

Introdução

É importante desenvolver um método de esterilização que possa ser empregado em materiais sensíveis a altas temperaturas e que não interfira na sua composição, sendo capaz de inativar microrganismos altamente resistentes (Zhang et al., 2006).

Dentre os fluidos supercríticos, o CO₂ tem sido mais utilizado por ser não-tóxico, não-inflamável, de custo relativamente baixo, facilmente removido e por apresentar propriedades críticas em condições moderada (White et al., 2006, Garcia-Gonzalez et al., 2007).

Metodologia

Para dar início ao tratamento, uma solução de esporos do *Bacillus subtilis* foi aplicada na superfície dos implantes metálicos de aço inoxidável. O suporte contendo os implantes foi então inserido no reator, cuja temperatura foi previamente ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado.



Figura 1. Novo suporte para colocação dos implantes-teste.

Fechou-se a tampa e iniciou-se o bombeamento de CO₂.



Figura 2. Equipamento para processos com fluido supercrítico

Após o tratamento, os implantes foram coletados e transferidos para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada para a realização da contagem microbiológica.

Foram feitas então diluições seriadas a fim reduzir o número de microorganismos por unidade de volume e possibilitar a contagem.

Para realizar a contagem, inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri separadas, estéreis e vazias e então adicionou-se o meio de cultura.

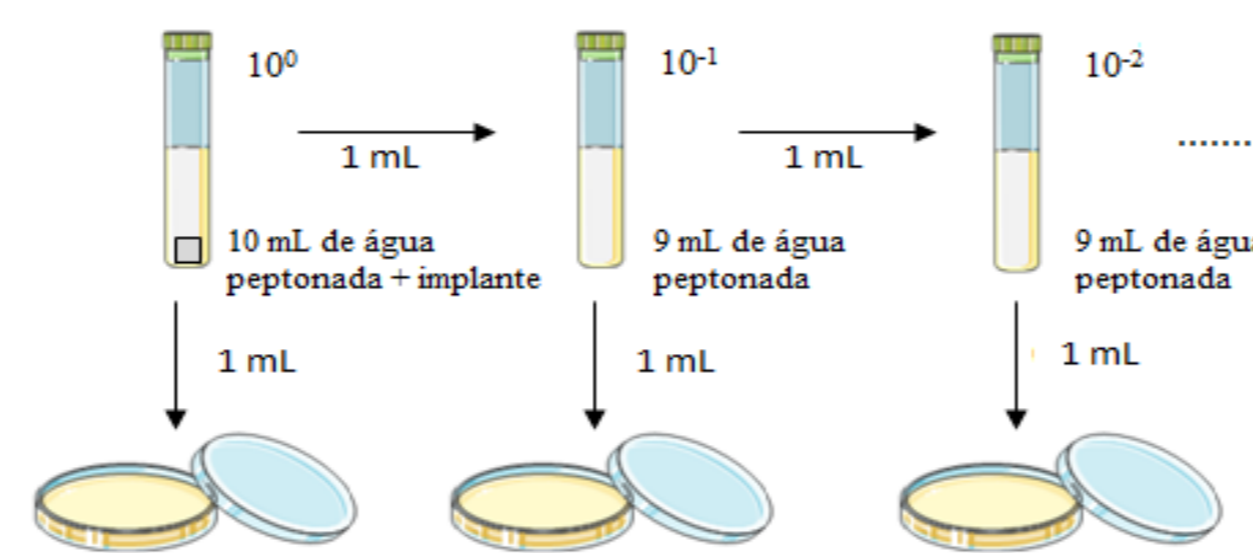


Figura 3. Esquema geral de análise para contagem padrão de *B. subtilis* em placas

Resultados e Discussão

Os primeiros ensaios de esterilização com CO₂-SC foram realizados à 300 bar, com tempo de tratamento de 2 e 3 horas, sob temperatura constante de 60°C. À pressão constante, o CO₂ não se mostrou eficaz na inativação dos esporos, entretanto, foi possível observar que o aumento do tempo de tratamento influencia na redução da contagem dos esporos.

Diante dos resultados obtidos nos primeiros testes, optou-se realizar experimentos com ciclos de pressão e despressurização. Sendo assim, para os experimentos realizados em seguida foram utilizados ciclos de pressão, com tempo total de tratamento de 2 horas. Para cada ciclo a variação de pressão era de 300 bar.

Os ciclos de pressão se mostraram eficientes em reduzir ao menos um ciclo na contagem dos esporos. Pôde-se observar também que a utilização de ciclos de pressão se mostra mais eficiente na redução da contagem dos esporos do que o tratamento à pressão constante.

Tabela 1. Eficiência do tratamento com CO₂-SC (300 bar/60°C)

Tempo de Tratamento (horas)	Número de Ciclos	Redução log(N ₀ /N)
3	-	0,51
2	-	0,41
2	4	1,40
2	8	1,02
2	16	1,52

Nos dois últimos experimentos, decidiu-se manter os ciclos de pressão (4 ciclos de 30 minutos cada) e adicionar um aditivo.

A utilização de aditivos em conjunto com o CO₂-SC torna o tratamento mais eficiente. Para o tratamento com o álcool 70% houve redução de dois ciclos logarítmicos na contagem dos esporos, o que se mostra mais eficiente do que os tratamentos realizados sem aditivo algum.

O CO₂-SC foi capaz de potencializar o efeito da nisina, visto que os controles que receberam nisina sofreram uma redução de 2 ciclos comparado aos demais e que os implantes que passaram pelo tratamento não mostraram crescimento.

Tabela 2. Eficiência do tratamento com CO₂-SC com aditivos (300 bar/60°C).

Tempo de Tratamento (horas)	Número de Ciclos	Aditivo	Redução log(N ₀ /N)
2	4	Álcool 70%	2,06
2	4	Nisina	>7

Conclusão

Para o *Bacillus subtilis*, não foi possível alcançar a inativação completa dos esporos inoculados somente utilizando o CO₂-SC. Entretanto, notou-se que ao utilizar condições extremas de temperatura e pressão (300bar e 60°C), a redução da contagem dos esporos é mais eficiente quanto maior for o tempo de tratamento. Pôde-se observar também que a utilização de ciclos de pressão e descompressão tornou o processo mais eficaz do que o tratamento contínuo com CO₂-SC.

As reduções da carga de esporos mais significativas durante esse projeto foram obtidas ao se adicionar aditivos ao processo de esterilização. Observou-se que o uso da nisina sozinha já reduz a contagem dos esporos e que, com a participação do CO₂-SC sua eficiência é potencializada e então é possível alcançar a inativação dos esporos de *B. subtilis* inoculados no implante.

Referências Bibliográficas

White, A., Burns, D., Christensen, T.W. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *Journal of Biotechnology*. v.123, n.4, p.504-515, 2006.

Zhang, J., Dalal, N., Gleason, C., Matthews, M.A., Waller, L.N., Fox, K.F., Fox, A., Drews, M.J., Laberge, M., An, Y. H. On the mechanisms of deactivation of *Bacillus atrophaeus* spores using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*. v.38, p.268 – 273, 2006a.