

RESUMO: O laboratório de biotecnologia pode vir a trabalhar com espécimes animais, vegetais e microorganismos. Para uma execução rotineira satisfatória é necessário que os materiais sejam devidamente esterilizados. Os processos de limpeza e desinfecção podem preceder a esterilização.

A esterilização é um processo que elimina todos os microorganismos presentes no material esterilizado. Existem diversos tipos de esterilização, como calor úmido, calor seco, vapor pressurizado, esterilização por gases e radiações, além de métodos mecânicos como a filtração. Bioprocessos, como a fermentação também necessitam utilizar materiais, vidrarias e equipamentos devidamente esterilizados. Em suma, os processos de higienização conhecidos como limpeza, desinfecção e esterilização são indispensáveis para a rotina das técnicas e procedimentos em biotecnologia.

Palavras-chave: Esterilização, Biotecnologia, Fermentação

1. INTRODUÇÃO

O laboratório de biotecnologia possui diversos materiais e equipamentos que precisam ser esterilizados para reutilização. Isso ocorre porque muitas vezes os trabalhos rotineiros são executados utilizando microorganismos e a presença de microorganismos contaminantes pode alterar significativamente os resultados e inclusive invalidá-los o que acarreta em prejuízos financeiros e perda de tempo. O processamento de higienização de materiais e equipamentos inclui a limpeza, desinfecção e esterilização, é importante conhecer e saber classificar os artigos a serem higienizados, bem como os desinfetantes químicos, para que haja escolha adequada do processo de higienização dos mesmos. De acordo com a classificação de risco dos artigos, os mesmos poderão passar ou não, por todos os processos citados. Lembrando ainda que para o bom processamento de artigos, a limpeza é fundamental (HIRATA; MANCINI FILHO, 2002; MASTROENI, 2006).

Em alguns procedimentos biotecnológicos industriais, a eliminação parcial dos microorganismos constante nos equipamentos e ambiente de garante, sem prejuízos, a qualidade do produto. Entretanto já existem outros procedimentos em que se prescinde totalmente de assepsia.

Há Bioprocessos bastante exigentes quanto à esterilidade dos meios de cultivo, havendo, também, grande rigor asséptico não só no transporte do meio esterilizado ao biorreator, bem

como no próprio sistema reacional. Pode-se citar como exemplos de processos que demandam esterilização: a produção de antibióticos, vacinas, vitaminas e enzimas. Por outro lado, outros requerem apenas uma esterilização incipiente (pasteurização), tendo em vista que o próprio produto age como uma 'barreira' à contaminação, devido ao seu caráter tóxico aos microrganismos contaminantes. A bioprodução de combustíveis, solventes e ácidos orgânicos insere-se neste último caso. Há, também, Bioprocessos em que se prescinde totalmente de assepsia, como é o caso dos biotratamentos, nos quais a microbiota nativa ou exógena, atuando de forma consorciada, é extremamente desejável para se reduzir da carga orgânica poluidora. (PEREIRA JUNIOR, BON e FERRARA. 2008) Na prática, considera-se que uma esterilização foi realizada com sucesso quando estiver garantida a assepsia adequada ao tipo de processo realizado e produto a ser fabricado.

2. CLASSIFICAÇÃO DE ARTIGOS

De acordo com Moura (1998) e Fantinato e colaboradores (2004), o risco de aquisição de infecção com o uso desses artigos, são classificados em três categorias, esta classificação foi criada por Spauling na década de 60:

- Artigos críticos – penetram tecidos estéreis ou sistema vascular e devem ser esterilizados para uso. Por exemplo: bisturis, sondas, hemodializadores, marca-passos, agulhas etc.
- Artigos semi-críticos – destinados ao contato com a pele não intacta ou com mucosas íntegras. Normalmente não atingem tecidos estéreis e a defesa local dos pacientes os protege do pequeno número de invasores microbianos. Para segurança, esses itens não devem estar contaminados com formas vegetativas de bactérias. Ex: Equipamentos respiratórios e de anestesia, endoscopia, etc. Requerem desinfecção de alto nível ou esterilização.
- Artigos não críticos – artigos destinados ao contato com a pele íntegra do paciente. Constituem uma ampla variedade de objetos que trazem pouco risco de transmissão de agentes infecciosos. Ex. comadres, cubas, aparelhos de pressão, máscaras de inaladores, jarras, paredes, pisos etc. Requerem limpeza ou desinfecção de médio ou baixo nível.

3. LIMPEZA

Neste processo se orienta a utilização de água com detergente ou produtos enzimáticos. Consiste na remoção de material orgânico e sujidades dos objetos. Processo que precede as ações de desinfecção e/ou esterilização. Poderá ser feita pelo método manual ou mecânico (SOUSA JUNIOR, 2008):

3.1 TIPOS DE LIMPEZA

- MANUAL – é realizada manualmente por meio de ação física, sendo utilizado água, sabão/detergente, escovas, panos, entre outros.
- AUTOMÁTICA – é realizada por máquinas automatizadas específicas para este fim. A remoção da sujeira ou matéria orgânica ocorre pela ação combinada da energia mecânica (vibração sonora), térmica (temperatura entre 50° e 55°C) e química (detergentes).

A utilização de máquinas automatizadas para limpeza de artigos, não dispensa a revisão manual dos mesmos, pois o critério visual pode detectar possíveis falhas na limpeza de equipamentos.

3.2 OBJETIVOS DA LIMPEZA

- Remover sujidades.
- Remover ou reduzir a quantidade de microorganismos.
- Garantir a eficácia do processo de desinfecção e esterilização.
- Preservar o material.

4. DESINFECÇÃO

É a eliminação de microorganismos na sua forma vegetativa, onde na prática é um processo que reduz o número de microorganismos. Seu objetivo é evitar a possibilidade de disseminação de agentes patogênicos. Porém, algumas vezes, após o processo de higienização, o número de microorganismos viáveis, patogênicos ou não, pode ainda ser elevado, se não for utilizado o desinfetante adequado (FANTINATO et al, 2004). A avaliação da eficácia de um desinfetante é realizada sob condições laboratoriais, rigorosamente padronizadas. Embora sejam estabelecidos limites de segurança para a eficácia do produto em seu uso rotineiro, deve-se sempre ter a percepção que os desinfetantes e anti-sépticos são produtos passíveis de alterações durante seu preparo, estoque e uso, modificando o efeito antimicrobiano desejado. Fatores como a presença e a quantidade de matéria orgânica, diluição em água, temperatura, pH, tempo de contato e luz, possuem influência marcante sobre a eficácia de ação dos desinfetantes (FANTINATO et al, 2004).

4.2 CLASSIFICAÇÃO DA DESINFECÇÃO, segundo Fantinato et al, 2004

- Baixo nível – destrói microorganismos na forma vegetativa, alguns vírus e fungos, não elimina o bacilo da tuberculose, nem os microorganismos esporulados.
- Médio nível ou nível intermediário – destrói microorganismos na forma vegetativa, com exceção dos microorganismos esporulados, inativa o bacilo da tuberculose, a maioria dos vírus e fungos;
- Alto nível – destrói microorganismos na forma vegetativa e alguns esporulados, destrói ainda o bacilo da tuberculose, vírus e fungos. Faz-se necessário, o enxágüe do material com água estéril e manipulação com técnica asséptica. Havendo dificuldade com enxágüe com água estéril, é recomendado o uso de filtro de 0,2µm e imersão com álcool a 70% após o enxágüe.

5. ESTERILIZAÇÃO

É o processo que promove completa eliminação ou destruição de todas as formas de microorganismos vivos que se encontrem à superfície ou no interior de um material, podendo ser alcançado pela exposição do material a agentes letais físicos ou químicos, ou ainda no caso de substâncias líquidas, a separação mecânica dos organismos através de filtrações (SINOGAS, 2009).

Desta forma percebe-se que a expressão esterilização possui um significado absoluto pois uma substância ou material não pode ser parcialmente estéril. Um material estéril é aquele totalmente isento de qualquer organismo ativo. A esterilização pode ser alcançada a partir de determinadas metodologias, a saber (SINOGAS, 2009):

- ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR ÚMIDO

A esterilização pelo calor pode ser alcançada utilizando equipamentos que trabalham balanceando tempo, temperatura e pressão atmosférica, como por exemplo, a autoclave (Figura 1) que utiliza os mesmos procedimentos de uma panela de pressão.



Figura 1 – Autoclave.

Para a esterilização pelo calor úmido devem ser levados em consideração alguns pontos importantes, como:

- Temperatura: uma temperatura de 121 °C oferece uma boa margem de segurança se for mantida durante um espaço de tempo apropriado.
- Umidade: A umidade é um ponto importante a ser considerado, visto que quando mais o vapor foi aquecido, será necessário um aumento da temperatura e o tempo de exposição para a esterilização.
- Pressão Atmosférica: A pressão é útil para elevar a temperatura do vapor acima dos 100 °C, o que não seria possível em aquecimento de água em ambientes abertos.
- Tempo: o tempo é necessário para que o vapor tenha a oportunidade de penetrar e aquecer os materiais a serem esterilizados. Mesmo quando as temperaturas de esterilização são atingidas, os agentes virais ou microbianos não são todos mortos de uma vez.

Juntamente com o processo de esterilização por calor seco, a filtração de membranas micro porosas e radiação constituem os procedimentos de esterilização mais utilizados. Vale ressaltar que de todos os processos empregados para a destruição de microrganismo, o calor é, sem dúvida, o mais eficiente e econômico.

- ESTERILIZAÇÃO POR CALOR SECO

O calor seco é utilizado para esterilizar, principalmente material de vidro, materiais sólidos termoestáveis e alguns outros materiais utilizados no laboratório de biotecnologia. É um dos

Escrito por Fernanda Silva Lordêlo, Manuel Alves de Sousa Junior, Luis Cesar M.S.Paulillo
Qui, 11 de Novembro de 2010 07:02

métodos de esterilização mais utilizados e de muito fácil aplicação. O material utilizado é apenas uma estufa de alta temperatura (160° - 200° C) como se verifica na figura 2.



Figura 2 - Estufa de Esterilização à Seco.

O problema desse tipo de esterilização é que a penetração do calor que vem da parte inferior da estufa é lenta, não é uniforme e a alta temperatura pode danificar o material, o que implica em dificuldades na validação do processo de esterilização (SOUSA JUNIOR, 2008). Em resumo pode-se afirmar que “o calor seco é empregado na esterilização de instrumental e vidraria e o calor úmido, à pressão atmosférica ou saturado sob pressão, é aplicado à esterilização de equipamentos e, principalmente, de meios de cultivo” (PEREIRA JUNIOR, BON e FERRARA, 2008). Segundo Alcarde (Site EMBRAPA), as fermentações industriais podem ser classificadas de acordo com os tipos de alimentação das dornas e desenvolvimento da fermentação, em processos contínuos e descontínuos (batelada). E para concluir a sua explanação o autor supracitado apresenta a diferença destes processos, sinalizando o mais vantajoso conforme trecho a seguir:

Processos descontínuos são os intermitentes, denominados batelada simples ou batelada alimentada. Na batelada simples, a fermentação só tem início após o preenchimento do fermentador, momento em que se mistura o mosto com o fermento. Isto só é possível em condições de pequenas quantidades de mosto, não sendo viável para a indústria alcooleira, tendo uso restrito para fermentações laboratoriais e farmacêuticas. Já na batelada alimentada, mistura-se o mosto ao fermento conforme a dorna vai sendo abastecida. Trata-se de um método mais produtivo e expõe as leveduras a menores riscos de se tornarem inativas que no processo de batelada simples. Em relação aos processos contínuos, os primeiros sistemas foram os de dornas ligadas em série, com quantidade e tamanhos variados, em cascata, em que as primeiras dornas continham cerca de 70% do volume total em fermentação. Com a evolução dos processos da fermentação, ocorre uma otimização dos mesmos com redução dos volumes e do tempo de fermentação com aumentos na produção. O processo ainda é em cascata, com melhoramento nos sistemas de agitação e com diferenciado traçado geométrico das dornas. Algumas vantagens observadas na condução dos processos contínuos são:

maior produtividade; menor volume de equipamentos em geral; amplas possibilidades de total automação e uso da informática; redução do consumo de insumos, de uma maneira geral. (ALCARDE, Site EMBRAPA)

No que tange ao processo de esterilização com calor esta também pode ser descontínua

Escrito por Fernanda Silva Lordêlo, Manuel Alves de Sousa Junior, Luis Cesar M.S.Paulillo
Qui, 11 de Novembro de 2010 07:02

(batelada) ou contínua. Nos dois casos, o aquecimento poderá ser pela circulação de meio aquecedor como vapor ou pela injeção direta de vapor no meio. A esterilização dos meios de fermentação pelo processo descontínuo há esterilização do meio fermentado com a injeção de vapor (vapor direto) em um meio diluído, ou circulação de vapor na serpentina com contínua agitação do meio.

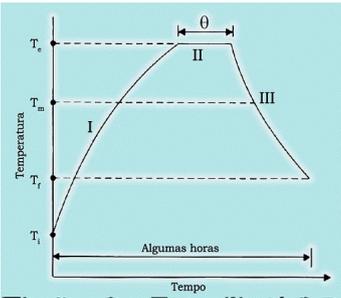
Na prática industrial verifica-se o emprego da esterilização de meios de cultivo em batelada e em conjunto com o biorreator, fazendo-se passar vapor saturado sob pressão através de serpentinas ou jaquetas (aquecimento indireto), ou pela injeção de vapor saturado diretamente no meio contaminado (aquecimento direto). Neste último caso, há que se levar em consideração a diluição do meio de cultivo causada pela condensação do vapor ao entrar em contato com o meio contaminado. (PEREIRA JUNIOR, BON e FERRARA, 2008). No processo descontínuo pode-se elencar algumas desvantagens: a temperatura alta mantida durante algum tempo pode alterar composição do meio, ocorre uma baixa eficiência do sistema de troca de calor, problema de corrosão em razão do contato entre o fermentador e o meio aquecido; e o tempo gasto não produtivo durante o processo de esterilização em que o equipamento fica parado.

Neste sentido asseveram Pereira Júnior, Bon e Ferrara (2008): Na esterilização em batelada, o tempo total de esterilização é relativamente grande, podendo dar origem a decomposição de nutrientes termo-sensíveis, como as vitaminas, ou provocar reações indesejáveis entre os constituintes do meio, como por exemplo, reações entre amino-ácidos e açúcares (reação de Maillard) ou de caramelização (decomposição dos açúcares). Já o processo contínuo de esterilização vem sendo aplicado em substituição, quando possível do processo de esterilização descontínua ou por batelada (Figura 3) em razão das vantagens apresentadas, pois se processa a uma temperatura mais elevada, as operações de aquecimento e arrefecimento são rápidas e por conseqüência a temperatura de permanência do meio é menor minimizando a destruição do meio; evita-se o processo corrosivo, pois o tubo de espera por ser de dimensões reduzidas pode ser construído com ligas especiais evitando contaminação metálica; há também economia de vapor e água de arrefecimento.

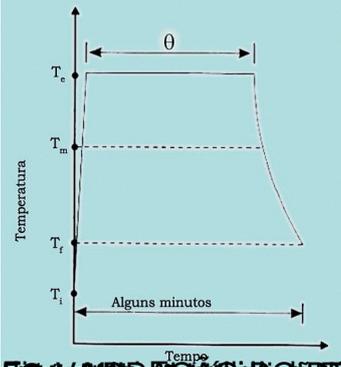
[...] esta modalidade de esterilização vem sendo substituída, sempre que possível, pela esterilização contínua [vide figura 4], na qual se preserva mais a integridade dos constituintes do meio, já que o aquecimento e o resfriamento são praticamente instantâneos, não havendo variação de temperatura na seção de espera, que retém o meio de cultivo a ser esterilizado em temperaturas elevadas, por curto tempo de exposição. Obviamente, a esterilização contínua é essencial para sistemas contínuos de fermentação (PEREIRA JUNIOR, BON e FERRARA, 2008).

Esterilização de equipamentos e materiais em laboratórios de biotecnologia & processos fermentativos

Escrito por Fernanda Silva Lordêlo, Manuel Alves de Sousa Junior, Luis Cesar M.S.Paulillo
Qui, 11 de Novembro de 2010 07:02



Com o tempo, a temperatura sobe até atingir a temperatura de esterilização. Nota: Este valor de θ varia de acordo com o tipo de equipamento e com a quantidade de material a ser esterilizado.



Com o tempo, a temperatura sobe até atingir a temperatura de esterilização. Nota: Este valor de θ varia de acordo com o tipo de equipamento e com a quantidade de material a ser esterilizado.