

ESTERILIZAÇÃO POR CALOR E A CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA

por Gerson Roberto Luqueta

Introdução:

Embora a esterilização por calor não seja nenhuma novidade aos profissionais mais experientes, tenho observado ao longo destes anos como acadêmico e palestrante que ainda existem aspectos técnicos que não estão amplamente compreendidos pelos usuários, levando-os a utilizarem seus equipamentos sem uma noção ampla de suas variáveis e efeitos, culminando muitas vezes em processos pouco otimizados.

O presente artigo tem o objetivo de justificar, de forma simples, o porquê da escolha do processo de esterilização a calor como primeira alternativa como método de controle de contaminação em ambientes e produtos relacionados à saúde humana, abordando nesta primeira fase alguns aspectos normativos e, principalmente, a teoria mecanística que envolve a cinética de morte microbiana. Dentro desta teoria, vamos desenvolver o modelo matemático semilogarítmico da cinética de morte microbiana e firmar o conceito de letalidade do processo, que é uma ferramenta muito importante quando partimos para a definição das variáveis a serem utilizadas e validadas no processo de esterilização.

Definição da esterilização

Segundo as farmacopéias, a esterilidade de um produto é baseada no fato de que o mesmo tenha sido processado em condições ideais e que a amostra representativa submetida ao teste, indique a ausência de microorganismos viáveis.

Como o nível de esterilidade absoluta não pode ser garantido graças a uma série de variáveis, devemos trabalhar de forma a considerar que a esterilidade é um conceito probabilístico. Para produtos farmacêuticos e correlatos, considera-se um artigo estéril quando, depois de submetido a um processo de esterilização, a probabilidade de sobrevivência de microorganismos viáveis esteja na ordem de 10^{-6} . Este nível de esterilidade recebe a designação SAL (Sterile Assurance Level).

Escolha do processo de esterilização

A definição do processo de esterilização depende basicamente do artigo a ser processado. Os métodos de esterilização mais empregados atualmente são aqueles que utilizam como agente esterilizante os seguintes produtos:

- Vapor de água saturada.
- Ar estéril (calor seco).
- Óxido de etileno.
- Mistura de vapor e formaldeído.
- Plasma de peróxido.
- Irradiações ionizantes.
- Filtração esterilizante.

A RDC 210/2003 da ANVISA, no item 17.11.1 cita o seguinte: “A esterilização pode ser feita mediante a aplicação de calor seco ou úmido, agentes gasosos, por filtração esterilizante com subsequente enchimento asséptico dos recipientes finais estéreis, ou

através de irradiação com radiações ionizantes. Cada método tem suas aplicações e limitações particulares. Quando for possível e praticável, a escolha do método deve ser a esterilização por calor.”

A preferência pela esterilização por calor pode ser justificada por apresentar uma série de vantagens como eficácia, velocidade, disponibilidade de metodologias de validação amplamente difundidas, menor risco operacional, boa relação custo/benefício e o baixo impacto ambiental.

Um pouco mais adiante, no mesmo documento, o uso da esterilização por vapor saturado é colocado como primeira escolha quando aplicável: “17.17.1 - Sempre que possível, os produtos devem ser esterilizados nos recipientes finais, preferencialmente por esterilização por calor úmido...”.

Determinação do microorganismo alvo

Uma vez definido o agente esterilizante compatível com o produto a ser processado, devemos também definir o bioindicador a ser utilizado no processo de esterilização para assegurar o SAL. A escolha do microorganismo alvo (ou biocarga alvo) deve ser feita levando-se em consideração alguns fatores como:

- Resistência do MO ao agente esterilizante
- Biomassa do contaminante (LogN/g)
- Idade do MO
- Fatores de proteção externa
- Atividade metabólica

Quando o método de esterilização leva em consideração a sobre-exposição do produto ao agente esterilizante sem degradá-lo, o microorganismo utilizado como bioindicador deve ser aquele que, reconhecidamente, é mais resistente ao processo, com a maior biomassa e com a menor atividade metabólica. Estes fatores, para o bioindicador, devem ser maiores que qualquer outro microorganismo presente no produto a ser processado. Tipicamente, para os processos de esterilização a calor, utilizamos como bioindicadores os microorganismos esporulados secos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 e *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (da mesma família do *Bacillus subtilis*) para esterilização a vapor saturado e a ar estéril, respectivamente.

A cinética de morte microbiana – o modelo semilogarítmico

A aplicação da teoria cinética química trouxe resultados positivos para a compreensão mais profunda da esterilização, bem como para o desenvolvimento industrial do processo.

Embora a teoria seja também aplicável à esterilização por radiação e por agentes químicos, estaremos considerando por enquanto, apenas os fatores envolvidos na esterilização pelo calor.

Embora saibamos que a cinética de morte microbiana não segue necessariamente um modelo linear em toda a sua gama de aplicações (e que não existe um modelo puramente linear), nas aplicações práticas assumimos que a morte da maioria dos microorganismos pela ação do calor seja a resultante de uma reação de primeira ordem.

Para elucidarmos esta tratativa, desenvolvemos o modelo proposto por Rahn (1945) que trata da lei de ação da massa na cinética de morte de um microorganismo, dada por:

$$\frac{dN}{dt} = KN$$

Onde:

N = nº de MO sobreviventes após o tratamento;

t = tempo de tratado;

K = constante (taxa de reação).

Rearranjando a equação e integrando a equação diferencial teremos:

$$\int \frac{dN}{N} = K \int dt$$

O que resulta: $\ln N = Kt + C$

Se considerarmos que no tempo t_0 a população inicial é igual a N_0 e desde que a equação esteja na forma logarítmica, podemos ajustar a constante C para $\ln N_0$, ficando a equação anterior igual a:

$$\ln N = Kt + \ln N_0$$

Este é o modelo de curva de sobrevivência semilogarítmica de Kahn.

Se adotarmos $\ln N = y$ e $t = x$, teremos uma equação linear:

$$y = Kx + y_0$$

A partir deste modelo linear, poderemos desenvolver duas das principais variáveis no tratamento matemático de destruição dos microorganismos: o Valor D_T e o valor Z .

Para alcançarmos nosso objetivo, vamos inicialmente re-arranjar a equação anterior, levando-se em consideração a presença de uma população inicial de microorganismos que chamaremos de N_0 , e de uma população final N :

$$\ln N = Kt + \ln N_0 \Rightarrow \ln \left(\frac{N_0}{N} \right) = Kt$$

Considerando que $\ln x = 2,303 \cdot \log x$ teremos:

$$\log \left(\frac{N_0}{N} \right) = Kt \quad \text{ou ainda} \quad \log \left(\frac{N_0}{N} \right) = 0,4343 \cdot Kt \quad (\text{equação A})$$

Onde K representa o grau de inclinação da curva de sobrevivência.

É justamente a curva de sobrevivência que demonstra o número de sobreviventes em intervalos de tempos após o início da exposição dos microorganismos ao agente esterilizante.

A destruição dos microorganismos pelo calor não se produz de forma instantânea, pois existe uma relação temperatura / tempo / condições gerais do produto a esterilizar (pH, idade das células, grau de contaminação, etc.).

Assim, não podemos falar em “temperatura letal” ou em uma curva de sobrevivência constante sem levar em conta todas as variáveis dentro do estudo Tempo-Temperatura.

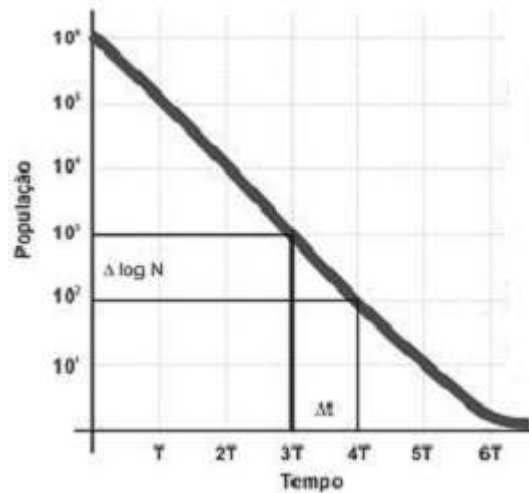


Gráfico semilogarítmico representando uma curva de sobrevivência

Pela curva de sobrevivência:

$$\operatorname{tg} \phi = \frac{\Delta \log N}{\Delta t}$$

Considerando $\Delta \log N$ em um único ciclo logarítmico teremos:

$$\operatorname{tg} \phi = \frac{-1}{\Delta t}$$

Ainda considerando que a variável K representa o grau de inclinação da curva, conforme equação A poderemos re-escrever a equação acima como sendo:

$$K = \frac{-2,303}{\Delta t}$$

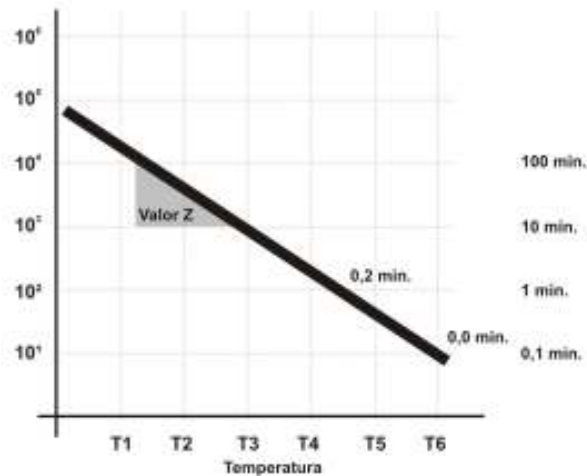
Notem que a expressão acima pode não ser muito amigável, pois sua unidade de medida é -min^{-1} . O termo mais utilizado é o chamado valor D que se relaciona com K da seguinte forma: $D = \Delta t = t_2 - t_1$, portanto:

$$D = \frac{-2,303}{K}$$

Como o valor D é um número positivo para um ciclo de um *log*, é utilizado como número positivo. É importante ressaltar que o valor D varia em função da temperatura. Logo sua notação normalmente é feita na forma D_T , por exemplo: $D_{121} = 1$ min.

Definimos o valor D como: “O tempo (em minutos) necessário para reduzir, numa determinada temperatura, uma população microbiana a um décimo da população inicial”.

Se plotarmos o valor de $\log D_T$ em diferentes temperaturas em um gráfico semilogarítmico, obteremos uma reta. À inclinação desta reta para um ciclo *log* damos o nome de valor Z:



A principal aplicabilidade desse modelo obtido de forma empírica por Bigelow (1921) é relacionar o decaimento logarítmico da população em função da temperatura, ou seja, o valor Z é definido como sendo a variação de temperatura necessária para reduzir a população microbiana em um $\log N$.

O valor Z é utilizado na determinação da letalidade de processo. O cálculo e a determinação do valor Z não é muito adequado acima de 135°C e não é aconselhada sua extrapolação.

Quando se deseja calcular o processo de esterilização, pode-se basear na cinética das reações químicas. Neste caso, o modelo mais usado, que explica a relação do efeito da temperatura com a velocidade de reação é o modelo de Arrhenius.

A relação entre o modelo da cinética de Arrhenius e Bigelow é dado por:

$$E = 4,6 \cdot \frac{T^2}{Z}$$

Onde:

E = energia de ativação (cal/K.mol)

T = temperatura absoluta (K)

Z = Valor Z (°C).

Cálculo do fator e da velocidade de letalidade em esterilizadores a vapor saturado

Normalmente, quando pergunto às pessoas sobre os fatores mais relevantes em um processo de esterilização a calor por vapor saturado obtenho como resposta o binômio tempo-temperatura. O problema é que muitas vezes os usuários não entendem como estas duas variáveis se relacionam e como pequenas variações de temperatura podem implicar em grandes variações de tempo para que se possa atingir o objetivo final: considerar o artigo estéril. A chave para a compreensão desta relação está no uso do conceito da letalidade.

Embora o termo letalidade tenha uma boa gama de definições acadêmicas, costumo defini-lo como sendo “a quantidade de energia total a ser transferida a ponto de obtermos o nível de esterilidade requerido” considerando o tempo de ação do agente esterilizante sobre o microorganismo a uma determinada temperatura.

Para determinarmos o tempo mínimo que um dado microorganismo deve ser exposto ao agente esterilizante para considerarmos o artigo estéril devemos conhecer o valor D_T para a temperatura de trabalho, a população inicial N_0 e a população estimada após o processo de esterilização N . O tempo é calculado da seguinte forma:

$$F = D_T \cdot [\log(N_0) - \log(N)]$$

Matematicamente podemos considerar $N=10^{-6}$ quando a meta for a obtenção do nível *SAL* (*Sterile Assurance Level*). O fator F , que foi introduzido pela indústria alimentícia, mede a letalidade total de um processo de esterilização em relação a um determinado microorganismo.

Uma vez que o valor F considera efeitos letais a diferentes temperaturas, devemos conhecer o valor Z do microorganismo. Quando a temperatura de esterilização é de 121°C e o valor Z é de 10°C , chamamos este fator de F_0 .

Nos sistemas reais, consideramos que temperaturas na ordem de 90°C já produzem algum efeito letal e portanto, podem ser consideradas dentro do perfil de aquecimento e resfriamento em um ciclo de esterilização. Desta forma, para obtermos a letalidade total do processo, basta integrarmos a velocidade de letalidade através do processo para as diferentes temperaturas T , obtendo-se assim o F_0 integrado:

$$F_0 = \int 10^{\frac{(T-121,1)}{10}} dt$$

Este conceito demonstra que pode-se obter o mesmo efeito letal variando-se as variáveis de temperatura e tempo, mas que esta relação é exponencial.

Esterilização por calor seco

O mesmo estudo de letalidade utilizado para a esterilização por vapor saturado pode ser aplicado à esterilização por calor seco, com o desenvolvimento dos valores de D_T e Z típicos. A diferença, neste caso, é que a letalidade de processo é chamada de fator F_H . O valor F_H é conceitualmente idêntico ao valor F da esterilização por vapor saturado, porém utiliza como referência a temperatura de 170°C e valor Z de 20°C .

Conclusão

A esterilização por calor é o método de esterilização mais recomendado para o controle de contaminação em produtos relacionados à saúde humana, uma vez que ele engloba uma série de vantagens, se comparado a outros métodos tais como velocidade, compatibilidade, uso de agentes esterilizantes seguros e abundantes (água e ar), facilidade na monitoração e validação, etc. As principais publicações normativas e orientativas colocam a esterilização por calor como primeira escolha, sempre que aplicável.

O estudo da morte microbiana é de fundamental importância para o desenvolvimento do modelo matemático a ser utilizado para a escolha das variáveis de processo e na obtenção dos valores D e Z.

A determinação da letalidade da esterilização demonstra, sobretudo, a importância da estabilidade da temperatura ao longo do processo para que se possa garantir o nível de esterilidade adequado. Um exemplo típico está na esterilização por vapor saturado, onde a variação de apenas 1°C na temperatura pode variar a letalidade em até 25%.

No próximo artigo, discutiremos como os equipamentos devem ser projetados para atender aos requisitos de estabilidade e performance, garantindo a letalidade calculada.

Referências :

CENTRO DE INFORMAÇÃO EM ALIMENTOS-CIAL/ITAL, (1995), *Manual Técnico: Princípios de Esterilização de Alimentos*. Campinas. 2ª Ed.

CHARM. S.E. (1958). *The Kinetics of bacterial inactivation by heat*. Food Technol., 12,4-8.

DEINDOERFER P. H. and Humphrey. A.E.,(1959). *Analytical method for calculating heat sterilization times*. Appl. Microbiol., 7, 256-264

HELDMAN, D. R.; **NEWSOME**, (2003) R. L., *Kinetic Models For Microbial Survival During Processing*. Food Technology magazine, Vol.57, nº 8.

PINTO, T.J.A.; **KANEKO**, T. M.; **OHARA**, M.T.:(2003), *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. São Paulo. Editora Atheneu.

PFLUG, I. J.,(1999) Ph.D. *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*. Tenth Edition.

Dados do autor:

Eng. Gerson Roberto Luqueta é graduado em engenharia elétrica, professor de mecatrônica do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza (CEETEPS – São Paulo), pós-graduado em termobacteriologia e MBA em gestão empresarial pela FGV-Rio.