

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AUTOCLAVAGEM LABORATORIAL PARA ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

LINCOLN M. **WAKI**¹; LUCIANO **ARMILIATO**²; MARIA ISABEL **BERTO**³; MARIA
FERNANDA P. P. M. **CASTRO**³; ELIANE A. **BENATO**³; ALFREDO DE A. **VITALI**³

Nº 11245

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar e determinar as condições ideais para esterilização de meios de cultura em autoclave de laboratório elétrica em função do volume a ser esterilizado. É conhecido que os meios de cultura devem ficar 15 minutos a 121°C para uma esterilização eficiente (Howie 1959). Os meios de cultura aquecem mais lentamente que a autoclave e, quando esta atinge 121°C os meios de cultura encontram-se ainda em fase de aquecimento. Este trabalho visou medir o tempo em que diferentes volumes de meio de cultura demoram a atingir a temperatura da autoclave, para que se desse início à contagem de 15 minutos. Este tempo tem de ser acrescentado ao tempo de esterilização para que o meio de cultura atinja a condição de esterilidade recomendada e depende do volume de meio a ser esterilizado. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: inicialmente foram realizados estudos de distribuição de calor nos cestos da autoclave para verificação de ocorrência de possíveis pontos de aquecimento mais lento no interior do equipamento. A segunda etapa consistiu em monitorar a temperatura dos meios de cultura com volumes de 10; 50; 250; 500; 1000 e 2000 mL para que fosse determinado o tempo de autoclave necessário para atingir a condição de esterilização de 15 minutos a 121°C. Os resultados mostraram ser possível ajustar um modelo matemático válido dentro da faixa estudada que correlaciona o tempo extra necessário à esterilização e o volume de meio a ser esterilizado. Durante esses ensaios, foi avaliada a degradação da glicose em função do tempo/temperatura de esterilização através de um kit enzimático colorimétrico. Os resultados mostraram que o tempo adicional aos 15 minutos variou para cada volume, sendo simultâneo no volume de 10mL, 2,5 minutos para o volume de 50 mL e de 20 minutos para o volume de 2000 mL. A degradação de glicose apresentou valores semelhantes em todos os ensaios, sendo de, em média, 5% para a maioria dos volumes estudados. Ao se

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, lincoln.waki@gmail.com

² Orientadora: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

³ Colaboradores: Pesquisadores, GEPC/ITAL, Campinas-SP.

autoclavar todos os volumes simultaneamente, observou-se uma degradação de 17,7% no meio de 10 mL em comparação a 5,4% de degradação do meio de 2000 mL.

ABSTRACT

The goal of this work was to evaluate and determine the ideal conditions for the sterilization of the culture media in the electrical lab retort related to the sterilization volume. It is known that for an effective sterilization the culture media should remain for 15 minutes at 121°C (Howie 1959). The heating of the culture media is slower than the heating of the retort and when the latter reaches 121°C, the culture media is still in the heating phase. This study aims at measuring the time it takes for different volumes to reach the retort's temperature, so that the 15 minutes counting would start. This time should be added to the sterilization time for the culture media to reach the recommended sterilization conditions. That would vary according to the volume media to be sterilized. The work was developed in two stages: at first the heat distribution in the retort basket was analyzed in order to verify possible spots with a lower heating rate in the interior of the equipment. The second stage consisted in monitoring the temperature of the culture media with volumes of 10; 50; 250; 500; 1000 and 2000 mL in order to determine the time the retort requires to reach the sterilization condition of 15 minutes at 121°C. The results showed that it is possible adjust a mathematical model valid within the studied range that correlates the extra time required for sterilization and the volume of medium to be sterilized. During the essay, the glucose degradation versus time/temperature was evaluated with the use of an enzymatic colorimetric kit. The results show that the time added to the 15 minutes varied according to the volume, and it was simultaneous for volume 10mL, 2.5 minutes for volume 50 mL and 20 minutes for volume 2000 mL. The degradation of glucose showed similar values for all essays, with an average of 5% for most of the volumes in the study. When simultaneously placing all volumes in the retort, a degradation of 17.7% was observed in the medium with 10 mL when comparing to a 5.4% degradation for the 2000 mL medium.

INTRODUÇÃO

Usualmente, os meios de cultura são autoclavados independente de seu volume. O procedimento-padrão consiste em se autoclavar os meios de cultura por 15 minutos a partir do momento em que a autoclave atinge 121°C. Esse procedimento, não leva em conta o volume de meio a ser esterilizado e não garante que todos os recipientes de diferentes volumes contendo meio de cultura recebam o tratamento

térmico adequado, visto que o tempo de aquecimento varia de acordo com o volume de cada meio. Devido à necessidade de os meios de cultura serem completamente estéreis, é necessário padronizar o tempo de autoclave em função dos diferentes volumes que venham a ser utilizados para que, independente do volume a ser autoclavado, sejam submetidos ao mesmo processo de esterilização. A maioria das autoclaves verticais de laboratório conta com um manômetro para se estimar a temperatura de operação, baseado na curva de equilíbrio de pressão de vapor saturado. Caso a desaeração da autoclave não seja adequada, o ar no interior da autoclave irá promover um aumento na pressão maior do que promoveria o vapor, mascarando assim a real temperatura da autoclave e ocasionando uma esterilização insuficiente dos meios de cultura (Gillespie and Gibbons 1975). A homogeneidade dos meios de cultura é um fator importante para o crescimento de micro-organismos. Durante o processo de esterilização dos meios de cultura em autoclave, pode ocorrer a caramelização de açúcares e também reações de Maillard e degradação de Strecker, que diminuem o teor de nutrientes presentes em sua composição, tornando-os indisponíveis aos micro-organismos (Dias 2004). Dentro desse contexto, este estudo visou correlacionar o tempo em que a autoclave deverá permanecer na temperatura de 121°C para que os meios de cultura em seu interior sejam submetidos ao processo de esterilização de 121°C por 15 minutos definido por (Howie 1959), sem risco de sub-processamento térmico.

A avaliação dos resultados usará como parâmetro os valores calculados de letalidade dos processamentos. A letalidade, ou valor F , é uma grandeza utilizada para a representação do efeito do tratamento térmico sobre o produto submetido à esterilização. Esta grandeza indica a intensidade de um tratamento térmico, sendo expressa em minutos e definida a uma temperatura de referência, sendo calculado pela Eq. (1).

$$F = \int_t^{t_0} 10^{\left(\frac{T - T_{\text{ref}}}{Z}\right)} dt \quad (1)$$

onde: T (°C) é a temperatura do produto no instante t (min); T_{ref} é a temperatura de referência (121,1 °C), e $Z = 10$ °C e $D_{121,1^\circ\text{C}} = 0,21$ minutos. Para estes valores de Z e T_{ref} , o valor de F é referenciado com F_0 (Stumbo 1973).

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em uma autoclave de laboratório vertical marca Phoenix modelo AV 75 elétrica com dois cestos perfurados. A temperatura interna foi

monitorada por quatro termopares tipo T marca Ellab® acoplados a um aquisitor de dados Ellab® modelo TM9616, ligado a um computador portátil. Devido à impossibilidade em se adicionar um número maior de cabos, estes foram fixados em diferentes posições em apenas um dos cestos da autoclave por teste.

O monitoramento da distribuição de calor da foi realizado através de oito ensaios, da seguinte forma:

- Autoclave vazia (autoclave fria) – cesto superior e inferior;
- Autoclave vazia (autoclave quente) – cesto superior e inferior;
- Autoclave cheia (autoclave fria) – cesto superior e inferior;
- Autoclave cheia (autoclave quente) – cesto superior e inferior.

Os ensaios foram realizados separadamente, no cesto inferior e no cesto superior e foram realizados testes com a autoclave vazia e com a autoclave completamente cheia de frascos contendo água destilada para aumentar a carga térmica no interior do equipamento. Os ensaios com a autoclave quente foram realizados imediatamente após o ensaio com a autoclave fria. Os ensaios foram realizados com a autoclave operando sempre com o mesmo volume de água (16 litros) a fim de se evitar a interferência deste parâmetro no processo de aquecimento.

Para determinação do tempo de esterilização dos meios de cultura em função do volume a ser autoclavado, foram preparados volumes de meios de cultura com 10 mL, 50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL e 2000 mL. Esses volumes foram autoclavados individualmente com monitoramento on-line da temperatura no ponto de aquecimento mais lento, ou seja, a 1/3 da altura do líquido em cada frasco. Em todos os testes, foi monitorada a temperatura da autoclave e, depois desta atingir 121°C, monitorou-se o tempo até que a temperatura do meio atingisse também 121°C. A partir desse instante, começava a contagem de tempo de 15 minutos (Howie 1959) e depois do mesmo a autoclave era desligada. Amostras dos meios de cultura foram retiradas antes e após a autoclavagem e a concentração de glicose foi medida e comparada. O meio de cultura estudado era composto de 50 g/L de glicose e 5 g/L de extrato de levedura. Para as medidas da quantidade de glicose foi utilizado o método enzimático glicose-oxidase através do kit enzimático marca LaborLab. 20 µL de amostra foram adicionados em 2 mL de reagente enzimático. Após banho-maria a 37°C por 10 minutos, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm e os resultados comparados com curva-padrão previamente elaborada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de distribuição de calor não mostraram diferenças significativas com relação às posições que tiveram sua temperatura monitorada. No cesto inferior, não houve diferença significativa de temperatura. Por estar perto da resistência elétrica, este cesto é aquecido rapidamente e de maneira praticamente uniforme.

A Figura 1 mostra as curvas de distribuição de calor do cesto superior da autoclave. Observa-se que o aquecimento do cesto não é uniforme, visto que aos 40 minutos, que foi o momento que se iniciou a saída do vapor, as curvas de temperatura ainda não tinham convergido ao mesmo valor. Isso ocorre apenas três minutos depois. Adotou-se como procedimento-padrão espera de 5 minutos a partir do momento que o vapor começa a sair para fechar a válvula da autoclave.

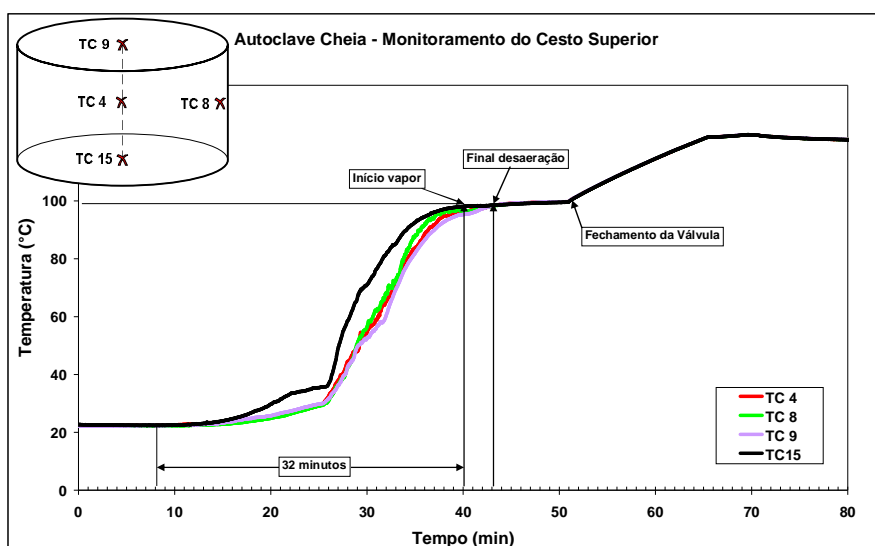


Figura 1: Distribuição de calor no cesto superior da autoclave

A curva do termopar 15, localizado no centro geométrico do cesto, apresentou leituras de temperatura um pouco mais elevadas do que as demais durante a etapa de aquecimento da autoclave, mostrando que, como esperado, o fundo do cesto aquece-se mais rapidamente do que as demais áreas por estar mais perto da geração de vapor.

Tempo de esterilização

Após os testes de penetração de calor, foram realizados testes para determinação do tempo de esterilização em função do volume de meio a ser esterilizado. Através do monitoramento on-line da temperatura da autoclave e do meio de cultura, foi possível identificar o tempo exato em que o meio atinge a temperatura de processo de 121,0 °C. A Figura 2 apresenta o teste realizado com 1000 mL de meio de cultura como exemplo.

Pela Figura 2, o meio de cultura atinge a temperatura de processo 19 minutos após a autoclave. Esse tempo necessário para o meio de cultura atingir a temperatura foi denominado “tempo extra” e foi determinado para cada volume como sendo a média de 3 ensaios experimentais para cada volume de meio esterilizado (Tabela 1).

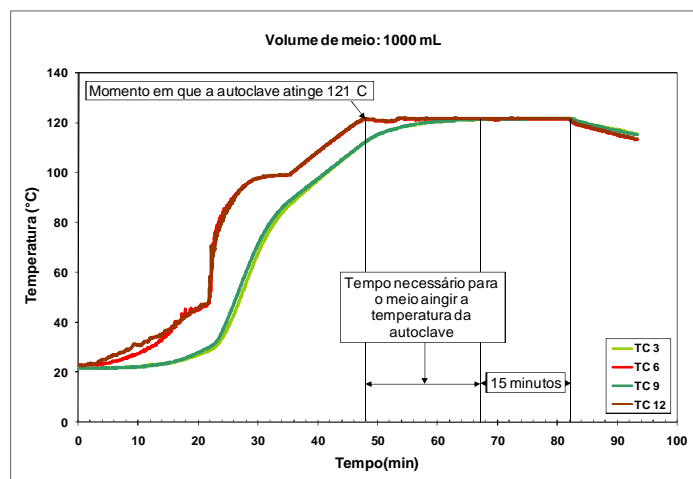


Figura 2: Esterilização de meio de cultura com 1000 mL de volume

Tabela 1: Tempo extra necessário para o meio atingir a temperatura da autoclave

Volume (mL)	10	50	250	500	1000	2000
Tempo Extra (min)	0,0	2,5	12	14	17,5	20

Observa-se que o volume de 10 mL atinge a temperatura de 121°C ao mesmo tempo em que a autoclave, não havendo necessidade de compensar o tempo de esterilização. Em contrapartida, à medida que o volume de meio aumenta, o “tempo extra” aumenta de acordo com o volume do meio, chegando a 20 minutos para o volume de 2000 mL. O modelo matemático que apresenta o melhor ajuste para os dados da Tabela 1 ($R^2=0,9927$) está apresentado na Equação 2 e é representativo dentro da faixa estudada, de 50 a 2000mL

$$\text{Tempo extra de esterilização} = 4,7565 \times \ln(\text{Volume}) - 15,588 \quad (2)$$

Degradação da glicose

A Tabela 2 mostra a concentração de glicose antes e depois da esterilização dos meios de cultura, a perda decorrente do processamento térmico e os valores de letalidade de cada processo. Observa-se que a degradação de glicose é de mesma ordem de grandeza para os meios de cultura de maior volume (acima de 250 mL). Para os volumes menores (10 e 50 mL), a degradação é maior, chegando a 10% da concentração inicial. Os valores de F0 não sofrem grandes alterações, a não ser nos volumes de 1000 e 2000 mL. Nestes, o valor de F0 foi de 31,1 e 32,0 minutos, respectivamente. Para os demais volumes, o valor de F0 manteve-se entre 21 e 25

minutos, evidenciando que o tempo necessário para que cada volume de meio atinja a mesma letalidade é diferente para cada volume

Tabela 2: Degradação de glicose e valores de F0 em virtude da esterilização.

Volume de meio (mL)	Glicose antes da esterilização (g/L)	Glicose após esterilização (g/L)	Perda de glicose (%)	F0 (min)
10	46,81	42,01	10,24	21,1
50	45,07	40,34	10,50	21,5
250	45,90	43,20	5,88	25,2
500	45,85	44,23	3,52	24,4
1000	41,60	39,03	6,17	31,1
2000	43,82	41,39	5,54	32,0

Foi realizado um ensaio em autoclave esterilizando-se todos os volumes de meio de cultura ao mesmo tempo para verificar a degradação da glicose. O critério utilizado foi o de desligar a autoclave quando o meio de 2000 mL tivesse permanecido 15 minutos à temperatura da autoclave. A Tabela 3 mostra a degradação de glicose obtida em cada volume. Foram preparados 5 litros de meio de cultura e divididos nos diferentes volumes estudados. Os quatro sensores de temperatura foram distribuídos nos volume de 10, 500 e 2000 mL, além da autoclave. A concentração inicial de glicose do meio obtida através do kit enzimático foi de 46,2 g/L.

Observa-se que nos menores volumes (10 e 50 mL) houve uma degradação maior do que 10% (17,7 e 13,1%, respectivamente) devido ao maior tempo de exposição à temperatura de 121 °C, enquanto que nos demais volumes houve uma degradação constante em torno de 8%. No volume de 2000 mL foi detectada uma degradação de 5,4%, consistente com o obtido no ensaio individual.

Tabela 3: Degradação de glicose e valores de F0 dos meios de cultura esterilizados simultaneamente

Volume de meio (mL)	Glicose após esterilização (g/L)	Degradação de glicose (%)	F0 (min)
10	38,00	17,7	40,5
50	40,14	13,1	--
250	42,43	8,1	--
500	42,10	8,8	34,1
1000	42,43	8,1	--
2000	43,70	5,4	28,6

A análise da Tabela 3 evidencia que a prática de se esterilizar simultaneamente volumes de meio de cultura muito diferentes provoca alteração na quantidade final de glicose e no valor da letalidade o que, em alguns casos, pode prejudicar a reprodutibilidade de ensaios de crescimento de micro-organismos.

Os valores de F0 obtidos também variaram, sendo maiores tanto quanto menores os volumes de meio de cultura. Este resultado era esperado, pois os volumes

menores permanecem um tempo maior à temperatura de 121°C, o que acarreta num incremento do valor de F₀.

CONCLUSÕES

- A autoclave de laboratório avaliada apresenta boa distribuição de calor, mesmo com sua carga máxima nos dois cestos;
- É recomendável aguardar 5 minutos após o início da saída de vapor para se fechar a válvula da autoclave, de modo a permitir que todo o ar no interior do equipamento seja expelido;
- Foi possível determinar uma relação matemática válida que correlaciona o tempo extra necessário em função volume de meio a ser esterilizado, dentro da faixa de volumes estudadas. A idéia original de 15 minutos aplicou-se somente ao volume de 10 mL;
- A degradação de glicose quando o meio permanece por 15 minutos a 121°C é praticamente a mesma, entre os volumes de 250 e 2000 mL em torno de 5%. A maior degradação ocorreu nos meios com 10 e 50 mL, que tiveram degradação em torno de 10%;
- A esterilização simultânea de diferentes volumes de meios de cultura só é recomendada para volumes entre 250 e 1000 mL. Para volumes muito diferentes, ocorrem perdas muito significativas de glicose nos volumes menores, não sendo recomendada.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao GEPC – ITAL, pela oportunidade de estágio.

Ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, DEA/FEA/Unicamp, pelas informações e auxílio nas análises.

REFERÊNCIAS

- Dias, A. d. F. (2004). Reação de Maillard. Nominata de Síntese Orgânica, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB: 1-16.
- Gillespie, E. H. and S. A. Gibbons (1975). "Autoclaves and their Dangers and Safety in Laboratories." Journal of Hygiene **75**: 475-487.
- Howie, J. W. (1959). "Sterilization by Steam Under Increased Pressure." The Lancet **1**(7070): 425-435.
- Stumbo, C. R. (1973). Thermobacteriology in Food Processing. New York, Academic Press.