



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS CAMPO MOURÃO
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

DANIEL DAVI GRUCHINSKI

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DO
BACILLUS ATROPHAEUS EM INDICADORES BIOLÓGICOS
AUTOCONTIDOS UTILIZADOS PARA MONITORAR SISTEMAS
DE ESTERILIZAÇÃO A ÓXIDO DE ETILENO.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPUS CAMPO MOURÃO

2014

DANIEL DAVI GRUCHINSKI

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DO
BACILLUS ATROPHAEUS EM INDICADORES BIOLÓGICOS
AUTOCONTIDOS UTILIZADOS PARA MONITORAR SISTEMAS
DE ESTERILIZAÇÃO A ÓXIDO DE ETILENO.**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado a UTFPR –
Campus Campo Mourão, como parte
dos requisitos para a conclusão do
Curso Superior de Tecnologia em
Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Vanin
dos Santos Lima

Campo Mourão

2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Campus Campo Mourão
Coordenação dos cursos de Tecnologia e
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE
DO BACILLUS ATROPHAEUS EM INDICADORES BIOLÓGICOS
AUTOCONTIDOS UTILIZADOS PARA MONITORAR SISTEMAS
DE ESTERILIZAÇÃO A ÓXIDO DE ETILENO.**

por

DANIEL DAVI GRUCHINSKI

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 27 de fevereiro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Paulo Henrique Março

Prof. Dra. Márcia Regina Geraldo Perdoncini

Prof. Dra. Mirela Vanin dos Santos Lima
Orientadora

RESUMO

GRUCHINSKI, Daniel. D. **Estudo da influência do substrato na atividade do *Bacillus atrophaeus* em indicadores biológicos autocontidos utilizados para monitorar sistemas de esterilização a óxido de etileno.** 2013. 40 f. Trabalho de Conclusão de curso (Tecnologia em alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Indicadores biológicos (IB) têm por objetivo avaliar a eficácia de processos de esterilização através da introdução de esporos de bactérias altamente resistentes no ciclo de esterilização. O *Bacillus atrophaeus* é utilizado no monitoramento de sistemas de esterilização à gás óxido de etileno, e quando esses esporos são destruídos, pode-se garantir que os microrganismos contaminantes da carga também foram mortos assegurando assim a esterilidade do material. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de glicose e proteína (TSB), bem como, do indicador de pH azul de bromotimol, na atividade do *B. atrophaeus* em indicadores biológicos autocontidos, utilizados no monitoramento de sistemas de esterilização à gás óxido de etileno. Para tanto, avaliou-se a influência da concentração dos nutrientes glicose e TSB presentes no meio de cultivo do IB, bem como, do indicador de pH azul de bromotimol, com níveis de 2,5; 3,25 e 5,0 g/L para glicose, 5,0; 7,5 e 10,0 g/L para TSB, e 0,05; 0,10 e 0,15 g/L para o azul de bromotimol. Utilizou-se um planejamento experimental de Box-Behnken para as 3 variáveis, onde o modelo avalia o efeito de cada variável independente para uma resposta. Os ensaios foram submetidos a análises colorimétricas e avaliação do tempo de viragem. Pela análise dos resultados conclui-se que a combinação de concentração das variáveis estudadas realmente é capaz de influenciar a cor de viragem e o tempo de viragem dos IB; podendo-se sugerir que, para melhores resultados na intensidade de cor de viragem e no tempo de viragem deve-se empregar a combinação ideal verificada: concentrações mais elevadas para glicose; baixas concentrações para TSB e concentração intermediária para o azul de bromotimol; dentre as combinações e concentrações avaliadas neste trabalho.

Palavras-chave: Indicador biológico. *Bacillus atrophaeus*. Esterilização. Óxido de etileno. Meio de cultura.

ABSTRACT

GRUCHINSKI, Daniel. D. **Study of the influence of substrate on the activity of *Bacillus atrophaeus* self-contained biological indicators used to monitor sterilization systems to ethylene oxide.** 2013. 40 f. Trabalho de Conclusão de curso (Tecnologia em alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Biological indicators (BI) are to evaluate the effectiveness of sterilization processes through the introduction of highly resistant bacterial spores in the sterilization cycle. *Bacillus atrophaeus* is used for monitoring the sterilization ethylene oxide gas systems, and when these spores are destroyed, can ensure that contaminating microorganisms were killed load thereby ensuring the sterility of the material. Therefore, this work aimed to study the influence of the concentration of glucose and protein (TSB), as well as the pH indicator bromothymol blue in the activity *B. atrophaeus* in self-contained biological indicators used in monitoring of sterilization systems for ethylene oxide gas. To this end, it was evaluated the influence of nutrient glucose and TSB present in the culture medium of the IB, as well as the pH indicator bromothymol blue, with levels of 2.5, 3.25 and 5.0 g / L for glucose, 5.0, 7.5 and 10.0 g / L TSB, and 0.05, 0.10 and 0.15 g / L bromothymol blue. Was used an experimental design of Box-Behnken for 3 variables, where the model evaluates the effect of each independent variable for an answer. The tests were subjected to colorimetric analysis and evaluation time of turning. For analysis of the results it is concluded that the combination of concentration of variables really is able to influence the color of the turning and the time of the turning of IB; may be suggested that, for best results in color intensity turning and turning in time should employ the ideal combination verified: higher concentrations for glucose, low concentrations to TSB and intermediate concentration for bromothymol blue; among combinations and concentrations evaluated in this work.

Keywords: Biological Indicator. *Bacillus atrophaeus*. Sterilization. Ethylene oxide. Culture medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre os resultados previstos pela equação e os resultados encontrados experimentalmente para os valores de b^* (Previsto/observado).	26
Figura 2: Curvas de níveis Glicose X TSB para o valor de b^*	27
Figura 3: Curvas de níveis Glicose X azul de bromotimol para o valor de b^*	27
Figura 4: Curvas de níveis TSB X azul de bromotimol para o valor de b^*	28
Figura 5: IB com mudança de coloração pela evaporação do ácido e falta de nutrientes antes das 48h.....	30
Figura 6: Comparação entre os resultados previstos pela equação e, os resultados encontrados experimentalmente para os valores do tempo de viragem em horas (Previsto/observado).....	31
Figura 7: Curvas de níveis Glicose X TSB para o tempo de viragem do IB.....	32
Figura 8: Curvas de níveis Glicose X Azul de bromotimol para o tempo de viragem do IB.	32
Figura 9: Curvas de níveis TSB X Azul de bromotimol para o tempo de viragem do IB. ..	33
Figura 10: Análise do valor de b^* e do tempo de viragem para obtenção das concentrações e combinações ideais dos fatores analisados (TSB, glicose e azul de bromotimol).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações determinadas para as variáveis.	20
Tabela 2: Planejamento experimental de Box-Behnken para as 03 variáveis apresentadas na Tabela 1.	21
Tabela 3: Resultados de cor (antes e após viragem) e tempo de viragem.	24
Tabela 4: ANOVA para os valores de b^*	25
Tabela 5: ANOVA para valores do tempo de viragem	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	Esterilização	12
3.2	Gás óxido de etileno (ETO)	13
3.3	<i>Bacillus Atrophaeus</i>	14
3.4	Indicadores biológicos (IB)	14
3.5	Substrato	15
3.6	Área de atuação da esterilização por ETO	17
3.7	Colorimetria	18
3.8	Planejamento experimental	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Planejamento experimental	20
4.2	Preparação dos IB de acordo com o planejamento experimental proposto. 22	
4.3	Teste de viragem	22
4.4	Análise colorimétrica	22
5	RESULTADOS	24
5.1	Análise dos resultados referentes à intensidade da cor de viragem (valor de b*).....	25
5.2	Análise dos resultados referentes ao tempo de viragem do IB	30
5.3	Meio de cultura ideal	34
6	CONCLUSÃO	36
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

Esterilização é o processo físico ou químico que destrói ou inativa todas as formas de vida presentes em um determinado material, especialmente microrganismos incluindo bactérias, fungos tanto em suas formas vegetativas como esporuladas, e vírus (SCHMIDELL, 2001).

O óxido de etileno (ETO) reage com a parte sulfídrica da proteína do sítio ativo do microrganismo, impedindo assim sua reprodução. O mecanismo de ação na esterilização por ETO é uma típica reação de deslocamento “In vivo”, envolvendo uma reação nucleófila de sítio ativo dos ácidos nucléicos no interior da célula com a molécula de ETO, inibindo e modificando a síntese protéica, que é ácido nucléico dependente, alterando ou destruindo o ciclo de vida da célula. As misturas esterilizantes de ETO penetram prontamente em poros profundos e em fendas estreitas e também em embalagem de polietileno, papel ou tecido. Tal penetração do gás permite a fabricantes de equipamentos médicos, dentários e farmacêuticos, esterilizarem itens embalados individualmente, antes da entrega. Também permitem que hospitais, clínicas e laboratórios, esterilizarem itens usados e contaminados, após sua limpeza e embalagem para estoque, aqueles previstos em legislação específica (LAPA, 2011).

O ETO inativa todos os microorganismos, porém esporos bacterianos, especialmente *Bacillus atrophaeus*, são mais resistentes que outros microorganismos, conseqüentemente, o *Bacillus atrophaeus* é usado como indicador biológico no processo de esterilização por ETO (CEFAR, 2010).

O *Bacillus atrophaeus* é uma bactéria, bacilo, Gram-positivo, pertencente ao gênero de microrganismos *Bacillus*. Há pouco tempo, esse microrganismo era chamado de *Bacillus subtilis*. Fenotipicamente, essas duas espécies são praticamente indistinguíveis exceto pela produção de pigmentos em certos meios de cultivo. Diversas variantes pigmentadas do *Bacillus subtilis* foram reclassificadas como *Bacillus atrophaeus*. Em todos os casos, a aplicação prática dos microrganismos foi mantida. Esporos de *Bacillus atrophaeus* são considerados convenientes indicadores biológicos na esterilização por calor seco, particularmente

em temperaturas até 170°C. Também está indicada para processos de esterilização que utilizam Oxido de etileno (CEFAR, 2010).

Indicadores biológicos (IB) funcionam através da introdução de esporos de bactérias altamente resistentes no ciclo de esterilização. Se esses esporos são destruídos, supõe-se que os microrganismos contaminantes da carga também foram mortos (ALBERT, et al., 1998).

Na realização do teste, um IB acompanha o material no qual se deseja esterilizar, passa pelo mesmo processo de temperatura, pressão e/ou gás e tempo determinado que por sua vez matam/inativam os patógenos presentes. Após o processo de esterilização, este IB é ativado (a tira de esporos entra em contato com o meio de cultura) e incubado em incubadora com temperatura ideal, e outro IB não esterilizado, da mesma forma, é colocado na incubadora, este IB não esterilizado é chamado de teste controle. Passadas às 48h, para uma esterilização adequada, o IB esterilizado não deve apresentar mudança de coloração, e o controle altera a sua cor mostrando a presença dos esporos já presentes no IB, comprovando assim a eficácia do IB como também da esterilização. Desta forma, o IB é utilizado como controle para certificar a esterilidade do processo, ou seja, assegurar que os parâmetros de esterilização foram atingidos.

O Indicador Biológico do tipo autocontido consiste de um meio de cultura inoculado com uma suspensão de esporos conhecida e resistente a um método de esterilização específico. O meio de cultura deve possuir características que permitam a germinação de esporos sobreviventes, porém danificados pela ação do calor, ao procedimento de esterilização. O emprego de IB autocontidos facilita o manuseio do usuário, por não permitir a contaminação cruzada e ainda favorece um resultado mais fidedigno, pois os esporos sobreviventes ao processo de esterilização poderão germinar no meio em que foram previamente testados (DLUGOKENSKI, 2008).

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 (SELLA, 2008).

Neste sentido, a avaliação da influência da concentração de glicose e proteína, bem como do sal de azul de bromotimol, indicador de pH, na atividade do

B. atrophaeus em indicadores biológicos autocontidos utilizados no monitoramento de sistemas de esterilização à gás óxido de etileno é o objetivo deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a influência da concentração de glicose e proteína, bem como do sal azul de bromotimol como indicador de pH, na atividade do *B. atrophaeus* em indicadores biológicos autocontidos utilizados no monitoramento de sistemas de esterilização à gás óxido de etileno.

2.2 Objetivos Específicos

- Propor um planejamento experimental para avaliar a influência de diferentes concentrações e combinações dos reagentes glicose, Tryptic soy broth (TSB), e do indicador de pH azul de bromotimol; na produção de Indicadores Biológicos autocontidos utilizados no monitoramento de sistemas de esterilização à gás óxido de etileno.

- Avaliar o desempenho do conjunto das combinações anteriormente propostas pelo planejamento experimental no processo de viragem do IB.

- Sugerir a melhor combinação de concentrações dos reagentes avaliados em função dos resultados dos processos de viragem dos IB, pretendendo assim otimizar a produção de IB para esterilização a gás Óxido de Etileno (EO) em escala industrial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Esterilização

A esterilização é a completa eliminação ou destruição de todas as formas de vida microbiana viáveis, podendo ser realizada por meio de processos físicos ou químicos. As formas microbianas de vida consideradas mais resistentes a processos físicos e químicos e que podem ser manuseadas laboratorialmente são os esporos bacterianos. Portanto, os esporos são utilizados para estabelecer parâmetros para os processos de esterilização (NIEHEUS, 2004).

Se esses esporos são destruídos, supõe-se que os microrganismos contaminantes da carga microbiana também foram mortos, já que estes organismos têm menos resistência do que os esporos, e estão presentes em menor número (ALBERT, et al., 1998).

Os métodos de esterilização permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas em produtos farmacêuticos, médicos hospitalares e alimentícios. O método escolhido depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presente no item considerado. O calor, a filtração, a radiação e o óxido de etileno, podem ser citados como agentes esterilizantes (LENGERT, 2008).

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 (SELLA, 2008).

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”. De acordo com o Ministério da Saúde, 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 (SELLA, 2008).

3.2 Gás óxido de etileno (ETO)

O emprego de substâncias químicas em estado gasoso, na esterilização de material sólido, é o processo em que torna necessário estabelecer condições bem determinadas de temperatura, concentração, umidade, tempo de atuação e número inicial de microorganismos. O gás esterilizante ideal deve apresentar atividades intensas e rápidas contra bactérias, esporos e vírus, se possível à pressão atmosférica; ter inércia total quanto ao material a esterilizar; possuir bom coeficiente de difusão, que confira penetração fácil e completa eliminação após a esterilização. (BRASIL, 1988)

A vantagem primária do ETO é que ele pode esterilizar equipamentos sensíveis ao calor ou à umidade, sem deterioração física do material, sendo sua principal desvantagem a lentidão do ciclo de esterilização, o alto custo e o potencial perigo para pacientes e profissionais. O ciclo básico de esterilização por ETO consiste em cinco estágios (pré-vácuo e umidificação, introdução de gás, exposição, evacuação e esgotamento do gás com ar), sendo o período total de esterilização e aeração de 48h. A aeração mecânica de oito a doze horas entre 50 e 60 graus célsius remove o resíduo tóxico contido em materiais absorventes expostos. A aeração à temperatura ambiente desprende a toxicidade do ETO, mas requer sete dias a 20 graus célsius (LENGERT, 2008).

O óxido de etileno é utilizado frequentemente para esterilizar produtos médicos e odontológicos que não podem ser esterilizados a vapor. O óxido de etileno é incolor, inflamável e explosivo. Misturando ETO (10% a 12%) com dióxido de carbono ou clorofluorcarbono (CFC) reduz-se o risco de explosão ou incêndio (LENGERT, 2008).

O óxido de etileno é um agente alquilante e a atividade antimicrobiana é sugerida pela reação com grupos nucleofílicos, dentre os quais as proteínas e bases nitrogenadas, formando ligações irreversíveis que impedem a duplicação do material genético, inviabilizando a síntese protéica e, portanto, a multiplicação celular. A alquilação é a substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo alquila,

causando injúria ou morte de células vegetativas e esporos microbianos (LAPA, 2011).

3.3 *Bacillus atrophaeus*

Esporos bacterianos são utilizados como indicadores biológicos para monitoramento da esterilização 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 são empregados nos processos de esterilização pelo calor seco, óxido de etileno, calor úmido a baixa temperatura e plasma e também por microondas. Esporos de *Bacillus pumilus* são indicados para validar processos cujo agente esterilizante é a radiação iônica (SELLA, 2008).

O *Bacillus atrophaeus* é um bacilo Gram positivo, com esporos elípticos ou cilíndricos na posição central ou para-central, aeróbico, mesófilo, apatogênico, com temperatura ideal de cultivo de 20°C a 37 °C. Apresenta reação da catalase positiva, reação de Voges Proskauer positiva, fermenta a glicose e hidrolisa o amido. Fenotipicamente é idêntico ao *Bacillus subtilis*, exceto pela produção de pigmentos em alguns meios de cultivo (SELLA, 2008).

3.4 Indicadores biológicos (IB)

Indicador biológico consiste de um preparado de um microrganismo específico, resistente a um determinado processo de esterilização. Ele é usado para qualificação de uma operação física de um aparelho de esterilização, no desenvolvimento e estabelecimento de processo de esterilização validado para um artigo específico, e na esterilização de equipamento, material e embalagens para processamento asséptico. É usado também para monitorar um ciclo de esterilização uma vez estabelecido (LETTRARI, 2005).

Indicadores biológicos têm sido usados há mais de oitenta anos para validar e monitorar processos de esterilização. Consistem de um número conhecido de microorganismos com comprovada resistência ao modo de esterilização. Devem acompanhar a carga de material a ser esterilizada. O crescimento ou não do

microorganismo em condições ideais de incubação, indicará a eficácia da esterilização. Esporos bacterianos são recomendados para a produção de IB, pois são significativamente mais resistentes que a microflora normal aos processos de esterilização. A padronização indica uma população conhecida de esporos com a resistência definida ao agente esterilizante (DLUGOKENSKI, 2008).

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 (SELLA, 2008).

3.5 Substrato

Sabendo-se da maior dificuldade de germinação dos esporos danificados quando submetidos a condições fortemente adversas, o emprego de meios de cultura particularmente ricos em substâncias nutritivas capazes de fornecer condições de recuperação destes esporos sobreviventes deve ser minuciosamente estudado (DLUGOKENSKI, 2008).

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelo agente biológico. Nesse ponto destaca-se, então, a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais da população microbiana envolvida no processo. Buscam-se, então, as fontes adequadas que possuam os componentes necessários ao bom desempenho da célula. Assim, há que se fortificar a matéria-prima com componentes que faltam, retirar aqueles que inibem, de modo a permitir uma rápida e eficiente conversão do substrato em produto com o rendimento desejado (PEREIRA, BOM, FERRARA, 2008).

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 sendo necessária uma suplementação adicionando-se 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 (SELLA, 2008).

A Farmacopéia Americana 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 ou gás Oxido de Etileno. 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 (SELLA, 2008).

Quando o ciclo de esterilização não foi eficiente para destruir os esporos contidos no IB, os sobreviventes irão germinar e se reproduzir quando em contato com nutrientes e temperatura adequados. O metabolismo dos componentes do meio de cultura irá gerar metabólitos ácidos, portanto, a presença de um indicador de pH no meio para a germinação dos esporos nos IB autocontidos permite a fácil visualização da germinação pela mudança de coloração (DLUGOKENSKI, 2008).

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 subcultivos 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 (SELLA, 2008).

A USP (United States Pharmacopeia) salienta que o meio para germinação dos esporos danificados durante o procedimento de autoclavação deve ser avaliado,

pois é submetido a duas autoclações: uma quando é produzido e outra quando acompanha os materiais a serem esterilizados pela autoclave na forma de IB. Portanto pode sofrer alterações na sua composição devido à ação do calor (DLUGOKENSKI, 2008).

3.6 Área de atuação da esterilização por ETO

Uma vez que o óxido de etileno esteriliza os artigos médico-hospitalares sob temperaturas que variam entre 25 °C e 75 °C, a ocorrência de danos é menor. Esse gás não é corrosivo, penetra facilmente nas embalagens e se difunde rapidamente nas superfícies dos artigos (RIBEIRO, 2006).

Neste sentido a esterilização por ETO vem sendo empregada para vários produtos como:

- I. Polímeros: Existem mais de 20 famílias genéricas de materiais poliméricos usados na fabricação de produtos médico-hospitalares. Essas famílias de polímeros têm formulação química diversificada e podem reagir de forma diferente durante contato com vários agentes químicos, desinfetantes e esterilizantes. Enquanto um tipo de esterilizante ou processo de esterilização pode ser compatível com um polímero específico, outro pode agredir o polímero. De modo geral, a probabilidade de danificar um material polimérico é maior com o aumento da concentração do desinfetante/esterilizante, temperaturas mais altas e maior tempo de exposição (RIBEIRO, 2006).
- II. Alimentos: A esterilização de produtos na área alimentícia tem despertado grande interesse em estudos envolvendo a utilização do óxido de etileno como agente ativo, uma vez que a deterioração dos mesmos pode ser ocasionada pela presença de microrganismos. Devido a evidências de contaminação microbiana em especiarias, o emprego do óxido de etileno tem se mostrado importante e sua eficácia está perfeitamente comprovada, desde que sejam definidas corretas condições de concentração gasosa, umidade relativa, temperatura e tempo de exposição (OLIVEIRA, 2000).

- III. Hospitais: Nutrição parenteral é solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios e vitaminas; estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração intravenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

O objetivo principal da nutroterapia parenteral é tratar e prevenir carências nutricionais em pacientes com falência intestinal, ou naqueles que a dieta oral e/ou enteral é insuficiente para manter ou recuperar o equilíbrio do estado nutricional. A infecção de cateter venoso central (CVC) é a complicação mais frequente e quando diagnosticada atinge 5 a 26% das cateterizações venosas (MACHADO, 2010).

Soluções Parenterais de Grande Volume, SPGV, são medicamentos de dose única, destinados às reposições de perdas hídricas, eletrolíticas ou energéticas e utilizados como veículos na administração de medicamentos auxiliares. Sendo as SPGV os medicamentos mais consumidos e utilizados no universo farmacêutico e hospitalar, as etapas de produção das mesmas, e em especial da autoclavação terminal, devem ser rigorosamente controladas por protocolos microbiologicamente avaliados, pois, a menor contaminação microbiana ou a presença de endotoxinas, resultante de crescimento bacteriano pode comprometer a saúde do usuário e da coletividade (ISHII, 2006).

3.7 Colorimetria

Existem diversos métodos para análise de cor em alimentos, porém os mais utilizados em laboratórios e indústrias são a colorimetria e a espectrofotometria. A colorimetria é a ciência da medida de cores que estuda e quantifica como o sistema visual humano percebe a cor, na tentativa de especificá-la numericamente visto que estímulos diferentes são percebidos de forma semelhante por observadores. Os

colorímetros usam sensores que simulam o modo como o olho humano vê a cor e quantificam diferenças de cor entre um padrão e uma amostra. Utilizam para isso sempre a mesma fonte de luz e método de iluminação, para que as condições de medida nunca mudem (CARRILHA, GUINÉ, 2010).

Quando uma cor é classificada com o uso de um colorímetro, ela é expressa em termos de:

Tonalidade – intervalo de longitude da onda em que se descreve a cor.

Brilho – é a luminosidade, faz a cor parecer mais clara.

Saturação – grau de pureza.

Na medição da cor são utilizados vários sistemas sendo que, o sistema $L^* a^* b^*$ ou sistema CIELab é o mais amplamente utilizado, e compreende três coordenadas retangulares:

L^* mede a variação da luminosidade entre o preto (0) e o branco (100) corresponde ao claro e ao escuro.

a^* é uma das coordenadas da cromaticidade, e define a cor vermelha para valores positivos e a cor verde para valores negativos.

b^* é a coordenada da cromaticidade, que define a cor amarela para valores positivos e a cor azul para valores negativos (CARRILHA, GUINÉ, 2010).

3.8 Planejamento experimental

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo (BUTTON, 2005).

O delineamento de experimentos tem como objetivo a determinação do número ideal de experimentos que leve à obtenção de resultados com um dado grau de confiabilidade (BUTTON, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na empresa Clean-Up Biotecnologia, localizada em Campo Mourão – PR.

4.1 Planejamento experimental

Para avaliar a influencia da concentração dos nutrientes (TSB e glicose) presentes no meio de cultivo do IB, bem como, do indicador de pH azul de bromotimol, no processo de viragem do IB foram determinados 3 níveis de concentração conforme apresenta a Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações determinadas para as variáveis.

Fator	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Glicose (g/L) (A)	2,5	3,25	5,0
TSB (g/L) (B)	5,0	7,5	10,0
Azul de bromotimol (g/L) (C)	0,05	0,10	0,15

Após seleção dos principais componentes do meio que afetam o desenvolvimento do microorganismo, foi feita a combinação dos mesmos de acordo com uma metodologia estatística (Planejamento Fatorial), que permite o planejamento dos experimentos. Desta forma, os efeitos de vários componentes podem ser determinados simultaneamente, com um número relativamente pequeno de experimentos. O Planejamento Fatorial de experimentos baseia-se no estudo de dois parâmetros do processo. São eles os “fatores” e os “níveis”. Fatores são as variáveis estudadas e, no presente trabalho estas variáveis são a proteína (TSB), a glicose e o azul de bromotimol. Já os níveis são as diferentes condições estudadas para cada fator. Geralmente são utilizados níveis superiores (+1), inferiores (-1) e centrais (0) (PEREIRA, BOM, FERRARA, 2008).

Assim, a partir da Tabela 1 que define os fatores e seus níveis, obteve-se um planejamento experimental de Box-Behnken para as 3 variáveis; o modelo avalia o efeito de cada variável independente para uma resposta. A Tabela 2 apresenta o

planejamento experimental proposto. As respostas obtidas a partir de cada experimento foram o tempo de viragem e a intensidade da cor amarela resultante da viragem.

Tabela 2: Planejamento experimental de Box-Behnken para as 03 variáveis apresentadas na Tabela 1.

Ensaio	Composição do meio de cultura		
	Glicose	TSB	Azul de bromotimol
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Para tanto foi utilizado o Statistica (data analysis software system), version 7.1. Os resultados estão apresentados a seguir em Tabelas e gráficos de superfície de resposta. O efeito de cada fator e das suas interações foi obtido com ANOVA (95% e 99%).

A análise de variância permitiu verificar se os principais efeitos dos fatores e das interações foram significativos. Esta análise também foi utilizada para avaliar numericamente a qualidade de ajuste do modelo obtido a partir dos dados experimentais. O maior valor possível de R^2 (coeficiente de determinação) é 1,0 e só ocorrerá se não houver resíduo algum e, portanto, se toda a variação em torno da média for explicada pela regressão. Melhor será o ajuste do modelo aos dados observados quanto mais perto de 1,0 estiver o valor de R^2 .

4.2 Preparação dos IB de acordo com o planejamento experimental proposto.

Para cada ensaio foi produzido 1 litro do meio de cultura desejado conforme as combinações apresentadas na Tabela 2. Os componentes do meio foram pesados em balança analítica AL 500C com 3 casas decimais e homogêneos em 1 litro de água destilada em agitador magnético durante 30 min, com auxílio do pHmetro corrigiu-se o pH para 6,7 adicionando ácido clorídrico 0,1 N (HCl), após homogeneização durante 15 min, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave Cristófoli HE 3000 à 1.0 kgf/cm², 121°C por 8 min.

Em fluxo laminar estéril, as ampolas testes de IB foram montadas em triplicata. Tiras de papel contendo $1,5 \times 10^6$ UFC de esporos de *Bacillus atrophaeus* (NANSA, Lote: N30800) foram colocadas dentro de ampolas plásticas estéreis com auxílio de uma pinça estéril, logo após adicionou-se 1,0 mL do meio de cultura utilizando micropipeta automática, então os IB foram fechados com uma tampa contendo um filtro de papel estéril.

4.3 Teste de viragem

Logo após serem montados, os IB foram identificados e incubados a temperatura de 35°C a 39°C em incubadora Cristófoli modelo Clean-Test para o teste de viragem, ou seja, a observação da mudança de cor (verde para amarelo) monitorando-os a cada 30 minutos e anotando o tempo de viragem; tempo necessário para que o meio de cultura passasse de verde para amarelo.

4.4 Análise colorimétrica

Após 48h de incubação, o meio de cultura dos IB foram avaliados em relação a intensidade de cor após a viragem. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 0,6 mL das ampolas testes e adicionados 0,5 mL de água destilada, então o meio diluído foi transferido para o porta amostra do colorímetro Mini Scan EZ e feita a leitura.

Para cada experimento foi realizado também a análise colorimétrica do meio de cultura preparado (verde) antes de este entrar em contato com a tira de papel contendo os MO.

5 RESULTADOS

Os resultados de cor e tempo de viragem, obtidos após a realização dos experimentos propostos pelo planejamento experimental são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados de cor (antes e após viragem) e tempo de viragem.

Ensaio	Cor do meio de cultura antes da viragem			Cor do meio de cultura após a viragem (48h) (Média das triplicatas).			Tempo (Média das triplicatas).
	L* (luminosidade)	a* (verde para vermelho)	b* (azul para amarelo)	L* (luminosidade)	a* (verde para vermelho)	b* (azul para amarelo)	Horas
1	78,37	- 4,52	14,90	81,85	- 3,31	18,69	18:00
2	79,51	- 4,65	15,20	80,50	- 3,15	27,02	17:30
3	78,67	- 4,57	15,09	81,20	- 3,18	27,76	19:00
4	77,89	- 4,33	14,86	82,93	- 3,52	28,88	23:00
5	79,80	- 3,10	16,41	84,41	- 2,52	21,35	18:30
6	78,05	- 2,90	16,05	83,19	- 3,18	26,93	21:30
7	75,30	- 5,92	14,78	81,28	- 2,84	20,43	18:30
8	76,00	- 5,80	14,50	81,40	- 3,65	29,55	22:00
9	78,79	- 2,94	16,22	82,23	- 3,41	22,25	18:00
10	79,40	- 2,80	16,32	83,47	- 3,06	27,82	21:00
11	74,59	- 6,20	14,38	81,44	- 2,80	21,99	18:00
12	76,06	- 5,67	13,95	81,10	- 3,26	29,38	21:30
13	77,90	- 4,29	15,29	81,25	- 3,49	28,11	19:30
14	77,20	- 4,38	15,31	80,41	- 3,41	29,47	19:30
15	78,34	- 4,22	15,17	80,89	- 3,31	29,09	20:00
Média	77,72	- 4,42	15,23	81,82	- 3,21	25,91	19:42
Desvio	1,58	1,13	0,74	1,27	0,37	3,81	1,72

Analisando a Tabela 3, após as 48h dos testes incubados, podemos observar que há uma variação na coloração do meio, com maior intensidade nos valores de b* comparando o inicial com o final, também vemos que possui desvio padrão maior que os outros parâmetros L* e a*, mostrando que as combinações entre diferentes concentrações do meio de cultura alteram a cor da viragem do IB já que esses

valores de b^* representam a tonalidade da cor amarela do meio. Isto já era esperado, pois o valor de b^* mostra a escala de coloração de azul para amarelo, e como o meio de cultura tende a ficar amarelo após a viragem esperava-se maiores valores para b^* .

O tempo final de viragem, ou seja, o tempo gasto para que o *Bacillus atrophaeus* germine e produza uma quantidade suficiente de ácido para diminuir o pH do meio e este mudar de verde para amarelo, também é alterado em função da combinação das variáveis do meio de cultura, conforme mostra a Tabela 3.

Analisou-se a seguir os valores de b^* e o tempo de viragem do IB, em função das variações das concentrações do meio de cultura.

5.1 Análise dos resultados referentes à intensidade da cor de viragem (valor de b^*).

Para analisar a influencia da concentração dos compostos do meio bem como da combinação destes na intensidade do amarelo (cor de viragem), foram avaliados os resultados referentes ao parâmetro b^* obtido da análise de colorimetria após 48h apresentados na Tabela 3.

A Tabela 4 apresenta a análise de variância relativa aos valores de b^* .

Tabela 4: ANOVA para os valores de b^*

ANOVA b^*						
Fonte	SQ (soma dos quadrados)	GL (grau de liberdade)	QM (quadrado médio)	Teste F	F (5%)	Valor p
Regressão	196,9668	8	24,6208	25,5785	4,1468	<u>0,0004</u>
Resíduo	5,7754	6	0,9626			
Falta de ajuste	4,7931	4	1,1983	2,4397	19,2468	<u>0,3112</u>
Erro puro	0,9823	2	0,4911			
Total	202,7421	14				
R^2 ajustado	0,93					

A partir dos valores de p para a regressão, o qual deve ser menor que 0,05 e, falta de ajuste, que deve ser maior que 0,05, observa-se que existe diferença significativa com confiança de 95% entre os ensaios realizados e o ajuste R^2 está conforme. Baseando-se nisso, os resultados da ANOVA apresentados na Tabela 4,

indicam que o modelo polinomial obtido para o parâmetro b^* (intensidade do amarelo) tem alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,93$), sugerindo um bom ajuste com o modelo obtido.

Assim temos a equação 1 para o valor de b^* :

$$b^* = 25,17 + 3,01 A + 1,02 A^2 + 2,98 B + 0,62 B^2 + 0,36 C + 1,14 C^2 - 1,80 A B + 0,89 A C \quad (1)$$

A Figura 1 apresenta uma comparação entre os resultados encontrados e os previstos pela equação 1.

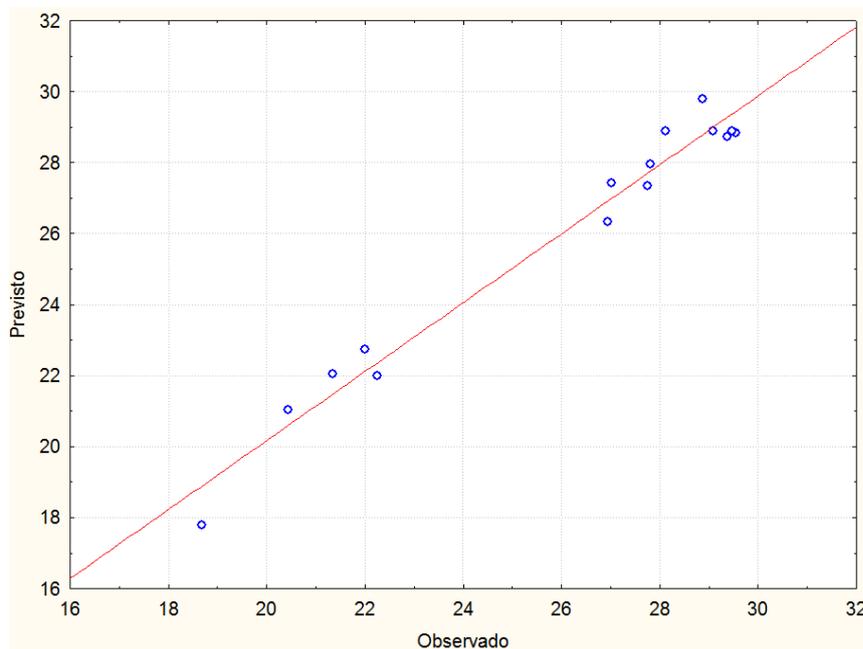


Figura 1: Comparação entre os resultados previstos pela equação e os resultados encontrados experimentalmente para os valores de b^* (Previsto/observado).

Analisando a Figura 1 observa-se boa proximidade entre os resultados encontrados experimentalmente e os previstos pela equação 1, confirmando a sugestão de que houve um bom ajuste para o parâmetro b^* analisado.

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam as curvas de níveis que permitem avaliar a influência das variáveis no resultado do parâmetro b^* .

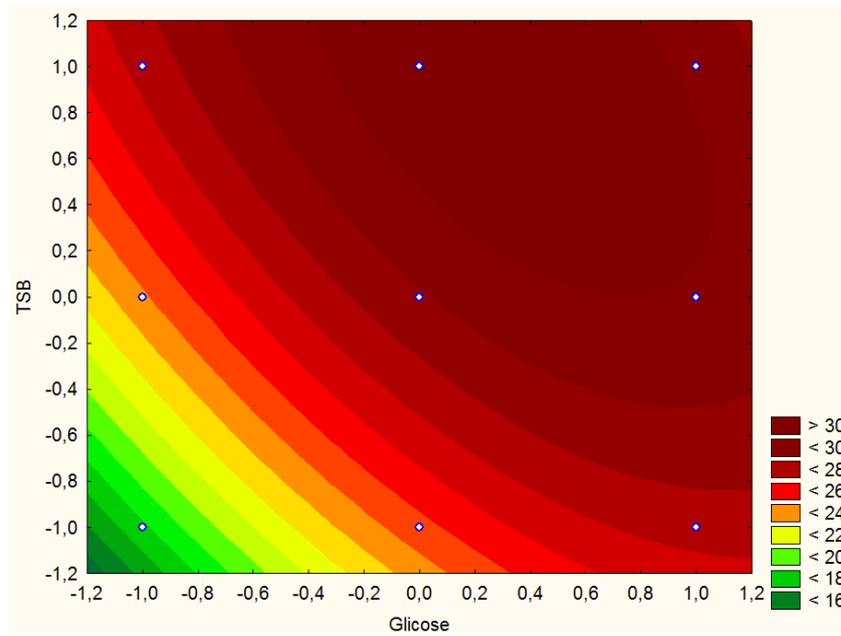


Figura 2: Curvas de níveis Glucose X TSB para o valor de b^* .

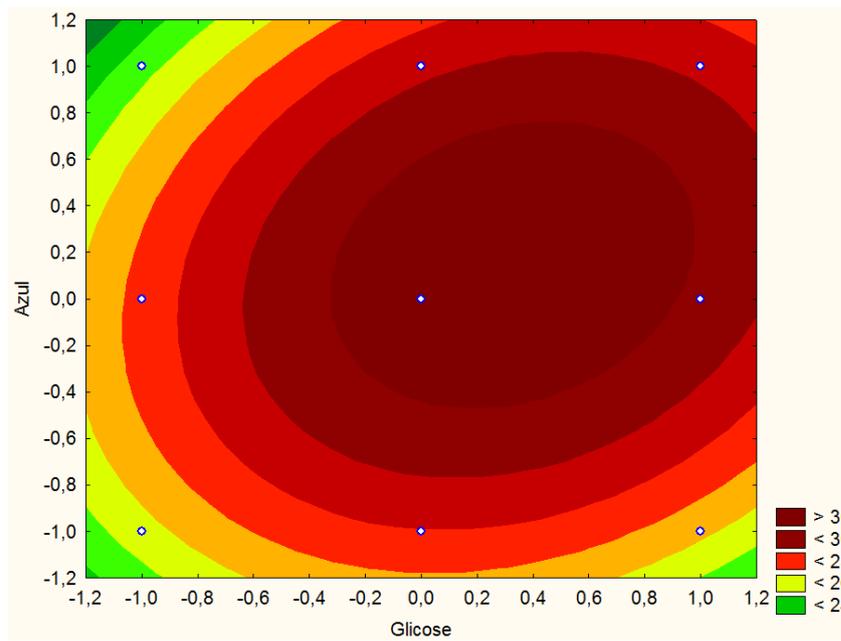


Figura 3: Curvas de níveis Glucose X azul de bromotimol para o valor de b^* .

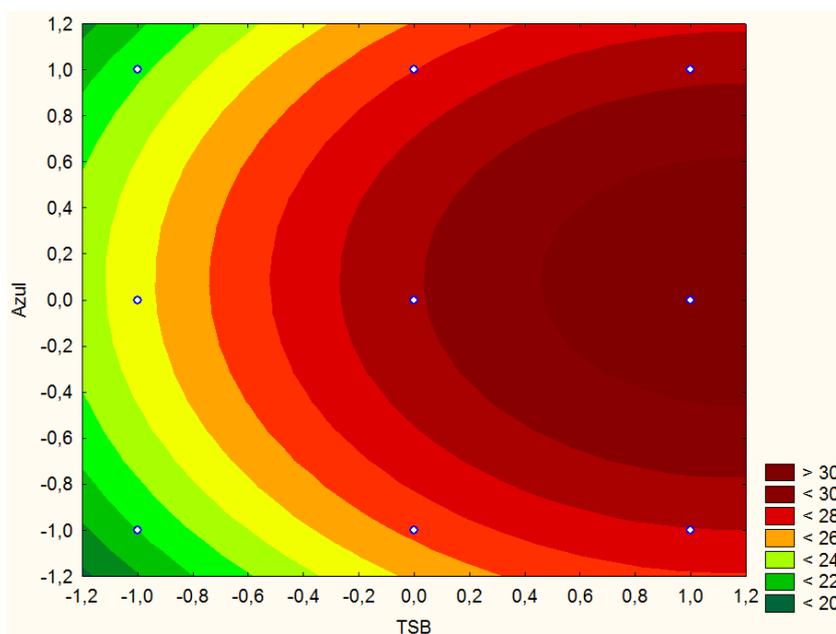


Figura 4: Curvas de níveis TSB X azul de bromotimol para o valor de b^* .

Analisando as Figuras 3 e 4 observa-se que são indicadas concentrações intermediárias do azul de bromotimol para obter valores mais elevados no parâmetro b^* . Sabemos que o azul de bromotimol é responsável pela cor do meio, sendo que, em pH próximo ao valor 7, o meio adquire a coloração verde e com o pH próximo a 6, o meio torna-se amarelo. Para que estas colorações sejam evidenciadas, vemos então, que são indicadas concentrações intermediárias.

SELLA (2008), relata que quantidades elevadas de azul de bromotimol em seu trabalho para produção de esporos de *Bacillus atrophaeus* inibiram o crescimento em 100%.

Na Figura 2, observou-se que para as variáveis glicose e TSB, são necessárias concentrações entre intermediárias e altas. Essas variáveis são mais importantes, pois são os nutrientes utilizados pelo *Bacillus atrophaeus* para a sua germinação e conseqüentemente a produção dos ácidos, fundamental para a mudança da coloração do IB. São os ácidos produzidos que reduzem o pH a níveis em que o azul de bromotimol passe a apresentar uma coloração amarelada e não mais esverdeada.

A produção de ácido por *Bacillus* tem sido reportada por Nobre e colaboradores (2007) que destacam que a bactéria *B. subtilis* ativa ou tratada por

irradiação também se destacou na produção de ácidos, apresentando concentrações de acidez total e voláteis intermediárias.

Santos (2011), também relata que bactérias dos gêneros *Bacillus* possuem a capacidade de produção de ácidos resultantes do metabolismo para a germinação, tais como ácido acético e ácido láctico.

Em relação ao processo de germinação a literatura apresenta que, após o procedimento de inoculação, a célula desenvolve seu metabolismo, a fim de produzir energia para suportar suas reações biossintéticas e de manutenção energética. As moléculas-combustíveis (carboidratos, lípidios, proteínas) utilizadas pela célula contêm elevado nível de energia química, devido ao seu alto grau de ordem estrutural; sendo que os carboidratos são as principais fontes de carbono e energia para os microrganismos, e a glicose a mais fácil e amplamente utilizada, seguida por frutose, manose e galactose (PEREIRA, BOM, FERRARA, 2008).

Assim pode-se dizer que a glicose é fundamental para a reprodução do *Bacillus atrophaeus*, vemos nas figuras 2 e 3 que para obtermos um valor próximo de 30 para o valor de b^* , cuja cromaticidade esta ligada a cor amarela, no gráfico representada pela cor vermelho escuro, são necessárias quantidades mais elevadas de glicose para que haja uma coloração ideal, concordando com a literatura estudada.

O *Bacillus atrophaeus* metaboliza as proteínas e carboidratos presentes no TSB, que também resultam na produção do ácido. As proteínas e os carboidratos são necessárias tanto para a redução do pH, quanto para a manutenção do mesmo, pois após a viragem do IB, ele deve permanecer com a cor amarela, até completar o ciclo de 48 horas após a incubação, atendendo assim a norma vigente para indicadores biológicos a oxido de etileno (ISO – 11138 – 2, 2006).

Os ácidos são voláteis, e a incubação do IB aumenta a volatilidade por ficar exposto a temperatura próxima aos 37°C, sendo necessário que os nutrientes ali presentes estejam em quantidades suficientes para manter o pH na faixa de 6,0 durante as 48h, caso contrário pode ocorrer como no ensaio 01, que aconteceu a mudança de cor para amarelo mas, e antes do tempo determinado (48h) voltou para cor verde por não haver mais nutrientes para a produção do ácido. Podemos observar na Figura 5 a mudança de cor do IB antes das 48h pela evaporação do

ácido, observa-se que o meio de cultura na parte superior está amarelo enquanto embaixo está ficando verde.



Figura 5: IB com mudança de coloração pela evaporação do ácido e falta de nutrientes antes das 48h.

5.2 Análise dos resultados referentes ao tempo de viragem do IB

A Tabela 5 apresenta a análise de variância dos resultados referentes ao tempo de viragem do IB.

Tabela 5: ANOVA para valores do tempo de viragem

ANOVA						
Fonte	SQ (soma dos quadrados)	GL (grau de liberdade)	QM (quadrado médio)	Teste F	F (5%)	Valor p
Regressão	39,9433	6	6,6572	36,5597	3,5806	0,00002
Resíduo	1,4567	8	0,1821			
Falta de ajuste	1,2901	6	0,2150	2,5801	19,3295	0,3055
Erro puro	0,1667	2	0,0833			
Total	41,4000	14				
R ² ajustado	0,94					

A partir dos valores de p para a regressão, o qual deve ser menor que 0,05 e, falta de ajuste, que deve ser maior que 0,05, observou-se que existe diferença

significativa com confiança de 95% entre os ensaios realizados e o ajuste R^2 está conforme. Baseando-se nisso, os resultados da ANOVA apresentados na Tabela 5, indicam que o modelo polinomial obtido para o tempo de viragem tem alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,94$), sugerindo um bom ajuste com o modelo obtido.

$$\text{Tempo} = 19,69 + 1,25 A + 1,63 B + 0,20 B^2 + 0,13 C - 0,17 C^2 + 1,13 A B \quad (2)$$

A Figura 6 apresenta a comparação entre os valores previstos pela equação 2 e os observados experimentalmente.

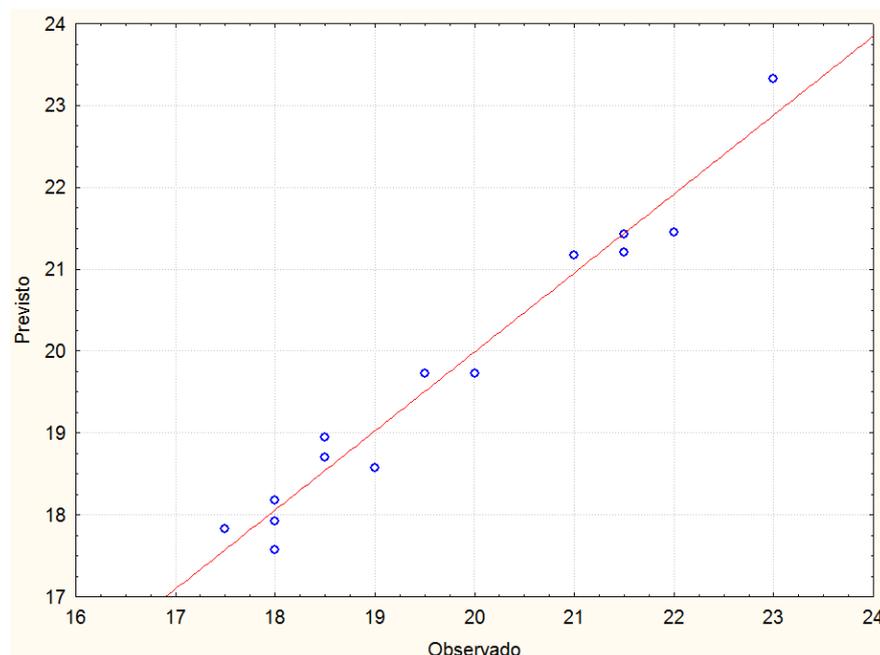


Figura 6: Comparação entre os resultados previstos pela equação e, os resultados encontrados experimentalmente para os valores do tempo de viragem em horas (Previsto/observado).

Analisando a Figura 6, observa-se a proximidade entre os resultados encontrados experimentalmente e os previstos pela equação 2, concordando com posição de que houve um bom ajuste para o parâmetro dos valores do tempo de viragem do IB.

As Figuras 7, 8 e 9, apresentam as curvas de níveis que permitem avaliar a influência das variáveis no resultado do tempo de viragem.

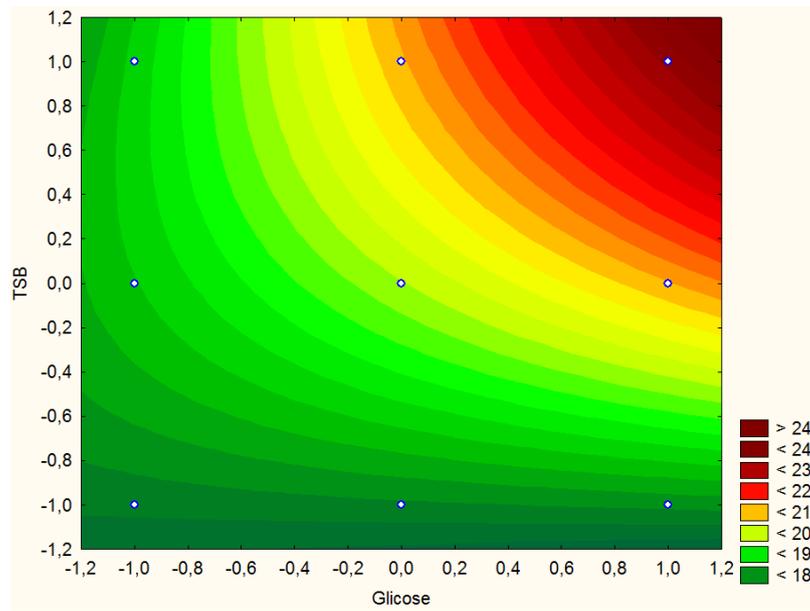


Figura 7: Curvas de níveis Glucose X TSB para o tempo de viragem do IB.

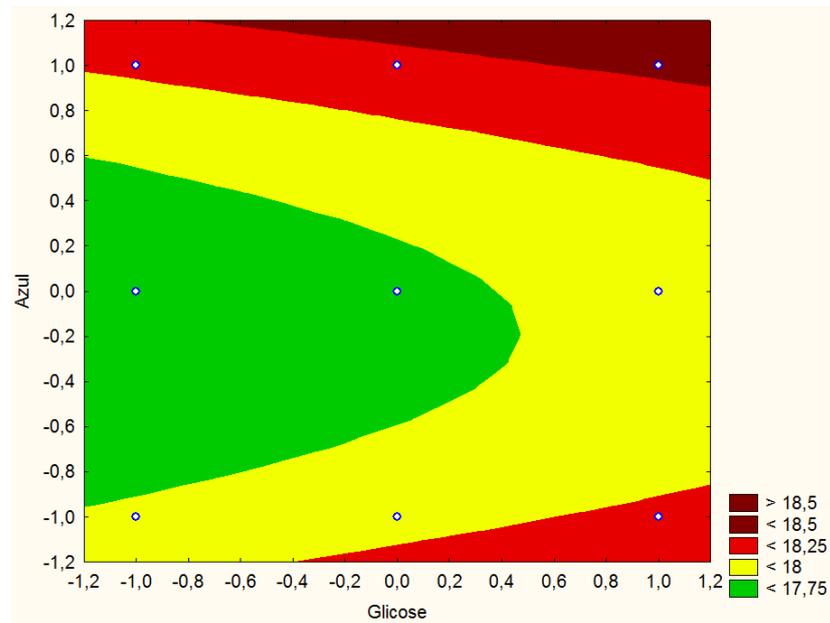


Figura 8: Curvas de níveis Glucose X Azul de bromotimol para o tempo de viragem do IB.

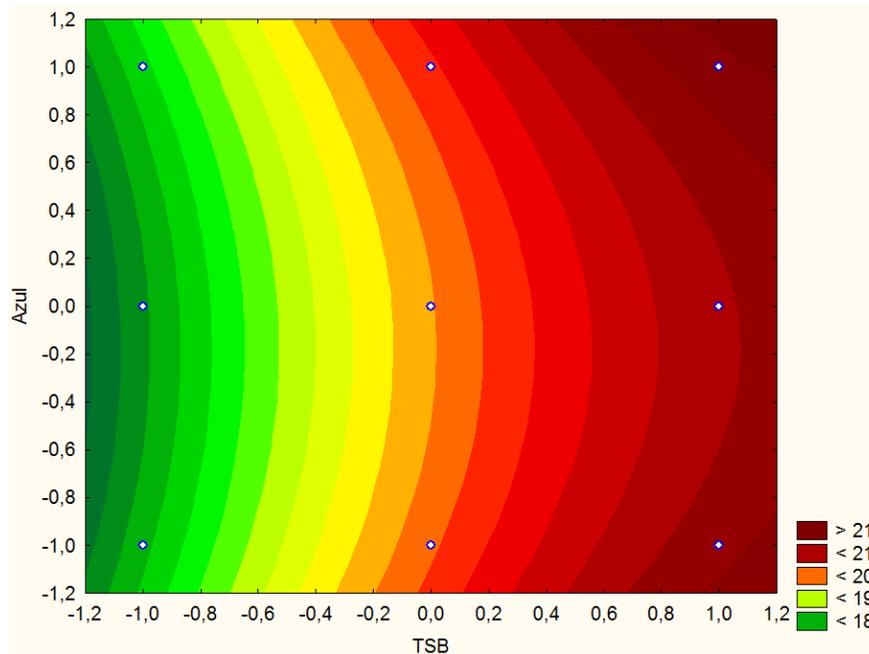


Figura 9: Curvas de níveis TSB X Azul de bromotimol para o tempo de viragem do IB.

Observou-se que para o tempo de viragem do indicador biológico ser otimizado (ser menor), as concentrações de glicose e de azul de bromotimol testadas influenciaram muito pouco nos resultados obtidos, observa-se na Figura 8 que se adicionarmos quantidades elevadas dos mesmos, obteve-se um tempo de viragem maior mas o aumento não é significativo, e por outro lado, níveis baixos de azul de bromotimol são satisfatórios, pois este não participa do desenvolvimento no microorganismo, mas como já apresentado pela literatura altas concentrações atrapalham a velocidade de germinação do microorganismo, consequentemente a velocidade da reação de produção de ácido e o tempo de viragem. Comparadas com o TSB, essas variáveis não modificam expressivamente o tempo de viragem do IB.

As Figuras 7 e 9 mostram que, quanto maior a concentração de TSB no meio, maior também é o tempo de viragem do IB, tendendo a um tempo elevado o que não é interessante.

Alguns trabalhos mostram o uso de baixas concentração de proteínas (TSB).

Quevedo e colaboradores (1999) que compararam dois meios de cultura para *B. subtilis* nos quais, um meio convencional de peptona e outro com hidrolisado proteico de *Chlorella vulgaris* como alternativo, ambos com concentrações de 1%,

2%, e 3%, sendo que apresentaram melhor rendimento os meios contendo 3% de peptona e também 3% de hidrolisado proteico de *Chlorella vulgaris*.

Porém vale salientar que a glicose, como fonte de energia fácil para o *Bacillus atrophaeus* metabolizar, e a fonte mais rápida para o mesmo desenvolver-se, deve ser utilizada em quantidades mais elevada, pois a glicose seria o “*starter*”, a propulsora da germinação e portanto, tornando-a mais rápida.

Foester (1983) mostra que a glicose é o açúcar mais efetivo para a estimulação da germinação.

Assim, o TSB com elevadas concentrações, diminui a velocidade da reação e concentrações menores de TSB conforme indicado nas Figuras 7 e 9, oferecem resultados mais satisfatórios para o tempo de viragem do IB.

5.3 Meio de cultura ideal

A Figura 10 apresenta a análise conjunta dos resultados para obtenção do meio de cultura ideal, ou seja, melhor coloração e menor tempo de viragem.

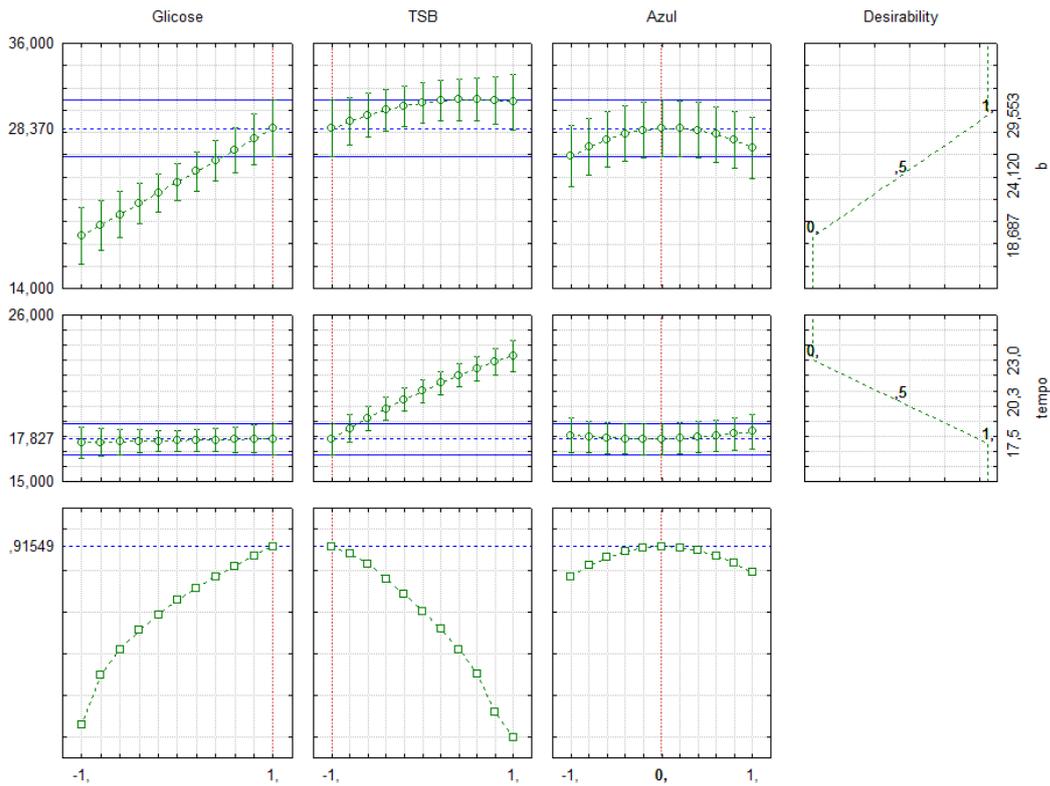


Figura 10: Análise do valor de b^* e do tempo de viragem para obtenção das concentrações e combinações ideais dos fatores analisados (TSB, glicose e azul de bromotimol).

Observa-se pela figura 10 que, para obter um indicador com uma coloração mais intensa (valor de b^* maior), deve-se empregar a glicose no máximo, TSB e azul intermediariamente. Já para um menor tempo final de viragem, observa-se a necessidade de quantidades mais baixas para o TSB; enquanto que a glicose e o azul de bromotimol não interferem significativamente no tempo de viragem do IB. Portanto, pode-se sugerir que, para se obter melhores resultados para intensidade de cor de viragem e tempo de viragem, a combinação ideal verificada é concentrações mais elevadas para glicose; baixas concentrações para TSB e concentração intermediária para o azul de bromotimol, dentre as combinações e concentrações avaliadas neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Através dos experimentos pode-se observar que as variáveis estudadas realmente são capazes de afetar a cor de viragem e o tempo de viragem dos IB dependendo da concentração em que são utilizadas.

Sendo assim é possível otimizar a resposta do IB ao teste de viragem empregando concentrações adequadas de glicose, TSB e azul de bromotimol.

Após a realização dos experimentos com as diferentes concentrações das variáveis, pode-se concluir que, para um melhor desempenho do indicador biológico utilizado no monitoramento da esterilização a óxido de etileno, o meio de cultura deve ser composto de 5g/L de glicose, 5g/L de TSB e 0,10g/L de azul de bromotimol.

Essas concentrações definidas como ideais, foram estudadas no experimento 02 do planejamento experimental, onde se verifica que os resultados esperados, estão muito próximos aos encontrados, 17:30h para ocorrer a viragem do IB (verde para amarelo) e obter um valor de b^* 27,02, mantendo a coloração amarela até completar as 48 horas de incubação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, H.; DAVIES, D.J.G.; WOODSON L.P.; SOPER C.J. **Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme.** Journal of Applied Microbiology. St Paul, v. 85, p. 865-874, June 1998.

BRASIL, Ministério do Estado da Saúde. Farmacopéia Brasileira São Paulo, 1988.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados.** Programa de pós-graduação em engenharia mecânica - Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Mecânica. 2005. Disponível em: <<http://pessoal.utfpr.edu.br/lincolnngusmao/arquivos/Planejamento%20Experimental.pdf>>. Acesso em: 26 Nov. 2012.

CARRILHA, F. GUINÉ, R. **Avaliação da cor de peras secadas por diferentes métodos.** 2010. Disponível em: <http://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/1356/1/2010_Viseu_Acta_Poster%20Fatima%20cor.pdf>. Acesso em: 27 Nov. 2013.

CEFAR. **Bacillus Atrophaeus.** São Paulo. 2010. Disponível em: <<http://www.cefar.com.br/download/jornal%2038edfinal2.pdf>>. Acesso em: 22 Out. 2012.

DLUGOKENSKI, R. E. F. **Emprego de resíduo agroindustrial na germinação de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 danificados pelo calor úmido sob pressão.** 2008. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2008. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/24408/dissertacao%20Regina%20Elizabete%20Ferreira%20Dlugokenski.pdf;jsessionid=0FF965272F44871A0DE54DEF4F3F24D5?sequence=1>>. Acesso em: 18 Out. 2012.

FOESTER, H. **Activation and germination characteristics observed in endospores of thermophilic strains of *Bacillus*.** 1983. Disponível em : <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00407754>>. Acesso em: 25 Out. 2012.

ISHII, M. **Aplicação da Proteína Verde Fluorescente, GFPuv, como indicador biológico na validação da autoclavação de soluções parenterais e da esterilização por óxido de etileno de itens termolábeis. Comparação com**

esporos de Bacillus subtilis. 2006. Tese (Graduação em Tecnologia Bioquímico) - Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímico – Farmacêutica, Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006. Disponível em: < http://ged1.capes.gov.br/CapesProcessos/926571-ARQ/926571_6.PDF>. Acesso em: 25 Out. 2012.

ISO 11138-2:2006. **Biological indicator for ethylene oxide sterilization.** 2006.

LAPA, S. M. **Aplicação do polietileno nas embalagens utilizadas na indústria farmacêutica e os efeitos causados pela esterilização.** 2011. Conclusão de curso (Produção de Plásticos) - Graduação no curso de Produção de Plásticos, Faculdade de Tecnologia da Zona Leste, 2011. Disponível em: http://www.fateczl.edu.br/cariboost_files/PDF_20_20tcc_20completo_20_C3_BAltima_20revis_C3_A3o.pdf>. Acesso em: 21 Out. 2012.

LENGERT, H. P. **Desinfecção e esterilização. 2008. Trabalho de Conclusão (Curso de Formação de Oficiais do Serviço de saúde)** - Especialização em Aplicações Complementares às ciências Militares, Escola de Saúde do Exército, 2008. Disponível em: <http://www.essex.ensino.eb.br/doc/PDF/PCC_2008_CFO_PDF/CD49%201%BA%20Ten%20AL%20HUMBERTO%20POLL%20LENGERT.pdf>. Acesso em: 20 Out. 2012.

LETTARI, Juliana. **Determinação dos parâmetros microbiológicos Bioindicador “Clean-Test”.** 2005. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2005.

MACHADO, de C. Juliana. **Nutroterapia parental, crescimento de biofilmes e fatores associados à infecção do cateter venoso central.** 2010. Tese (Doutor em clínica médica) – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-20102010-141725/publico/tese.pdf>>. Acesso em: 01 Mai. 2013

Ministério da Saúde. Portaria 272 da secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento para a Terapia de Nutrição Parenteral. Brasília, 1998

NIEHEUS, Rosivete C. **Autoclaves Verticais: uma Proposta de Sistema para Garantia do Processo de Esterilização.** 2004. 74f. Dissertação (Mestrado em engenharia Elétrica) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. Disponível em: < <http://www.tede.ufsc.br/teses/PEEL0948.pdf> >. Acesso em: 20 Out. 2012.

NOBRE, T. de P.; HORRI, J.; ALCARDE, A. R. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** Ciência e Tecnologia de alimentos. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/03.pdf>>. Acesso em: 28 Dez. 2013.

OLIVEIRA, C. de Débora. **Esterelização por óxido de etileno : estudo da efetividade esterilizante de misturas não explosivas e compatíveis com a camada de ozônio.** Mestrado (Fármaco e medicamentos) – Universidade de São Paulo faculdade de ciências Farmacêuticas. 2000. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-30092011-122525/pt-br.php>>. Acesso em: 02 Mai. 2013.

PEREIRA, N. J., BON, E. P. da S., FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos.** Escola de Química – UFRJ. Séries em Biotecnologia, v. 1. Rio de Janeiro. 2008.

PINTO, T. de J. A. SAITO, T. **Esterilização por óxido de etileno. I. Influência do meio de esporulação na resistência dos esporos de *Bacillus subtilis* var. niger.** 1992. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rsp/v26n6/02.pdf>>. Acesso em: 15 Out. 2012.

QUEVEDO, H. J. M. PARDO, A. S. ARCEO. A. A. **Utilización de um hidrolisado de *Chlorella Vulgaris* em la formulación de medios de cultivos de *Bacillus Subtilis*.** Tcnología Química. 1999. Disponível em: <<https://ojs.uo.edu.cu/index.php/tq/article/viewFile/1766/1308>>. Acesso em: 15 Nov. 2013.

RIBEIRO, M. C. P. Silma. **Reprocessamento de cateteres de angiografia cardiovascular após uso clinico e contaminados artificialmente: avaliação da eficácia da limpeza e da esterilização.** 2006. Tese (Doutor em enfermagem) – Enfermagem na saúde do adulto 2006. Disponível em : <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7139/tde-02102006-161212/pt-br.php>>. Acesso em: 02 Mai. 2013.

SANTOS, G. de O. F. dos. **Aplicação da técnica de hibridização fluorescente (FISH) para detecção de *Bacillus* ssp.** Pós graduação em microbiologia agrícola – Universidade Federal de Viçosa. 2011. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/36/TDE-2012-01-23T115514Z-3504/Publico/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 12 Ago. 2013.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2001.

SELLA, S. R. B. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de esporos termorresistentes de *Bacillus atrophaeus***. 2008. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2008. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/17293/disserta%C3%A7%C3%A3osandrasella.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 Out. 2012.