



OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AUTOCLAVAGEM LABORATORIAL PARA ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA – Parte II

Isabela dos Santos **Andrade**¹; Maristela da Silva do **Nascimento**²; Jorge
Hashimoto²; Alfredo de Almeida **Vitali**²; Maria Isabel **Berto**³

Nº 12224

RESUMO

Na primeira parte deste projeto, desenvolvida por Waki et al. (2011), foi constatado que para submeter a mesma intensidade de esterilização em diferentes volumes de meio de cultura seria necessário diferentes binômios de tempo/temperatura. Este estudo determinou o valor do tempo extra de esterilização em função do volume esterilizado para proporcionar a letalidade equivalente ao processamento térmico padrão de 121°C/15 min. A continuidade propôs avaliar o efeito da esterilização padrão de 121°C/15min em diferentes volumes do mesmo meio. Esta avaliação constou de: (1) estimar a redução decimal do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus*, que é um indicador biológico de processos de esterilização a vapor; (2) estimar o grau de cozimento ocasionado pela esterilização padrão nestes diferentes volumes com objetivo de relacioná-lo à perda e degradação de nutrientes e (3) avaliar o efeito desta perda no crescimento do microrganismo a ser incubado neste meio. A parte experimental consistiu em ensaios de esterilização padrão (121°C/15min) do meio de cultura Lactobacilli MRS Broth acondicionado em diferentes volumes (tubos de ensaios de 10mL e shotts de 250, 500 e 2000 mL) seguida da inoculação do microrganismo *L. acidophilus*. O crescimento deste microrganismo no meio teste foi avaliado pela leitura da densidade ótica (OD) do meio de cultivo em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. Os resultados comprovaram que a esterilização de diferentes volumes do meio de cultura não influenciou o crescimento do microrganismo indicador.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, Isa.andrade01@gmail.com

² Colaboradores: Pesquisadores do ITAL, Campinas-SP.

³ Orientadora: Pesquisadora, GEPC/ITAL, Campinas-SP, miberto@ital.sp.gov.br

ABSTRACT

In the first part of this project developed by Waki et al. (2011), was found that to submit to the same intensity of sterilization in different volumes of culture media would require different binomials of time / temperature. This study determined the amount of extra time sterilization based on the sterilized volume to provide a thermal process lethality equivalent to the standard 121 °C/15 min. The continuity was to investigate the effect of sterilization standard 121 °C/15min different volumes of the same media. This evaluation consisted of: (1) estimate the decimal reduction of the microorganism *Geobacillus stearothermophilus*, which is a biological indicator for steam sterilization processes, (2) estimate the degree of cooking caused by sterilization standard in these different volumes in order to relate so the loss and degradation of nutrients and (3) evaluate the effect of this loss in growth of the microorganism to be incubated in this media. The experimental tests was to standard sterilization (121 °C/15min) of the culture medium Lactobacilli MRS Broth stored in different volumes (10 mL test tubes and Shotts 250, 500 and 2000 mL) followed by inoculation of the microorganism *L. acidophilus*. The growth of this micro-organism in the middle test was evaluated by reading the optical density (OD) of culture medium in a spectrophotometer with a wavelength of 550nm. The results proved that sterilization of different volumes of the culture medium did not affect the growth of the microorganism indicator.

INTRODUÇÃO

Usualmente, em práticas laboratoriais, adota-se um mesmo procedimento para autoclavagem de meios de cultura independente de seu volume e do formato do recipiente em que se encontra. Este procedimento-padrão consiste em autoclavar os meios de cultura por 15 minutos a partir do momento em que a autoclave atinge 121°C (Howie, 1959). Por esse procedimento, não há garantia de que meios de cultura com diferentes volumes sejam submetidos às mesmas condições de esterilização, visto que o tempo de aquecimento varia de acordo com o volume de cada meio.

Dentro desse contexto, iniciou-se um estudo para averiguar o procedimento padrão em diferentes situações de autoclavagem, realizadas em autoclave de laboratório vertical carregada com diferentes recipientes contendo meio de cultura composto por glicose e extrato de levedura (Waki et al., 2011). Neste estudo foram realizados vários tratamentos térmicos e avaliou-se a desaeração da autoclave vazia e carregada e também o perfil de temperatura no meio de cultura contido nos frascos. Também foi feito o cálculo do valor da letalidade (F_0) de cada frasco, utilizando os

parâmetros D e Z do *Clostridium botulinum*. Confirmou-se que o comportamento da temperatura é distinto para cada volume de meio, bem como o valor do F_0 . Este resultado indica, portanto, que também podem ocorrer efeitos distintos no meio, em relação aos danos na sua composição nutricional.

Na prática laboratorial a utilização de indicadores biológicos comerciais como: Clean-test (Biotecnologia, 2011); Sterikon (Chemicals, 2001), CL1218 (Products, 2011), (3M, 2011) é o procedimento usual para averiguar a eficiência da esterilização em autoclaves operadas a vapor. Estes indicadores contêm um meio que é inoculado com contagens em torno de 10^6 do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* e a eficiência é comprovada pela não alteração do indicador após a esterilização de um período de incubação indicado pelo fabricante. A utilização destes indicadores, porém, não avalia o excesso de esterilização que este meio pode ter sido submetido e as consequências deste excesso na degradação de seus nutrientes.

A degradação de muitas vitaminas, compostos aromáticos e pigmentos pela temperatura seguem uma reação de primeira ordem, similar à destruição microbiana. Em geral os valores de D e Z nestes casos são mais altos do que em microrganismos e enzimas. Assim sendo, as propriedades sensoriais são mais retidas utilizando temperaturas mais altas por um curto tempo. Assim, para um processo ser adequado tanto no âmbito de prover a esterilidade como manter a qualidade nutricional, a definição de seu tempo e temperatura deve levar em consideração todas as reações de destruição envolvidas no produto. A abordagem feita por Quast (1976) avalia os cálculos da intensidade de esterilização, escurecimento e de cozimento de alimentos em diferentes binômios de tratamento térmico que causam a mesma intensidade de esterilização. O cozimento do produto é inerente ao processamento e, para avaliar a extensão deste efeito durante os processos, é importante o conhecimento do fator de cozimento do produto (F_{Cz}) que é calculado analogamente ao valor de F_0 , utilizando-se valores de D e Z de cozimento. Na literatura o F_{Cz} é calculado geralmente com a temperatura de referência de 100 °C e a constante de resistência térmica de cozimento (Z) de 25 ou 33 °C (Quast, 1976), (Loey et al., 1994) (Berto & Vitali, 2008).

Além da degradação de nutrientes, o processo térmico também desencadeia reações químicas que causam o escurecimento do produto, denominadas de reações de Maillard. A reação de Maillard sofre uma influência decisiva da temperatura, sendo intensa a 150 °C, rápida a 100 °C e lenta a 37 °C e a 0 °C. Além do escurecimento ocorre a degradação dos aminoácidos com perda de proteínas utilizáveis pelo homem e há formação de compostos voláteis responsáveis pelo odor característico do produto

que provêm de uma parte do processo denominada degradação de Strecker (Nitzke & Biedrzycki, 2011). Devido a estas características e condições em que estas reações ocorrem constata-se uma relação direta com o desencadeamento das mesmas em processos de esterilização de meios de cultura, devido à composição rica em nutrientes destes meios aliadas à temperatura proporcionada pelo processo.

Dentro deste contexto, este projeto visou a continuidade do estudo de Waki et al. (2011) e teve como primeiro objetivo avaliar o efeito da esterilização padrão (121°C/15 min.) nas reduções do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* e no grau de cozimento deste meio de cultura, utilizando os próprios dados de tempo temperatura obtidos neste trabalho anterior. A segunda parte do projeto foi experimental e constou em esterilizar diferentes volumes do meio de cultura Lactobacilli MRS Broth por 121°C/15min e posteriormente inocular no mesmo o microrganismo *L. acidophilus*. Este procedimento visou avaliar a influência de um mesmo tratamento térmico no crescimento de um microrganismo incubado em um meio de cultura que foi esterilizado em diferentes volumes. Esta proposta é fundamentada na hipótese que o mesmo tratamento térmico aplicado em um meio de cultura acondicionado em volumes pequenos (ex: 10 mL) afeta mais em sua degradação nutricional do que quando o mesmo é acondicionado em volumes maiores (ex: 2L).

MATERIAL E MÉTODOS

Cálculo de F e n para *Geobacillus stearothermophilus* e do fator de cozimento utilizando dados de Waki et al (2011)

Visando avaliar a eficiência dos ensaios de esterilização utilizou-se os dados experimentais de Waki et al (2011) do ensaio final para calcular o valor de letalidade do F e o número de reduções decimais do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, utilizando a temperatura de referência de 121°C e valores de D e Z de 2 minutos e 7,7°C respectivamente, especificados pelo Clean-test (Biotecnologia, 2011). Neste teste final frascos de 10, 250, 500 e 2000 mL foram submetidos a um mesmo tratamento térmico de 121°C/26 minutos, binômio de tempo/temperatura necessário para que o volume de 2000 mL permanecesse a 121°C, por 15 minutos.

Utilizando estes dados foi calculado o fator de cozimento (F_{cz}) de cada processo, utilizando a temperatura de referência de 100°C e valor de Z de 25°C (Quast, 1976, Berto & Vitali, 2008) e a letalidade F_0 , com Z=10°C e D=0,211 min

(Stumbo, 1973). O cálculo do F_{cz} visou subsidiar a avaliação do produto quanto às mudanças de cozimento sofrido pelo mesmo durante a esterilização, que pode acarretar a perda e degradação de nutrientes do meio.

Avaliação do crescimento do *L. acidophilus* nos meios de cultura esterilizado em diferentes volumes

O microrganismo indicador utilizado foi o *Lactobacillus acidophilus*, que apresenta maiores exigências nutricionais, comparada a outros microrganismos de origem alimentar. O meio de cultura avaliado foi o Lactobacilli MRS Broth. Este meio é composto por peptona (10g); extrato de carne (8g), extrato de levedura (4g), glicose (20g), sorbitano monooleato (1g), fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (2g), acetato de sódio. $3H_2O$ (5g), citrato de amônia (2g), sulfato de magnésio. $7H_2O$ (0,2g), sulfato de manganês. $4H_2O$ (0,05g) e água destilada. Seu pH é de $6,2 \pm 0,2$ após $121^\circ C/15$ min (Silva et al., 1997). O meio foi preparado nos seguintes volumes: 10, 200, 400 e 1800ml.

Esterilização do meio de cultura: O processo de esterilização foi realizado na mesma autoclave utilizada por Waki et al (2011), uma autoclave de laboratório vertical marca Phoenix modelo AV 75. Durante a operação as resistências elétricas da autoclave foram mantidas inundadas em água e a formação do vapor utilizado na esterilização ocorreu pela ebulição desta água. O volume estipulado foi de 16 Litros, mesmo utilizado por Waki et al (2011), que corresponde ao nível máximo da água com a base do cesto inferior da autoclave. Utilizou-se como meta aplicar o binômio padrão de $121,1^\circ C/15$ minutos. O controle de temperatura de esta autoclave se faz indiretamente através do controle de pressão do vaso conforme funciona a maioria das autoclaves verticais de laboratório. Baseado nesta relação de temperatura e pressão de vapor saturado (Lei de Antoine), para cada pressão de vapor puro existe uma temperatura correspondente a esta pressão. A correspondência entre a temperatura e a pressão de autoclave no final da etapa de desaeração e durante o processo indicam a adequada expulsão do ar durante a etapa de desaeração. Após alguns ensaios prévios na autoclave, com acompanhamento de sua temperatura interna realizada pelo aquisitor de dados Modelo E-Val Flex M16 (Serial nº 14631 de 16 canais e o software E-ValSuite Pro 2.8.5.0v ELLAB A/S, Krondalvej 9, DK-2610, Rødovre), a operação da autoclave foi definida e seguiu as seguintes etapas: (1) fechamento da autoclave com os frascos e abertura total da válvula de desaeração, ligação da resistência no “máximo”; (2) Espera de 2 minutos após início da saída de vapor da

autoclave para finalização da desaeração da autoclave; (3) fechamento da válvula de desaeração para pressurização da autoclave até a pressão de 1,3 bar, correspondente a 121,1°C; (4) espera de 2 minutos para as temperaturas da autoclave atingirem 121,1°C; (5) posicionamento do seletor de potência de resistência para “médio” e contagem do tempo de 15 minutos; (6) desligamento da resistência e espera até a pressão da autoclave atingir 0 bar manométrico; (7) abertura da válvula de desaeração e espera de no mínimo 1 hora para resfriamento dos frascos; (8) abertura da autoclave.

Os frascos contendo meio de cultura foram esterilizados conforme procedimento descrito anteriormente. Devido à contaminação do meio não havia possibilidade de acompanhar a temperatura no interior dos frascos, portanto, este acompanhamento foi realizado com os mesmos frascos preenchidos com água. Os sensores foram posicionados no eixo central a 1/3 da altura do líquido, medida a partir da base do frasco, que é a referência para o ponto de aquecimento mais lento de produtos convectivos como o meio de cultura e a água. Os perfis de temperatura obtidos destes ensaios foram utilizados para calcular os valores de F_0 , F_{cz} , F_{Gb} e considerou-se que pela similar fluidez, o meio esterilizado nestas mesmas condições sofreu o mesmo efeito da água.

Preparo do Inóculo: Para reativação, a cepa foi transferida para tubos de caldo Lactobacilli MRS Broth, com incubação a 37°C/24h. Em seguida, foram realizadas diluições decimais em água peptonada 0,1% para obtenção de inóculo a 10^4 UFC/L.

Determinação da Curva de Crescimento: Após a reativação, foram inoculados 50µL da cultura do microrganismo indicador em cada tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura Lactobacilli MRS Broth proveniente dos frascos de meios esterilizados em diferentes volumes e, em seguida os tubos foram incubados a 37°C. O crescimento microbiano foi determinado através de leitura da densidade ótica do meio de cultivo, realizada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 550nm. As leituras foram realizadas após 16, 18, 20, 24, 40, 44 e 64 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cálculo F e n para *Geobacillus stearothermophilus* e do fator de cozimento utilizando dados de Waki et al (2011)

Utilizando os dados fornecidos por Waki et al (2011), foram realizados os cálculos das letalidades do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (F_{Gb}) e do *Clostridium botulinum* (F_0) e os respectivos números de reduções decimais (n_{Gb} e n) e os valores do fator de cozimento (F_{cz}) considerando todo o processo (aquecimento e resfriamento). Os resultados são apresentados na Tabela 1, juntamente com os dados de degradação de glicose e F_0 publicados por Waki et al (2011). Destaca-se que neste trabalho, o F_0 publicado foi calculado apenas com a curva de aquecimento, mas a determinação da degradação de glicose foi realizada após o resfriamento.

TABELA 1. Valores de F_{Gb} (letalidade do *G. stearothermophilus* - min), n_{Gb} (número de reduções de *G. stearothermophilus*) F_0 (min), n (número de reduções de *C. botulinum*), F_{cz} (fator de cozimento - min), degradação de glicose (%) e F_0 publicado em Waki et al. (2011) em frascos de 10, 500 e 2000 mL

	Frascos 10 mL	Frascos 500 mL	Frascos 2000 mL
F_{Gb} (min)	42,4	38,1	31,2
n_{Gb} (-)	21,2	19,1	15,6
F_0 (min)	45,0	41,4	34,8
n F_0 (-)	213,2	196,2	164,9
F_{cz} (min)	454,9	452,7	418,7
Degradação glicose (Waki et al, 2011),%	17,7	8,8	5,4
F_0 do aquecimento (Waki et al, 2011), min	40,5	34,1	28,6

Analisando a Tabela 1, algumas observações importantes são pertinentes:

- Os resultados de F_0 mudam consideravelmente quando o cálculo é feito considerando também a letalidade do resfriamento (F_0 do aquecimento x F_0). Este fato pode afetar na correlação apresentada de degradação de glicose do F_0 publicado, já que a análise de glicose refere-se ao produto após o final do processo inteiro, e não somente da parte considerada para o cálculo do F_0 apresentado. Assim, a correlação deveria ter sido realizada com o F_0 do processo inteiro;

Em relação à letalidade calculada para o *Geobacillus stearothermophilus* (F_{Gb}), o processo aplicado é suficiente para que seja atingida a redução de 6 ciclos logarítmicos, presente nos indicadores biológicos (n_{Gb}). Esta redução variou de 16,6 ciclos nos frascos de 2000 mL para 21,9 ciclos para os tubos de ensaio;

- Em relação ao fator de cozimento (F_{cz}) constata-se um pequeno decréscimo do valor com aumento do volume, mas os valores finais ficam na mesma ordem de grandeza. A diferença do maior efeito do processamento no menor volume que

aquece mais rapidamente é compensada pelo maior tempo que o produto de 2000 mL demora a resfriar.

Avaliação do crescimento de *L. acidophilus* nos meios de cultura esterilizado em diferentes volumes

- **Cálculo dos parâmetros térmicos: F_{cz} , F_0 e F_{Gb} no processo padrão**

Utilizando os registros da temperatura da autoclave (inferior e superior do cesto) e interna dos frascos de 10, 250, 500 e 2000 mL do processo aplicado de esterilização padrão, foram realizados os cálculos das letalidades do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (F_{Gb}) e do *Clostridium botulinum* (F_0) e respectivos números de reduções decimais (n_{Gb} e n) e os valores do fator de cozimento (F_{cz}). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Valores de F_{Gb} (letalidade do *G. stearothermophilus* - min), n_{Gb} (número de reduções de *G. stearothermophilus*) F_0 (min), n (número de reduções de *C. botulinum*), F_{Cz} (fator de cozimento - min) dos frascos de 10, 250, 500 e 2000 mL submetidos ao processo de esterilização padrão de 121°C/15 minutos

	Frascos 10 mL	Frascos 250 mL	Frascos 500 mL	Frascos 2000 mL
F_{Gb} (min)	44,2	33,0	27,9	8,2
n_{Gb} (-)	22,1	16,5	13,9	4,1
F_0 (min)	41,4	32,6	28,6	11,3
$n F_0$ (-)	196,9	155,2	136,3	53,7
F_{cz} (min)	358,6	324,2	311,2	224,8

Observa-se pela Tabela 2 que os valores das letalidades decrescem com o aumento do volume esterilizado. No caso do frasco de 2000 mL contendo 1800 mL de água, o processamento térmico padrão aplicado não foi suficiente para reduzir o mínimo requerido do *Geobacillus stearothermophilus* que é de 6 reduções decimais.

- **Análise da curva de crescimento microbiano**

A Figura 1 apresenta a média das leituras de OD dos testes em triplicata. Apesar da diferença entre os fatores de cozimento apresentados na Tabela 3, de acordo com a Figura 1, o *L. acidophilus* não apresentou diferença significativa no crescimento comparando as curvas do microrganismo inoculado nos diferentes volumes. A fase de adaptação (fase lag) apresenta a mesma duração em todos os tratamentos, assim como as fases exponencial e estacionária.

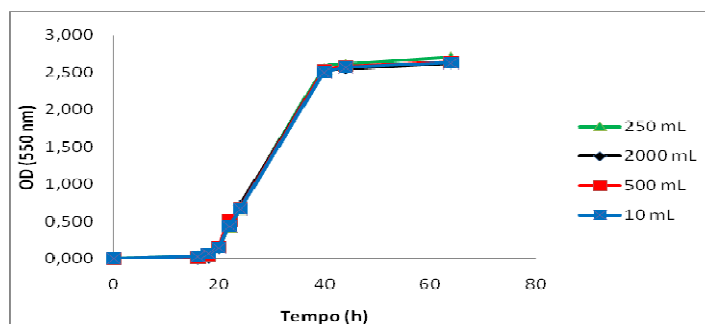


Figura 1 – Curva de crescimento do *L. acidophilus* em meio de cultura Lactobacilli MRS Broth autoclavado em diferentes volumes.

CONCLUSÃO

Não foi constatada diferença significativa no crescimento do *L. acidophilus* incubado em meio de cultura esterilizado por 121°C/ 15 min em diferentes volumes. Indicando que o efeito da esterilização na composição do meio é semelhante.

Como esperado, os valores finais do fator de cozimento (F_{Cz}) decrescem com o aumento do volume do frasco. Constatou-se que a rapidez do aquecimento dos tubos menores geraram valores de F_{Cz} maiores no aquecimento e processo. Em volumes maiores, o baixo valor de F_{Cz} durante o aquecimento foi compensado pelo maior tempo que o produto demorou a resfriar. Os resultados indicam que na faixa dos valores de F_{Cz} calculados, a degradação e a perda de nutrientes nos meios de cultura não apresentam diferenças significativas que interfiram no desenvolvimento do microrganismo avaliado.

Um fato constatado de suma relevância está na avaliação do número de reduções decimais de *Geobacillus stearothermophilus* calculados nos diferentes volumes. No caso do meio acondicionado em frascos de 2L, o tempo/temperatura de esterilização padrão não foi suficiente para ocasionar a redução mínima requerida pelos indicadores biológicos comerciais, de 6 ciclos. Este processo gerou 4,1 reduções decimais no ponto de aquecimento mais lento do frasco. Este subprocessamento, na prática, pode acarretar interferências em análises conduzidas neste meio. Atenção deve ser tomada em relação ao uso correto dos indicadores biológicos. Ressalta-se que o resultado obtido com estes indicadores posicionados diretamente no cesto de uma autoclave não é representativo para todo o restante do material esterilizado. Os indicadores são compostos por pequenas ampolas que praticamente aquecem simultaneamente à temperatura da autoclave, não representando a condição crítica de aquecimento mais lento do material colocado.



AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao GEPC – ITAL, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- 3M. **Indicador Biológico Attest**. Disponível em:
<http://solutions.3m.com.br/wps/PA_PoW/jsp/html/JspView.jsp?nid=RXG01GKC9Cbe9SDGQ9M1BKgl&o=print&t=pt_BR_medicalmarkets_portal&r=GSHL20G7FLgv&vr=148BTK429Jge&portleturi=/wps/PA_PoW>. Acesso em: 07/02/2012.
- Berto, M. I. e Vitali, A. A. Controle em tempo real de um processo de esterilização convencional. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11 (out/dez), n.4, p.252-262, 2008.
- Biotechnology, C. U. **Indicadores Biológicos Clean-test**. Disponível em:
<<http://www.cleanupbrazil.com.br/produtoDetalhe/8.html>>. Acesso em: 07/02/2012
- Chemicals, M. **Indicadores Biológicos Sterikon**. Disponível em:
<http://www.merck-chemicals.com/brazil/sterikon-bioindicador/MDA_CHEM-110274/p_S7Wb.s1LadYAAAEWwOefVhTl>. Acesso em: 15/02/2012
- Howie, J. W. Sterilization by steam under increased pressure. **The Lancet**, v.1, p.425-435, 1959.
- Loey, A. V.; Fransis, A.; Hendrickx, M.; Maesnas, G.; Noronha, J. e Tobback, P. Optimizing thermal process for canned white beans in water cascading retorts. **Journal of Food Science**, v.59, n.4, p.828-832, 1994.
- Nitzke, J. A. e Biedrzycki, A. **Reação de Maillard**. Disponível em:
<http://www.ufrgs.br/alimentus/pao/fabricacao/fab_assamento_maillard.htm> .
Acesso em: 17/12/2011.
- Quast, D. G. **Cálculo da intensidade de esterilização e de cozimento de alimento**: Instruções Técnicas - Nº 10. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, 1976. 59p.
- Silva, N. D.; Junqueira, V. C. A. e Silveira, N. F. D. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. . São Paulo: Livraria Varela, 1997. 16-29p.
- Stumbo, C. F. **Thermo bacteriology in food processing**. 2.ed. New York: Academic Press, 1973.
- Waki, L. M.; Armiliato, L.; Berto, M. I.; Castro, M. F. P. P. M.; Benato, E. A. e Vitali, A. A. Otimização das condições de autoclavagem laboratorial para esterilização de meios de cultura In: 5o. Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011, 2011, Embrapa Monitoramento por Satélite, **Anais do 5o CIIC**.