de divulgação:* Magnético.ISBN 9788560299027

4.2 TRABALHOS COMPLETOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

SELLA S.R. B.R ; GUIZELINI ,B.P.,VANDENBERGUE, L. P. S. ; MEDEIROS, A. P. ; SOCCOL, C. R. Utilização de Subprodutos e Resíduos Agroindustriais da Soja para produção de Biomassa do *Bacillus atrophaeus.* In: Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007,Curitiba.**Anais IX ERSCTA**.Curitiba: TECART,2007.v.CD. p.1066-1071.*Classificação do evento:* Nacional; Brasil/ Português; *Meio de divulgação:* Magnético; ISBN :978-85-60299-01-0

SELLA S.R. B.R ; VANDENBERGUE, L. P. S. ; MEDEIROS, A. P. ; SOCCOL, C. R. . *Bacillus atrophaeus* Inoculum Production using Agroindustrial Bioproducts and Residues. In: XVI Simpósio Nacional De Bioprocessos - SINAFERM 2007, 2007, Curitiba. **Anais SINAFERM 2007**. Curitiba: GRAFFITI, 2007. v. CD. p. 1-1. *Classificação do evento:* Nacional; Brasil/ Inglês; *Meio de divulgação:* Magnético; ISSN/ISBN: 9788560328079.

SELLA S.R. B.R ; VANDENBERGUE, L. P. S. ; MEDEIROS, A. P. ; SOCCOL, C. R. . Evaluation of Different Techniques and Culture Medium for the *Bacillus atrophaeus* Spores production . In: XVI Simpósio Nacional De Bioprocessos - SINAFERM 2007, 2007, Curitiba. **Anais SINAFERM 2007**. Curitiba: GRAFFITI, 2007. v. CD. p. 1-1. *Classificação do evento:* Nacional; Brasil/ Inglês; *Meio de divulgação:* Magnético; ISSN/ISBN: 9788560328079. Obs: Apresentação oral

4.3 TRABALHOS PUBLICADOS

SELLA S.R. B.R ; VANDENBERGUE, L. P. S. ; MEDEIROS, A. P. ; SOCCOL, C. R. . Evaluation of Different Techniques and Culture Medium for the *Bacillus atrophaeus* Spores production. Applied Biochemistry and Biotechnology,em junho de 2008. DOI 10.1007/S12010-008-8206-3

4.4 PROPRIEDADE INTELECTUAL

Patente: PROCESSO DE PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* UTILIZANDO RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DA SOJA E DA CANA-DEAÇÚCAR,número de **protocolo de depósito no INPI nº 015080001627 de 05/05/2008**.

4.5 OUTROS

Pesquisa integrante do Termo de Convênio 19/07, FUNDO PARANÁ/SETI: DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE INDICADORES BIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL. SESA/UFPR/ TECPAR.Valor financiado: R$ 400.000,00.

REFERÊNCIAS

ABIPTI - Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica. **Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar**. Brasília: ABIPTI, 1999, 474 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington D.C., 2000.

ACOSTA-GÍO, A. E.; PORTUGUEZ, V. H. M.; FARIAS, A. H.; PÉREZ, L. S. Biologic monitoring of dental office sterilizers in México. **American Journal Infect Control**, Mexico City, v. 30, n. 3, p. 153-157, 2003.

ALDERTON, G.; SNELL, N. Chemical States of Bacterial Spores: Dry-Heat Resistance. **Applied Microbiology**, v.17, n. 5, p.745-749, 1969.

ALEXANDRE, F. A.; FARIA, J. F. **Avaliação da Eficiência da Irradiação Ultravioleta na Esterilização de Tampas para a Selagem de Garrafas Plásticas**.Trabalho apresentado no XI Congresso Interno de Iniciação Científica.Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, UNICAMP, Campinas, 2003.

ALVARES LEITE, M. A. **Caracterização da conduta dos cirurgiões dentistas de Belo Horizonte frente aos procedimentos de controle de infecção cruzada: uma perspectiva epidemiológica.** Dissertação. (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996. 254p.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - AACC. **Approved methods AACC** , Minessota, 1975.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION - ADA. Infection control recommendations for the dental office and dental laboratory. **Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 5, p. 672-80, 1996.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CIRURGIÕES DENTISTAS - APCD. **Biossegurança uma questão de consciência**. 2000. Disponível em: <http://www.apcd.com.br/dtq. asp?path= DESTAQUES &id=439>. Acesso em: 30 /09/2004.

ARAÚJO, L. M. A.; TEICHERT Fº, R.; ETGES, A.; GOMES, A. P.; TARQUINIO, O. **O conhecimento do cirurgião-dentista sobre o controle de infecção**. Painel. In: 17º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. 2004. Disponível em : <http:// www.odontologia.com.br>. Acesso em: 25 /09/ 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS-ABNT. **NBR ISO 11134** Esterilização de produtos hospitalares - requisitos para validação e controle de rotina - esterilização por calor úmido. São Paulo, 2001.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI. **Dry heat (heated air) sterilizers ANSI/AAMI ST50:2004**. American National Standard, Arlington, 2004.

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. 2002. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/ Projetos% 20Plano%20Sul/ufrgs_relatorio2002.htm. Acesso em: 20/ 10/ 2006.

BABU, K. R.; SATYANARAYANA, T. Alpha Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 305-309, 1995.

BD Biopharmaceutical Production: **Bionutrient Technical Manual**, 2nd ed. Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD, 72 p, 2004.

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.

BEAMAN, T. C.; PANKRATZ, H. S.; GERHARDT, P. Heat Shock Affects Permeability and Resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 10, p .2515-2520, 1988.

BERNLOHR, R. W.; LEITZMANN, C. Control of sporulation. In: **The Bacterial Spore**. Eds Gould,G.W. & Hurst, A., Academic Press, p.183- 213, 1969.

BLAKISTONE, B.; CHYATE, R.; KAUTTEK, D.; CHARBONNEAU, J.; SUIT, K. Efficacy of Ozona Active Against Selected Spore Formers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3, p. 262-267, 1999.

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

BORGES, L. **Biossegurança e Marketing na Odontologia**. Disponível em: <http://www.br.kodack.com/BR?pt?health/V5/news/noticia11.jhtml>.Acesso em: 10/10/ 2004.

BRAND, D. **Fisiologia de Crescimento e de Esporulação de Fungos Nematófagos cultivados em Meio Sólido**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BRANDA, S. S.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E.; BEN-YEHUDA, S.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)**, v. 98, p. 11621-11626, 2001.

BRANDA, S.S.; GONZÁLEZ-PASTOR, J.E.; DERVYN, E.; EHRLICH, D.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Genes involved in the formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology,** v. 186, p. 3970–3979, 2004.

BRASIL. Lei N° 8.078, de 11 de setembro de 1990. **D.O.U. de 12/09/90 – suplemento.** Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e dá outras Providências. Disponível em: < http://planovitalicio.com/lei_8078_90.pdf> . Acesso em: 22 /07/ 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. **Hepatites, AIDS e herpes na prática odontológica**. Brasília, 54 p, 1996.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 210, de 04 de agosto de 2003. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil,** Brasília, DF, 14 ago.de 2003.

BROWN, G. D.; GAZE, J. E. The evaluation of recovery capacity media for heat-treated *Bacillus stearothermophilus* spore strips. **International Journal of Food Microbiology,** v. 7, p. 109-114, 1988.

BURDETT, J. D. I.; KIRKWOOD, T. B. L.; WHALLEY, J. B. Growth Kinetics of Individual *Bacillus subtilis* Cells and Correlation with Nucleoid Extension. **Journal of Bacteriology**, v. 167, p. 219-230, 1986.

BURKE, S. A.; WRIGHT, J. D.; ROBINSON, M. K.; BRONK, B. V.; WARREN, R. L. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2786-2790, 2004.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-State Fermentation System. **Process Biochemistry**, v. 6, p. 2-7, 1980.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: Ed. *e*-papers, 2003.

CAPALBO, D. M .; VALICENTE, F. H.; OLIVEIRA MORAES, I. *et al.* Solid- state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in maize. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 9-10, 2001.

CAPASSO, I. R. V. di F. **Composição de meio de cultura utilizado em um sistema de controle biológico de esterilização por autoclave e forno de Pasteur, sem interferência da temperatura no meio de cultura e sem contato com o meio exterior**. INPI, nºPI 8903571, publicada em 29/01/1991.

CARDOSO, D. R.; GEWEHR, P. M. Monitoração física, química e biológica para estufa e autoclave em consultórios odontológicos. **IFMBE Proceedings**, v. 5, p. 21-24, 2004.

CARDOSO, Débora R. **Rotina de Monitoração Física,Química e Biológica para Estufa e Autoclave em Consultório Odontológico**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Centro Federal de Educações Tecnológicas do Paraná, Curitiba, 2005.

CAYUELA, C.; KENICHI, K.; PARK, Y. S.; IJIMA, S.; KOBAYASHI, T. Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 383-386, 1993.

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.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Guidelines for infection control in dental health-care settings. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 52, n. RR-17, Dec.19, p. 1-68, 2003.

CESARE-VIDAURRE, T.; CAMPOS, E.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Optimización de medio de cultivo para la producción de Biofungicida a partir de *Bacillus Subtilis***.** In: **Anais do VII Mexican Congress of Biotechnology and Bioengineering**, Mexico, 1997.

CHEN, X.; CHEN, S.; SUN, M. ; YU, Z. High yield of poly-γ-glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1872-1879, 2005.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA-CFO. **Código de ética odontológica**. Rio de Janeiro, p. 9, 1992.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA-CFO. **Resolução CFO 186/93.Normas para Instalação de consultório odontológico**. Rio de Janeiro, 1993.

CONTE, M. F.; SMAHA, F.; MELO, N. S. F. O. Avaliação da utilização dos métodos de. Esterilização em ortodontia. **Jornal Brasileiro de Ortodontia e Ortopedia Maxilar,** v. 2, n. 10, p. 25-30, jul-ago,1997.

COOK, A. M.; BROWN, M. R. The relation between heat activation and colony formation for the spores of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 16, p. 725-732, 1964.

COOK, A. M.; GILBERT, R. J. Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Technology**, v. 3, p. 285-293, 1968.

CURRAN, H. R.; EVANS, F. R. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 49, p. 335-346, 1945.

DALMASSO, J. Effective Heat Sterilization in CO_2 Incubators, **Thermo Electron Corporation's Heat Sterilization White Paper**, v. 4, n. 3, 2003. Disponível em: <http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF-11499.pdf> Acesso em: 20 /09/ 2004.

DAWES, I. W.; THORMLEY, J. H. M. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Theorical and experimental studies in continuous culture systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 49-66, 1970.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. de O.; CAPALBO, D. M. S. Fermentação em Estado Sólido. In: Schimidell, W. *et al*. **Biotecnologia Industrial**, Eng Bioquímica, v. 2. São Paulo: Ed Edgard Blücher Ltda, 2001, p. 247-276.

DOELLE, H. W. Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. **Asian Food Journal**, v. 1, p.10-14, 1985.

DURAND, A.; CHEREAU, D. A New Pilot Reactor for Solid-State Fermentation: Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 476-486, 1988.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.113-125, 2003.

EVERAL, P. H.; MORRIS, C. A. Quantitative recovery of spores from thermophilic spores papers. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 423-425, 1978.

FADEL, M.; SABOUR, M. Utilization of Diary Product in the Production of Bioinsecticide. **Journal of Biological Sciences,** v. 2, p. 16-120, 2002.

FAILLE, C., LEBRET, V., GAVINI, F.; MAINGONNAT, J. F. Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores in buffer and poultry meat. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 544-547, 1977.

FAIRHEAD, H.; SETLOW, B.; WAITES, W.; SETLOW, P. Small Acid Soluble Proteins Bound to DNA Protect *Bacillus subtilis* Spores from Being Killed by Freeze-Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2647-2649, 1994.

FANTINATO, V.; ALMEIDA, N. Q.; SHIMIZU, M. T.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C. S. Esterilização. In: __. Manual de esterilização e desinfecção em odontologia. São Paulo: Santos, p. 15-19, 1994.

FEAVERS, I. M.; J. FOULKES, B.; SETLOW, D.; SUN, W.; NICHOLSON, P.; MOIR, A. The regulation of transcription of the *genA* spore germination operon of *Bacillus subtilis.* **Molecular Microbiology**, v. 4, p .275-282, 1990.

FOESTER, J.W. Morphogenesis in bacteria: some aspects of spore formation. **Quarterly Review of Biology**, v. 3, p.102-118,1956.

FOESTER, H. Activation and Germination Characteristics Observed in Endospores of Thermophilic Strains of *Bacillus*. **Archives of Microbiology**, v. 134, p.175-181, 1983.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Premarket notification [5210(k)] for Biological Indicators Intended to Monitor Sterilizers used in Heath Care Facilities**: Draft Guidance for Industry and FDA reviewers. 2001.

FRITZE, D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. **American Phytopathological Society Journal**, v. 94, n. 11, p. 1245-1248, 2004.

FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 51, p. 35-37, 2001.

FULL, T. D.; JUNG, D. O.; MADIGAN, M. T. Production on poly-β-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 377-384, 2006.

GALE, P.; PITCHERS, R.; GRAY, P. The Effect of Drinking Water Treatment on the Spatial Heterogeneity of Micro-Organisms: Implications for Assessment of Treatment Efficiency and Health Risk. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1640-1648, 2002.

GOES, A. P.; SHEPPARD, J. D. Effect of surfactants on α-amylase production in a solid substrate fermentation process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 74, p. 709-712, 1999.

GONZALEZ, I.; LÓPEZ, M.; MAZAS, M.; GONZÁLEZ, J.; BERNARDO, A. Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores as affected by additives in recovery medium. **Journal of Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 1997.

GORDON, R. E. The genus Bacillus. In: **CRC.Handbook of Microbiology**. 2ed. Cleveland: CRC Press, 1977, p. 319-333.

GOULD, G. W. History of Cience-spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 507-513, 2005.

GRANATO, E. F. **Geração de Energia através da biodigestão anaeróbica da Vinhaça**. 167p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Universidade Estadual Paulista, Bauru, 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.

HANG J.; SUNDARAM, A.; SHELTON, D. R.; KARNS, J. S.; ZHU, P.; AMSTUTZ, P.; TANG, C. **Rapid Germination and Growth of *Bacillus anthracis***. ASM's Third Annual Biodefense Research Meeting, Baltimore, MD, March 20-23, 2005, Program and Abstract book, p. 49. Disponível em: http://www. creatvmicrotech. com/ Biosensor-presentation_posters /5.Poster_Germination&growth%20-%20ASM %20Biodefense (2005).pdf. Acesso em: 24 /11/ 2006.

HAMON, M. A.; LAZAZZERA, B. A. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 45, p. 1199-1209, 2001.

HAMON, M.A.; STANLEY, N.R.; BRITTON, R.A.; GROSSMAN, A.D.;LAZAZZERA, B.A. Identification of AbrB regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 847–860, 2004.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation**. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 215-220, 2002.

HESSELTINE, C. W. Solid State Fermentation - Part 1. **Process Biochemistry,** July/August, p. 24-27, 1977.

HODGES, 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, p. 126-30, 1980.

HOXEY, E.V.; SOPER, C. J.; DAVIES, D. J. Biological indicators for low temperature steam formaldehyde sterilization: effect of defined media on sporulation, germination index and moist heat resistance at 110 degrees C of *Bacillus* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, p. 207-14, 1985.

HUI, H.; FELDMAN, L. A.; GORHAN, R. A. **Biologycal Indicator for Sterilization with double buffer system.** UNITED SATES PATENT. 6,458,554, october, 2002.

ISHII, M.; PENNA, T. C. V. Autoclave process validation for sterilization of large volume parenteral solutions. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2007. Brasília: 2007. v. CD. p. 1-1.

IMCOPA. **Fluxograma de produção do álcool de soja**.Araucária, 2006.Não publicado.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 11138-4**. Sterilization of health care products - Biological indicators -Part 4: Biological indicators for dry heat sterilization processes.2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ªEd., Brasília, ANVISA, 2005.

JUNGE, H.; KREBS, B.; KILIAN, M. Strain Selection, production, and formulation of biological plant vitality enhancing agent FZB24 *Bacillus subtilis*. **Pflazenschutz-Nachrichten Bayer**, v.1, p. 94-104, 2000.

KASHYAP, D. R.; SONI, S. K.; TEWARI, R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus sp*. DT7 using solid state fermentation**. Bioresource Technology**, v. 88, p. 251-254, 2003.

KEARNS, D. B.; CHU, F.; BRANDA, S. S.; KOLTER, R.; LOSICK, R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis.* **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 739-749, 2005.

KOCH, R.; WOLFFHUEGEL, G. Untersuchungen ueber die Desinfection mit heisser Luft. **Mitteilungen aus dern kaiserlichen Gesundheitsamt**, v.1, p.1-21, 1881.

KRZYWICKA, H.; TADEUSIAK, B.; JANOWSKA, J. Factors modulating the sensitivity of bacterial spores to steam under pressure. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 47, n. 3, p. 352-32, 1996.

KUJALA, T.; KAUPPINEN, V. Some Improvements in the production of *Bacillus Stearothermophilus* spores for sterilization control. **Acta Pharmaceutica Fennica**, v. 91, n. 2, p. 75-83, 1982.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LI, X.; YANG, L.; YAN, P.; ZUO F; JIN, F. Factors regulating production of α-galactosidase from *Bacillus sp* JF_2 .**Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 1-4,1997.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LÓPEZ, M.; MAZAS, M.;, GONZÁLEZ, I.; BERNARDO, A. Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in different heating systems containing some approved food additives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p.187-191, 1996.

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.

LOSIK, R . Genetics of Endospore Formation in *Bacillus subtilis*. **Annual Review of Genetics**, v. 20, p. 625-629, 1986.

LI, X.; YANG, L.; YAN, P.; ZUO, F.; JIN, F. Factors regulating production of α-galactosidase from *Bacillus sp* JF_2. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 1-4, 1997.

LUDOVICE, M. T. F. Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático. 117p. Dissertação (Mestrado) UNICAMP Campinas, 1997.

LUNA, C. L; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Production of a Biocontrol Agent for Crucifers Black Root Disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p. 133-140, 2002.

LUQUETA, G. Definições da RDC 210 e os passos básicos de validação dos equipamentos. Parte 1.**Controle de Contaminação**, v. 93, p.18-20, 2007.

Machado, R. P. Produção de Etanol a partir de Melaço de Soja; 140p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil,1999.

MACGREGOR, C. **Directory of Feeds and Feed Ingredients**. Ed.Hoards Dairyman, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARJER, J. **Brock Biology Of Microorganisms**. New Jersey ,EUA, Ed.Prentice Hall Inc.10th ed, 2002.

MAYBAUM, J. **The Prevention of Disease Transmission in the Dental Office**. Disponível em: htpp://www. Dentalcare.com/soap/ce101ca/contents.htm. Acesso em: 22 /09/ 2004.

MAYWORM, D. A Primer on Dry Heat Sterilization. **Outpatient Surgery Magazine**, 2002. Disponível em: http://www.outpatient surgery. net/2002/ os01/infection.shtml. Acesso em: 20 /09/ 2004.

MARIN, N. P. *et al*. Uso y verificacion com indicadores biológicos em esterilizadores de cirurjanos dentistas de San Luis Potosí, México. **Salud Publica de Mexico**, v .43, n. 5, set/out 2001. Resumo.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium sp* EGC5 and *Moniella sp* 9SB in solid state fermentation using agro-industrial by-product. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 813-819, 2004.

MASSAGUER, P. R.; CARVALHO FILHO, C. D. Processamento térmico de purê de banana (*Musa cavendishii*, Lamb.) em embalagens flexíveis esterilizáveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 213-218, 1997.

MATOS, A.T.; VIDIGAL, S. M.; SEDIYAMA, M. A. N.; GARCIA, N. C. P.; MARCELO F.; RIBEIRO, M. F. Compostagem de alguns Resíduos Orgânicos, utilizando-se Águas Residuárias da Suinocultura como Fonte de Nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 2, p. 199-203, 1998.

MAUGHAN, H.; NICHOLSON, W. Stochastic Process Influence Stationary-Phase Decisions in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, 2004.

MELLO JR, C. A.; COSTA, O. R. L.; MACHADO, P. F.; D'ARCE, R. D.; MATTOS, W. R. S. Efeito do tratamento a pressão de vapor no bagaço de cana de açúcar sobre a sua degradação *in vitro* e digestibilidade *in vivo*. **Livestock Research for Rural**, 2000.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MOIR, A. How do spores germinate? **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p. 1-5, 2006.

MOLIN, G. Destruction of Bacterial Spores by Thermal Methods. In: RUSSEL *et al*. **Principles and Practices of Desinfection,Preservation and Sterilization**. Blackwell Sci.Publi, p 454-468,1982.

MONTEIRO,S. M.; CLEMENTE,J. J.; HENRIQUES, A. O.; GOMES, R. J.; CARRONDO, M. J.; CUNHA, A. E. A Procedure for High-Yield Spore Production by *Bacillus subtilis.* **Biotechnology Progress**, v .21, p.1026 -1031, 2005.

MORAES, I. Produção de Microorganismos. In: SCHIMIDELL W. *et al*. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 200-217.

MUDGETT, R. E. Solid State Fermentation. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology, Washington, p. 66-83, 1986.

MURRAY, T. J.; HEADLEE, M. R. Thermal death point in Spores of *Clostridium tetani*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 436-456, 1931.

MURRELL, W. G.; WARTH, A. D. Composition and heat resistance of bacterial spores, p. 1-24. In: CAMPBELL, L. L.; HALVORSON, H. O. **Spores III**. American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich. 1965.

NAGEL, F. J .I.; TRAMPER, J.; VAN AS, H.; RINZEMA, A. Water and glucose gradients in the substrate measured with NMR imaging during solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 653-666, 2002.

NAVALPROTO, D. **Novel product for agricultural use which is obtained from distillery spent wash and sludge** . UNITED STATES PATENT 0217.267, 2006.

NELSON, C.L; BERGER, T. J. Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma. **Current Microbiology,** v. 18, p. 275-276, 1989.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogyi-method of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NEVES, L. C. M.; OLIVEIRA, K. S.; KOBAYASHI, M. J.; PENNA, T. C. V. Biosurfactants Production by *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 and *Bacillus subtilis W* in TSB(Tryptone Soya Broth) Culture Media Enriched With Glucose, Soy Flour and Casein Digested. In: **28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Nashville, EUA. , 2006.

NEVES, L. C. M.; OLIVEIRA, K. S.; KOBAYASHI, M. J.; PENNA, T. C. V. Biosurfactants production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semi defined glucose/casein-based media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 539-554, 2007.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.

OAG, R. K. Resistance of bacterial spores to dry heat. **Journal of Pathology and Bacteriology,** v. 51, p.137-141, 1940.

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.

OLSON, J. C.; NOTTINGHAM, P. M. **Ecologia Microbiana de los Alimentos**. Vol.I - Factores que afectam a la supervivência de los microorganismos em los alimentos. Ed.Acribia. Espanha.1980.

OSADCHAYA, A. I.; KUDRYAVTEV, V. A.; SAFRONOVA, L .A.; KOZACHKO, I. A.; SMIRNOV, V. V. Stimulation of growth and spore formation by optimization of carbohydrate nutrition during submerged cultivation of *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 33, p. 286-289, 1997.

PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, P. Role of Ger Proteins in Nutriente and Nonnutrient Triggering of Spore germination in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 9, p. 2513-2510, may 2000.

PAL, M.; CALVO, A. M.; TERRÓN, M. C.; GONZÁLEZ, A. E. Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 541-545, 1995.

PANDEY, A. Solid state fermentation: an overview. In: **Solid State Fermentation**; Pandey, A.; Wiley Eastern Publishers: New Delhi, 1994, p. 3-10.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p.149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid state fermentation in biotechnology**, Nova Deli: Asiatech, 221p. 2001.

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

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, 16p, Piraquara, 16/05/2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 1.01.09 – Estudos de Estabilidade**. Rev 05, 06p, Piraquara, 27/11/2006.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde - SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.07- Validação do Tempo de Incubação**. Rev 01, Piraquara, setembro, 2007.

PARANÁ. Resolução SESA nº 496/2005, de 04 de novembro de 2005.Regulamenta a Norma Técnica que estabelece condições para instalação e funcionamento de Estabelecimentos de Assistência Odontológica, e dá providências correlatas. Disponível em: http://pg.pr.gov.br/files /legislação /resolução-2005.pdf. Acesso em: 25/07/2006.

PELIZER, L .H. Estudo da influência da atividade de água na fermentação em estado sólido de *Bacillus thuringiensis*. 104p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP, São Paulo, 1997.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES,I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management Innovation**, v. 2, n. 1, p.118-127, 2007.

PENNA, T. V.; MACHOSHVILI, I. A. E.; AQUARONE, E. Thermal Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores on Strips Previously Treated with Calcium. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology,** v. 50, n. 4, p. 227-237, 1996.

PENNA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. Esterilização Térmica.Conceitos Básicos da Cinética de Morte Microbiana. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 33, supl.1, p. 1-5, 1997.

PENNA, T. C. V.; MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S. The Efficacy of Chemical Agents in Cleaning and Disinfection Programs. **BMC Infectious Diseases**, v. 1, n. 16, 2001.

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 Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 98-100, 2002.

PERES, S. Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural. In XV SNPTEE, 1999, Foz do Iguaçu. In: **Anais do Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica,** Foz do Iguaçu, Paraná, 1999.

PFLUG, I. J. Microbiology and Engineering of Sterilization Processes. In: **Environmental Sterilization Services**. Minneapolis, Chapter 8, 1999.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M .R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. Fortaleza: EMBRAPA, Comunicado Técnico nº 102, p.1-5, agosto, 2005.

PINTO, T. J.; SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno. II- Influência de corpos de prova no desempenho de monitores biológicos e sua avaliação. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 6, p. 379-383, 1992.

PLOMP, M.; LEIGHTON, T. J.; WHEELER, K .E.; MALKIN, A. J. The high-resolution architecture and structure dynamics of bacillus spores. **Biophysical Journal**, v. 88, p. 603-608, 2005.

PRADO, M. E.; SANTOS, S. F. Evaluation of Odontological Materials Sterilization in Dental Offices in Taubaté City. Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté. Disponível em: http://www.unitau.br/prppg/publica/biocienc/ downloads/ avaliacondesteriliz-N1-2002. Acesso em: 02/10/2004.

PRIOR, B. A.; PREEZ, J. C .D.; REIN, P. W. Environmental Parameters. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation.** Elsevier Applied Science, London. p. 65-85,1992.

PRYOR S. W.; GIBSON, D. M.; HAY, A. G.; GOSSETT, J. M.; WALKER, L. P. Optimization of Spore and Antifungal Lipopeptide Production During the Solid-state Fermentation of *Bacillus subtilis.* **Applied Biochemistry and Biotechnology,** 2007. Disponível em: http://www. springerlink. com/content /g71212711002q318 /. Acesso em: 05 de agosto de 2007.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid-state fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 199-209,1980.

RAMANA-MURTHY, M. V.; KARANTH, N. G.; RAO, K. S. R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. **Advances in Applied Microbiology,** v. 38, p. 99-147, 1993.

RASO, J.; BARBOSA-CANOVAS, G.; SWANSON, B. G. Sporulation temperature affects initiation of germination and inactivation by high hydrostatic pressure of *Bacillus cereus.* **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 17-24, 1998.

REAL, G.; HENRIQUES, A. O. Controlo da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis.* **Boletim de Biotecnologia**, n. 68, p. 2-12, 2001.

REDMOND, C.; BAILLIE, L. W.; HIBBS, S.; MOIR, A. J. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis.* **Microbiology**, v. 150, p. 355-363, 2004.

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.

REICH, R .R.; WHITBOURNE, J. E.; MCDANIEL, A. W. Effect of Storage Conditions on the Performance of *Bacillus stearothermophilus* Biological Indicators. **Journal of the Parenteral Drug Association,** v.33, n. 4, 1979.

RODRIGUES, R. Bagaço e Álcool. **Revista Agroanalysis**, São Paulo, ABAG - Associação Brasileira de Agribusiness, dezembro de 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos:uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Casa Pão Editora, Campinas, SP, 2005, 618 p.

ROSE, R.; SETLOW, B.; MONROE, A.; MALLOZZI, M.; DRIKS, A.; SETLOW, P. Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 691–699, 2007.

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.

SBRT - Serviço Brasileiro de Resposta Técnica. **Utilização do bagaço de cana-de-açúcar para gado**. Disponível em: http://72.14.205.104/search?q=cache:CeGog TA 9q_oJ:sbrt.ibict.br/upload/sbrt4031. Acesso em: 15 /05/2007.

SCHAEFFER, P. J.; MILLET, J.; Aubert, J. P. Catabolic repression of bacterial sporulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 54, p. 704-711, 1965.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 1-17, 2004.

SCHMIDT, C .F. The Resistance of Bacterial Spores with Reference to Spore Germination and its Inhibition. **Annual Review of Microbiology**, v. 9, p. 387-400, 1955.

SELLA, S. R. B. R. Produção e Controle de Qualidade de Indicadores Biológicos para Esterilização a Vapor. **Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas,** v.27, n.1, p. 31-36, 1995.

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

SHINTANI, H.; SASAKI, K.; KAJIWARA, Y.; ITOH, J.; TAKAHASSHI, M.; KOKUBO, M. Validation of D Value by Different SCD Culture Medium Manufacturer and/or Different SCD Culture Medium Constituent. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2000.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O .L .S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v .2, n. 1, p. 27-32, 2007.

SMITH, G. M.; KOPELMAN, A. J.; PFLUG, I. J. Effect of environmental conditions during heating on commercial spore strip performance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 12-18, 1982.

SIQUEIRA, P. F. Production of Bio-Ethanol from Soy Bean Molasses by *Saccharomyces cerevisae*. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnologicos) - Universidade Federal do Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea.Curitiba, Brazil, 2006.

SKAUG, N. *et al*. Biological monitoring of sterilizers and sterilization failures in Norwegian dental offices in 1985 and 1996**. Acta Odontologica Scandinavica**, v. 57, p. 4, 1999. Resumo

SLEPECKY, R.; FOSTER, J. W. Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties'. **Journal of Bacteriology**, v.78, p. 117–123, 1959.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBEEK, H. M.; HAGE, J. C.; OKAYNAK, A.; KNOL, W. The Influence of Temperature on Kinetics in Solid-State Fermentation. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 22, p. 50-57, 1998.

SOARES, V. F.; CASTILHO, L. R.; BON, E. P. S.; FREIRE, D. M. G. High-Yield *Bacillus subtilis* Protease Production by Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 311-320, 2005.

SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw Cassava by Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994.

SOCCOL, C. R.; RADJISKUMAR, M.; QUORIM, M. Uso do bagaço de cana de açúcar como material de suporte na fase de enraizamento em processo de micropropagação vegetal. Patente Brasileira, NPI nº 931.2001.

SOCCOL, C .R.; VANDENBERGHE, L. P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3648, p. 1-14, 2002.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOUZA, Ricardo *et al*. Teste de dois métodos de esterilização em ortodontia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 4, n. 1, p. 63-68, jan-fev,1999.

TURNBULL, P. C. B.; FRAWLEY, D. A.; BULL, R. L. Heat activation/shock temperatures for *Bacillus antracis* spores and the issue of spore plate counts versus true numbers of spores. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 353-357, 2007.

U.S.P. 24. Chapter 55. Biological Indicators -Resistance and Performance Tests. In:**The United States Pharmacopeia**. 24 rd rev., Rockville: United States Pharmacopeial Convencion, 2000a.

U.S.P. 24. Chapter 1035. Biological indicators. *In:* **The United States Pharmacopeia**. 24rd rev., Rockville: United States Pharmacopeial Convencion, 2000b.

U.S. P. 24. Biological indicator for dry-heat sterilization, paper strip. *In:* **The United States Pharmacopeia**. 24rd rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 2000c.

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, 2006, p. 2501 -2503.

VINTER, V. Physiology and biochemistry of sporulation. In: **The Bacterial Spore**, Eds Gould, G.W. & Hurst, A . Academic Press, p. 73- 123, 1969.

VRIES, Y. P.; ATMADJA, R. D.; HORNSTRA, L. M.; DEVOS, W. M.; AND ABEE, T. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in a defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3248-3254, 2005.

WALDBURGER, C.; GONZALEZ, D.; CHAMBLISS, G.H. Characterization of New Sporulation Factor in *Bacillus subtilis.* **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6321-6327, 1993.

WALTER, C. W. **Aseptic treatment of wounds**. New York: Macmillan, 1948.

WARRINER, K.; WAITES, W. M. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on Medium containing Glucose: Ribose. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 97-102, 1999.

WEBER, D. J.; SICKBERT-BENNETT, E.; GERGEN, M. F.; RUTALA, W. A. Efficacy of Selected Hand Hygiene Agents Used to Remove *Bacillus atrophaeus* (a Surrogate of *Bacillus anthracis*) From Contaminated Hands. **Journal of the American Medical Association**, v. 289, p. 1274-1277, 2003.

YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1133-1142, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 – MODELO DO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DE PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus* 235

ANEXO 2 – MODELO DO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA A PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO..... 238

ANEXO 3 - INSTRUÇÃO DE USO..... 241

ANEXO 1 – **MODELO DO** PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DE PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *B. atrophaeus*

CPPI	SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLÓGICOS	Número Experimental Cópia não controlada Data de emissão
TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA A PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*		Data da validade
SEÇÃO: INSUMOS		Nº da Revisão

1.0 OBJETIVO:
Obtenção de uma suspensão aquosa concentrada e padronizada de esporos do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9302, dentro dos critérios de aceitação estabelecidos.

2.0 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES :

- Boas Práticas de Fabricação -Portaria 686/ANVISA de 27/08/98
- USP XXIX- Biological Indicators (55) United States Pharmacophea.29ªEdição.
- ISO 11.138-1- Sterilization of Health Care Products-Biological Indicators.
- FDA2001-Premarket Notifications for Biological Indicators Intended to Monitor Sterilizers….

.

3.0 DEFINIÇÕES/ SIGLAS :

- UFC - Unidades Formadoras de Colônias.....

4.0 RESPONSABILIDADES :
Farmacêutico da Seção de Insumos ou Agente Profissional Treinado
- Execução e registro de todas as etapas do processo de produção, incluindo as de controle de processo.....

5.0 PROCEDIMENTO:

5.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO E FINALIDADE
Inoculação de formas vegetativas do *Bacillus atrophaeus* em meio de esporulação em temperatura ideal (36,0±2,0ºC) a fim de estimular sua multiplicação e transformação em forma esporulada termo resistente, visando à produção de indicador biológico para esterilização.....

5.2.CAMPO DE APLICAÇÃO E COMPOSIÇÃO:
Produção de indicador biológico para monitoramento da esterilização pelo calor seco.....

5.3.EQUIPAMENTOS/ MATERIAL

5.3.1. Padrões, controles, reagentes e outros insumos.....

B)Equipamentos /materiais: .....

5.4.PROCEDIMENTO DETALHADO:

5.4.1Preparo dos materiais
Todo o material utilizado deve.....

5.4.2. Preparo dos Equipamentos.....

5.4.3. Preparo dos meios e soluções.....

5.4.4 Reconstituição e manutenção da cepa.....

5.4.5. Ampliação e esporulação.....

5.4.6. Lavagem dos esporos.....

5.4.7 Envase.....

5.4.8 Controle de qualidade:.....

5.4.8.1.Contagem de colônias pelo método da micro-gota (MLLES) e verificação de contaminantes.....

.5.4.8.2. Reprocessamento.....

5.4.8.3.Determinação da Resistência Térmica e da Viabilidade.....

.

5.4.8.3.1.Contagem de colônias do IB.....

5.4.8.3.2 .Teste de Termorresistência.....

5.4.8.3.3.Teste de Viabilidade....

5.4.8.3. Critérios de Aceitação:

Suspensão de esporos que apresente:

U_{sk}= maior ou igual a 15 minutos

D_{160^oC}= igual ou superior a 3 minutos.

Tm= maior ou igual a 10 minutos

Ts= menor ou igual a 90 minutos

VIABILIDADE= 100% das amostras viáveis em 48 horas.

5.4.8.4. Rendimento .....

5.5 DESCARTE DE PRODUTO REPROVADO

- Registrar no protocolo de produção. Acondicionar em saco de lixo autoclavável. Identificar com etiqueta.....

CPPI	SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Instituto de Saúde do Paraná CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLÓGICOS	Número Experimental Data de emissão Data de validade Nº da Revisão
TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA A PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Bacillus atrophaeus*		
SEÇÃO: INSUMOS		

5.6 DESCARTE DE RESÍDUOS

- Os frascos e placas deverão ser dispensados em saco de lixo autoclavável .....

6.0 REGISTROS/ARQUIVO

Anexo n º	**Nome do Documento**	**Seção resp. pelo preen-chimento**	**Seção resp. pelo arquiva-mento**	**Local de arquiva-mento**	**Indexação dos dados**	**Tipo de acesso**	**Tempo de arquiva-mento + arquivo morto**
01	Protocolo de Produção/Padronização do Concentrado de Esporos do *Bacillus atrophaeus*	INSUMOS	INSUMOS	PASTA DO PRODUTO	Por lote	02	1 ano após o vencimento -AA 5 anos -AM

7.0 DISTRIBUIÇÃO

- INSUMOS

8.0 CONTROLE DA REVISÃO

Revisão n º 0

9.0 ANEXOS

- **Anexo 1**- Protocolo de produção do concentrado de esporos do *Bacillus atrophaeus*
- **Anexo 2-** Fluxograma de Produção do concentrado de esporos do *Bacillus atrophaeus*

ANEXO 2 – MODELO DO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA A PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO

CPPI	SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Instituto de Saúde do Paraná CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLÓGICOS	Número Experimental Cópia não controlada
TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA A PRODUÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA CALOR SECO		Data de emissão
SEÇÃO: INSUMOS		N° da Revisão

1.OBJETIVO:
Produzir indicador biológico para controle de esterilização pelo calor seco, de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos.

2.DOCUMENTOS COMPLEMENTARES :

- *POP 1.11.01 (Esterilização de materiais)*
- POP 1.11.04 (Desinfecção de áreas restritas)
- POP 3.10.16 (Determinação de pH)
- POP 1.00.12 (Situação da Inspeção e Ensaio).....

3.DEFINIÇÕES/ SIGLAS :

- INCQS-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- NaOH- Hidróxido de Sódio.....

4.RESPONSABILIDADES :

Farmacêutico da Seção de Insumos ou Agente Profissional Treinado
- Execução e registro de todas as etapas do processo de produção, incluindo as de controle de processo.....

Agente de Execução ou Agente de Apoio da Seção de Insumos ou Treinado
-Preparo e esterilização dos materiais e meios.....

5. PROCEDIMENTO/ DESCRIÇÃO:

Considerações Gerais:

- Este procedimento de produção foi elaborado em conformidade com a Portaria n °686 de 27 de agosto de 1998, das Boas Práticas de Fabricação para diagnóstico de uso "in vitro".
- Os pontos de controle e limites de aceitação bem como todos os registros de produção estão contidos no protocolo de produção, Anexo A1 deste POP.
- A identificação do lote segue o PG 1.00. 18 - Identificação e Rastreabilidade.

5.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

Consiste em um suporte de papel inoculado com esporos viáveis do *Bacillus atrophaeus* (*Bacillus subtilis* var.*niger*) ATCC 9372 ,com alta resistência a esterilização pelo calor seco, e de um caldo nutritivo que permite a recuperação e o crescimento dos esporos danificados pelo processo, que ainda se encontrarem viáveis. O produto é colocado junto com o material a ser esterilizado e posteriormente inoculado, de forma asséptica, no meio de cultivo fornecido. Se a esterilização for inadequada, alguns esporos sobrevivem,e, no tempo e temperatura adequados de incubação, passam à forma vegetativa e multiplicam-se. A formação de bioprodutos ácidos devido a metabolização do meio pelo microrganismo ocasiona uma alteração de pH e conseqüente mudança de coloração do meio para amarelo devido a presença do indicador de pH.Se a esterilização for adequada , os esporos não sobrevivem e a coloração do meio de cultivo permanece inalterada durante o período de incubação.

5.4.PROCEDIMENTO DETALHADO:

5.4.1Preparo dos materiais

- Todo o material utilizado deve ser preparado e embalado conforme POP 1.11.08 (Embalagem de materiais) e esterilizado conforme POP 1.11.05 (Manuseio de autoclaves).....

5.4.2Preparo dos Equipamentos

- Checar a conformidade de todos os equipamentos a serem utilizados no processo (situação da calibração, quando aplicável, e funcionamento).....

5.4.3. Preparo dos meios e soluções:

Todos os meios devem ser preparados conforme o POP 14.01.00.....

5.4.4 Preparo dos papelotes.....

5.4.5 Inoculação.....

5.4.6 Envase....

5.4.7 Controle de qualidade:

PONTOS DE CONTROLE E LIMITES DE ACEITAÇÃO

AMOSTRA	ANÁLISES	ACEITAÇÃO
Caldo de Revelação	Contaminantes	Ausência de Contaminantes
Papelote	Contaminantes	Ausência de Contaminantes
kit	Viabilidade	100% de Esporos Viáveis
kit	Termorresistência	Ts: > ou = a 10 minutos Tm: < ou = a 90 minutos D: > ou = a 3 minutos Usk : > ou = a 15 minutos
Papelote	Contagem de Colônias	> ou = 5,0 10^5 UFC/unidade

5.4.8 Cálculos :

5.4.9 Rendimento :

Para a produção de um lote de 1000 frascos liberados.....

- Volume de concentrado: *15,0 mL*
- Frascos envasados: *1920*
- % de perdas /quebras na rotulagem e na lacração: *Max 0,5 % (10 em 2000)*
- Frascos para controle de qualidade do produto final: *94*
- Frascos para referencia futura: *94*
- Frascos para estabilidade: *700 (L1.L2 e L3-experimental)*
-

5.5 DESCARTE DE PRODUTO REPROVADO

5.7 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO

Validação pela reprodução de 03 lotes consecutivos aprovados.

5.8 DESCARTE DE RESÍDUOS....

6.0 REGISTROS/ARQUIVO.....

7.0 DISTRIBUIÇÃO

- INSUMOS

8.0 CONTROLE DA REVISÃO

Revisão n ° 0 – Elaboração

9. ANEXOS

- **Anexo 1**- Protocolo de produção do IB calor seco
- **Anexo 2-** Fluxograma de Produção do IB calor
- **Anexo 3-** Certificado de Liberação
- **Anexo 4-** Protocolo Resumido do IB calor seco
- **Anexo 5-** Instrução de Uso

ANEXO 3- INSTRUÇÃO DE USO

INDICADOR BIOLÓGICO-CALOR SECO

Indicador Biológico para Esterilização pelo Calor Seco

Somente para uso "in vitro"

FINALIDADE DO USO

O indicador biológico-calor seco possibilita o monitoramento e a validação dos ciclos de esterilização pelo calor seco (160 a 180º) em fornos ou estufas.
Fornos ou estufas esterilizadoras devem ser monitoradas de rotina com indicador biológico no mínimo semanalmente, e eventualmente para sua qualificação operacional após mudança do processo, local de instalação e reparos no equipamento, ou ainda no caso de problemas no processo de esterilização.
Não é indicado para monitoramento de outros processos de esterilização, tais como óxido de etileno (ETO),vapor de peróxido de hidrogênio e esterilização a vapor sob pressão.

COMPOSIÇÃO

1 kit contém:
1 frasco ampola com 3,0 mL de caldo nutritivo estéril (caldo de soja tripticaseína, amido solúvel e cloreto de cálcio) e indicador de pH (azul de bromotimol),de coloração verde;
1 frasco ampola contendo uma fita de papel de filtro inoculada com esporos viáveis de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 na concentração mínima de 5,0. 10^5 UFC/papelote.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O papelote consiste em um suporte de papel inoculado com esporos viáveis do *Bacillus atrophaeus* (*Bacillus subtilis* var.*niger*) cepa ATCC 9372 ,com alta resistência a esterilização pelo calor seco. O meio de cultivo é um caldo nutritivo que permite a recuperação e o crescimento dos esporos viáveis. O papelote é submetido ao ciclo de esterilização juntamente com o material a ser esterilizado. Ao final do processo ,o papelote é inserido, de forma asséptica, no meio de cultivo fornecido e posteriormente incubado a 36,0 ± 2,0 ºC por 48 horas.. Se a esterilização for **inadequada**, alguns esporos sobrevivem, passando à forma vegetativa e multiplicando-se durante a incubação. Neste caso, ocorrerá a formação de bioprodutos ácidos devido a metabolização do meio pelo microrganismo, ocasionando alteração de pH e conseqüente mudança de coloração do meio de verde para amarelo, devido a presença do indicador de pH.Se a esterilização for **adequada** , os esporos não sobrevivem e a coloração do meio de cultivo permanece inalterada durante o período de incubação.

APRESENTAÇÃO

Caixa contendo 10 kits (10 frascos-ampola com 3,0ml de meio de cultivo e 10 frascos-ampola com um papelote inoculado com esporos viáveis do *Bacillus atrophaeus*).

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Estufa incubadora ou banho-maria com temperatura ajustada para 36 ± 2 ºC.
Etiquetas adesivas para a identificação dos testes.
Fluxo unidirecional ou área asséptica.
Pipeta estéril.

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

Transportar e conservar na temperatura de refrigeração, 2 ºC a 8 ºC. **Não congelar**.
Observação: Embora os esporos do *Bacillus atrophaeus* permaneçam dormentes à temperatura ambiente (18º C a 24 ºC), devido à variação de temperatura em diferentes regiões a refrigeração é recomendada para garantir a qualidade e estabilidade do produto.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS

Somente para uso "in vitro".
Não colocar o meio de cultivo no forno ou estufa de esterilização. Apenas o papelote é submetido ao ciclo de esterilização.
Não autoclavar novamente o meio de cultivo.
Não indicado para monitoração de outros processos de esterilização, tais como óxido de etileno (ETO),vapor de peróxido de hidrogênio e esterilização a vapor sob pressão.
Não utilizar o produto se apresentar mudança significativa de coloração ou turvação acentuada.
Evitar quebras e contaminação da superfície de trabalho.
Caso ocorra quebra, com auxílio de luvas limpar a superfície com gaze ou pano seco. Passar no local um esterilizante químico, como glutaraldeído a 2%, e deixar agir conforme recomendação do fabricante. As luvas e o restante do material utilizado devem ser autoclavados no mínimo por 30 minutos a 121ºC antes de serem descartados no lixo hospitalar.

MODO DE USAR

1- Retirar os frascos da refrigeração , deixando-os a temperatura ambiente por uma a duas horas,antes de iniciar o procedimento.
2-Identificar os frascos-ampola com as informações apropriadas para o processo, tais como data, lote da esterilização e posição a ser colocado dentro do forno ou estufa .
3- Posicionar 1 unidade do **frasco com papelote** em cada canto do equipamento e uma no centro,junto com a carga a ser esterilizada.OBS: Os indicadores devem estar posicionados nos locais considerados de maior dificuldade da penetração do calor,nos chamados "pontos frios" ,identificados pelos fabricantes dos equipamentos(vide manual do equipamento) ou no centro,quando não tiver acesso a esta informação.
4- Esterilizar o material de acordo com procedimento ou rotina do serviço.
5-Iniciar a contar o tempo após ter sido atingida a temperatura de esterilização no termômetro de bulbo. (160ºC - 2 horas / 180ºC - 1 hora).
6- Concluído o processo, após resfriamento, retirar os indicadores da estufa.
7- Em ambiente asséptico (fluxo laminar ou chama),remover os lacres e as tampas de borracha do papelote e do meio de cultivo, evitando contaminá-las.
8- Com auxílio de uma pipeta estéril transferir todo o conteúdo do frasco do meio de cultivo para o frasco contendo o papelote,de modo a evitar a contaminação..
9-Incubar a 36±2 ºC por 48 horas.
10-Fazer uma leitura após 24 horas de incubação e a leitura final após 48 horas de incubação.
11-A cada teste utilizar um **controle positivo,** que consiste na adição do meio de cultivo em um frasco papelote que não foi submetido a esterilização, para avaliar a viabilidade dos esporos, a qualidade do meio de cultivo e a incubação, que deverá manipulado assepticamente e por último para evitar a contaminação dos testes. E um **controle negativo,** que consiste no frasco do meio de cultivo sem agregar a fita com esporos, com a finalidade de verificar a esterilidade do meio de cultivo .

LEITURA

Se o meio de cultura ficar **amarelo**, indica que os esporos sobreviveram ao ciclo de esterilização , o resultado é considerado positivo e a **esterilização foi ineficiente (houve falha no processo)**.
Se o meio de cultura vai permanecer **verde,** indica que os esporos não sobreviveram ao ciclo de esterilização, o resultado é considerado negativo e a **esterilização foi eficiente.**
OBS: Os cultivos positivos devem ser confirmados através da coloração de Gram ou pela identificação microbiológica. A presença de outros microrganismos que não bacilos Gram positivo indicam contaminação durante o processo de cultivo.

DESCARTE

Autoclavar os frascos no mínimo por 30 minutos a 121ºC, inclusive aqueles que não apresentaram crescimento. Descartar os frascos autoclavados em lixo hospitalar.

CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

Controle positivo : Todo teste deve usar um frasco de indicador biológico do mesmo lote como controle positivo.
Este frasco não deverá sofrer esterilização, após o procedimento deverá ser inoculado com um papelote **não esterilizado,** por último, e incubado junto com os demais frascos do teste.
Após a leitura do resultado (mudança de coloração para amarelo), registrar e descartar o frasco-ampola, conforme indicado no item descarte, a fim de evitar qualquer possibilidade de contaminação da área de trabalho com microrganismos termorresistentes.
O controle positivo serve para confirmar a presença de microrganismos viáveis no produto, assegurar as condições adequadas de incubação e demonstrar a capacidade do meio de cultura em promover e indicar o desenvolvimento bacteriano . Não serve como coloração padrão para comparação dos resultados do teste.

Controle negativo: Consiste na incubação de um frasco com meio de cultivo sem esporos, com a finalidade de confirmar a esterilidade do meio de cultivo.
Nota:
Evitar a esterilização com temperatura superior a 180ºC. Estas condições podem ocasionar alterações na embalagem do indicador biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

TESTE	COLORAÇÃO APÓS INCUBAÇÃO 48 HORAS	RESULTADO	CAUSA PROVÁVEL	*MEDIDAS*
Controle positivo Frasco com papelote novo + meio de cultivo	Amarelo	Esporos viáveis	Resultado esperado	Resultado esperado
	Verde	Esporos inviáveis	- Incubação Inadequada - Alteração no produto, devido a transporte ou conservação inadequada.	- Repetir o teste com outro lote. - Informar ao SAC - Descartar
Controle negativo Frasco apenas com meio de cultivo (sem papelote)	Verde	Meio de cultura adequado	Acondicionamento Adequado.Meio de cultivo estéril.	Resultado esperado
	Amarelo	-	Meio de cultura contaminado	Repetir o teste com outro lote. - Informar ao SAC -- Descartar

Frascos-teste Frasco com papelote esterilizado + meio de cultivo	Pelo menos 1 frasco amarelo	Esporos viáveis	- Esterilização falha. Devido a erro de procedimento ou problema no equipamento	- Recolher a carga - Repetir o teste revendo o procedimento.
Frascos-teste	Todos os frascos verdes	Esporos inviáveis	Esterilização eficiente	Registrar os resultados

Como proceder no caso de resultados positivos (esterilização ineficiente):

Notificar imediatamente ao profissional responsável pelo serviço de esterilização e para o usuário do material que foi processado naquele ciclo.
Segregar e re-esterilizar o material reprovado com acompanhamento de novo teste de IB (não será considerado estéril até obter teste de IB negativo).
Após uma esterilização insatisfatória e tomada as ações corretivas,o equipamento deverá ser re-testado por 3 vezes consecutivas antes de ser liberado para uso.

Testes negativos não comprovam que todos os produtos constantes da carga submetida ao processo de esterilização estão estéreis e sim que o equipamento e o processo forneceram as condições adequadas para uma esterilização eficiente.

VALORES DE REFERÊNCIA

- **Número de microrganismos viáveis:**

No $\geq 5{,}0\ 10^5$ UFC/ papelote.

- **Tempo necessário para reduzir a população microbiana em 1 logarítimo ou 90%:**

D $_{160\pm1\ ºC} \geq 3$ minutos

- **Tempo médio de morte:**

$\mathbf{U_{sk}} \geq 15$ minutos
Tempo de sobrevivência: $T_s \geq 10$ minutos (100% crescimento positivo)
Tempo de morte $\mathbf{T_m} \leq 90$ minutos (100% crescimento negativo)
O valor de D,T_s e T_m de cada lote é informado no "Certficado de Qualidade" ,que acompanha o produto .

PRAZO DE VALIDADE

01 ano conforme indicado no rótulo e embalagem do produto.

CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

O teste deve ser executado por pessoal qualificado e com competência comprovada para o desempenho adequado do processo de esterilização, cultivo do produto e leitura dos resultados.
O cumprimento às orientações contidas nesta instrução é fator determinante na obtenção de resultados fidedignos.
A execução do teste, de forma diferente da recomendada e os resultados obtidos, não são de responsabilidade do fabricante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- ANSI/AAMI (American National Standard) ST 50-2004.Dry-heat (heated air) sterilizers
2- ANSI/AAMI (American National Standard) ST 40-2004.Table-top Dry-heat (heated air) sterilization and Sterility assurance in health care facilities.
2- FDA, 2001.Premarket Notifications for Biological Indicators Intended to Monitor Sterilizers
3- ISO 11.138-1.Sterilization of Health Care Products-Biological Indicators.
5 USP XXIX. Biological Indicators (55) United States Pharmacophea.29ªEdição.

FARMACÊUTICO RESPONSÁVEL
ISOLETE PAULI
CRF9 3066 – PR

FABRICADO E DISTRIBUIDO POR:
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLÓGICOS – CPPI
Av.São Roque 716.Piraquara.Paraná.Brasil
CNPJ: 76.683.986/0051-72
Isenção de Registro conforme RDC 260/2002 ANVISA

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE- SAC:
Tel./Fax (41) 3673-8800
E-mail: sesacppi@.pr.gov.br
Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto, poderão ser obtidas junto a Coordenação da Garantia da Qualidade do CPPI.

Revisão 2- fevereiro de 2008