



PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO PARA MANUTENÇÃO DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS¹

Anderson Gomes Schiavo², Andrise Taiquiara França de Lima³, Eliane Maria Manara Rossoni⁴

INTRODUÇÃO: A liofilização ou secagem a frio (freeze dry) é o mais nobre processo de conservação de produtos biológico conhecido, porque envolve os dois métodos mais confiáveis de conservação, o congelamento e a desidratação. Sem conservantes ou produtos químicos, é o processo mais adequado para preservar células, enzimas, vacinas, vírus, leveduras, soros, bactérias, derivados sanguíneos, algas, bem como frutas, vegetais, carnes, peixes e alimentos em geral. Para ser liofilizado, o produto deve estar congelado a uma temperatura bem baixa, geralmente abaixo de -20°C , e depois ser submetido a uma pressão negativa (vácuo), fazendo com que a água dos produtos seja retirada por sublimação, ou seja, passe diretamente do estado sólido para o estado gasoso. O resultado final é um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água. Desta forma, os produtos liofilizados não sofrem alterações de tamanho, textura, cor, sabor, aroma, teor de vitaminas, sais minerais, proteínas, etc. e, quando conservados adequadamente, mesmo em temperatura ambiente, resistem intactos por muitos anos. Produtos liofilizados têm baixo peso (a maioria dos produtos naturais possui mais de 80% de água), se conservam mesmo a temperatura ambiente e, quando reconstituídos, retomam suas propriedades originais como nenhum outro produto desidratado. Muito utilizada no meio farmacêutico e em pesquisas, aos poucos a liofilização ganha espaço na indústria alimentícia e outros segmentos, como na preservação de flores e animais, documentos e livros antigos ou recuperados de enchentes, bancos de ossos e tecidos para implante, etc. O processo é realizado por um equipamento denominado liofilizador. Existem liofilizadores de pequeno porte (laboratoriais) até com centenas de metros quadrados (plantas de liofilização de alimentos). No Brasil a maioria dos equipamentos está localizada em indústrias farmacêuticas, centros de pesquisas, universidades e algumas plantas industriais de café e insumos para alimentos institucionais. A liofilização facilita largamente os processos de transporte e armazenagem e desde que o produto seja adequadamente embalado, pode ser armazenado fora de refrigeração por até dois anos, sem perder sua aplicação. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A pesquisa foi realizada em janeiro de 2007. A partir de uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 13150, fez-se o estriamento em ágar Baird-Parker (BP) e incubando-se a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em ágar nutritivo (tubo inclinado), incubando-se a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Do crescimento obtido, foi feita uma suspensão, utilizando a Escala McFarland a fim de obter uma concentração superior a 10^8 . A suspensão foi quantificada em ágar Padrão para Contagem (PCA), onde se observou um crescimento $>1,0 \times 10^{11}$ UFC/mL. Três caldos foram testados para verificar a ação crioprotetora: leite desnatado 10% + inositol 5% (caldo I), sacarose 7% + peptona 7% (caldo II), e inositol 5% + nutritivo 2,5% (caldo III). Para a liofilização foi utilizada a proporção de 2,5mL de cada caldo para 0,5 mL da suspensão com o microrganismo, e procedeu-se o congelamento em frascos, a



aproximadamente -25°C em freezer, durante 2 dias. Após esse período os frascos foram levados ao liofilizador para a realização do processo durante 18 horas. A verificação da manutenção do número de células após a liofilização foi testada hidratando o liofilizado com solução salina a 0,85% e fazendo a contagem com diluições entre 10^{-6} a 10^{-9} em ágar Padrão para Contagem (PCA) e incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Para a confirmação de *Staphylococcus aureus* fez-se a passagem de uma colônia do ágar Baird-Parker para caldo BHI, incubou-se a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A partir do caldo BHI efetuou-se a confirmação de estafilococos coagulase positiva: 0,1 mL do cultivo para 0,3 mL de plasma de coelho e incubou-se a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 a 6 horas, para verificar a formação de coágulo. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Pela contagem de células observou-se a recuperação de 1011 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, demonstrando que o processo foi eficiente, nos caldos I e II, pois não houve danos às células. Os caldos que apresentaram melhor resultado foram: leite desnatado 10% + inositol 5% (caldo I) e inositol 5% + nutritivo 2,5% (caldo III).

Estes caldos agem como agentes crioprotetores, pois reduzem os danos na célula durante o congelamento e descongelamento, e fornece estabilidade ao microrganismo contra os efeitos adversos da estocagem. A confirmação de *S. aureus* se deu pelo crescimento de colônias características em ágar Baird-Parker com conseqüente confirmação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, pela formação de coágulo. **CONCLUSÃO:** Não houve diferença entre os liofilizados a partir dos caldos I e caldo II, no que se refere a recuperação das células, na característica típicas da colônia em ágar Baird-Parker e no teste de coagulase. Entretanto, o processo de liofilização não foi eficiente a partir do caldo II e por isso não foi realizado o teste para verificar a recuperação das células. A liofilização da bactéria *Staphylococcus aureus* foi eficiente, assim como foi positiva a ação de crioprotetores testados.

¹ Pesquisa realizada em Estágio Curricular I do Curso de Química Industrial de Alimentos

² Aluno de Graduação em Química Industrial de Alimentos da Unijuí – Campus Santa Rosa

³ Assistente de Pesquisa do Laboratório de Microbiologia da CIENTEC – Porto Alegre

⁴ Pesquisadora e Coordenadora do Laboratório de Microbiologia da CIENTEC – Porto Alegre