

## TRABAJO PRACTICO ESTERILIZACION

### Introducción

La esterilización es un proceso de suma importancia para la industria de las fermentaciones. Para comenzar la explicación de este tema es conveniente dejar en claro dos conceptos fundamentales:

**Esterilización:** es la eliminación completa, ya sea por destrucción o por separación, de toda forma de vida de un objeto o material. Como desgraciadamente la única prueba de supervivencia para un microorganismo es su desarrollo en un medio de cultivo adecuado, no podemos distinguir entre esterilización y cualquier otro proceso que sin matar a los microorganismos les haga perder su capacidad de reproducirse. En el caso de los virus, no podemos tener pruebas de su existencia sin la presencia de un huésped adecuado, prueba que, de hecho, nos haría perder la esterilidad.

Desde el punto de vista industrial es suficiente que en un medio de cultivo sometido a un ciclo de esterilidad no se verifique el desarrollo de ningún tipo de microorganismo.

**Asepsia:** Es la exclusión continua de aquellos microorganismos no deseados.

Razones para esterilizar:

I Para prevenir la transmisión de enfermedades

II Para prevenir la descomposición de materiales por microorganismos

III Para eliminar la competencia por los nutrientes en un medio de fermentación y permitir así el desarrollo específico de un solo tipo de microorganismo de interés industrial, ya sea por ellos mismos o por algún producto generado por ellos.

Los materiales a esterilizar pueden ser de diversos tipos y para distintos usos, por ejemplo:

Sólidos	Equipos permanentes	<ul style="list-style-type: none"><li>• Instrumentos y aparatos de uso microbiológico</li><li>• Ropa para uso en áreas estériles</li><li>• Plantas de manufactura para productos farmacéuticos</li><li>• Fermentadores</li><li>• Equipos para llenado de ampollas</li></ul>
	Equipos y materiales descartables	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hilo de sutura de uso quirúrgico</li><li>• Jeringas descartables, etc.</li><li>• Filtros esterilizantes</li></ul>
Líquidos	Productos farmacéuticos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sólidos de uso parenteral: Antibióticos, etc.</li></ul>
	Líquidos de procesos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Medios de cultivo de laboratorio</li><li>• Caldos de fermentación</li><li>• Nutrientes y precursores para fermentación</li><li>• Agua estéril para procesos</li></ul>

Gases	Productos farmacéuticos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Soluciones para cristalización estéril.</li><li>• Líquidos parenterales</li><li>• Para áreas estériles</li><li>• Para aereación en fermentación</li><li>• Para trasvasamiento de líquidos estériles por presión</li><li>• Para transferencia de líquidos estériles por presión cuando es importante prevenir la oxidación, o hay riesgo de incendio.</li></ul>
	Aire	
	Nitrógeno	

### Métodos de esterilización

Se pueden clasificar en tres tipos según el efecto producido sobre los microorganismos:

- 1 Destrucción
- 2 Muerte o inactivación
- 3 Remoción física

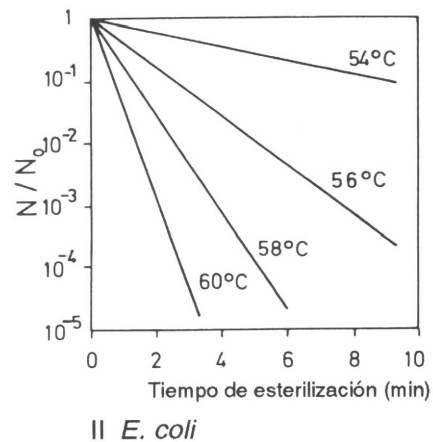
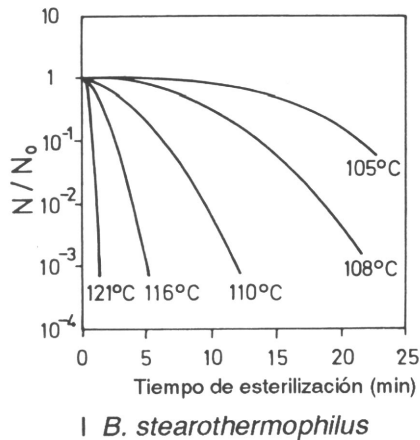
Los del segundo grupo son los más utilizados para medios de fermentación y se pueden dividir a su vez en

- a.- Calor húmedo
- b.- Fuentes de alta energía, (radiaciones ionizantes, UV, etc.):
- c.- Métodos químicos.

De los nombrados, el calor húmedo es el más ampliamente usado y es además el más sencillo de controlar. El mayor problema que presenta su utilización es el cálculo del tiempo mínimo de calentamiento que asegure asepsia y que no produzca una desnaturalización de las sustancias que componen el medio de cultivo. Este tiempo depende del volumen de caldo y del tipo de equipo empleado, sobre todo de la relación volumen/área de intercambio de calor. Para independizarse de estas variables se utiliza un método que se basa en la evolución de las condiciones térmicas necesarias para destruir una determinada cantidad de microorganismos.

### RELACIONES CINÉTICAS

Para los cálculos utilizados en este modelo se han empleado esporas de *Bacillus stearothermophilus*, microorganismo que se caracteriza por ser muy resistente al calor. Las relaciones entre el número de esporas viables y el tiempo de exposición al calor muestran una relación logarítmica de destrucción (cinética de primer orden). En la figura 1 se muestran curvas típicas de destrucción para diferentes temperaturas para células de *E. coli* y esporas de *B. st.* Se puede ver que a 121 °C la destrucción de esporas es aproximadamente 250 veces más rápida que a 105°C.



### Esterilización en batch.

Este es el método más común para esterilización de medios de cultivo. Un reactor con su medio de cultivo se puede calentar de dos formas distintas, por la inyección directa de vapor o por calentamiento indirecto a través de camisa o serpentín. En todos los casos debe calcularse apropiadamente el tiempo de retención a la temperatura de trabajo.

Para calcular ese valor hay que tener en cuenta el volumen a esterilizar, la carga microbiana inicial y el valor final de la concentración de microorganismos deseado.

La inactivación térmica de los microorganismos sigue una cinética del tipo  $\ln \frac{N_0}{N_f} = kt$  en la que  $N_0$  y  $N_f$  son respectivamente el número total de microorganismos al comienzo y al final del ciclo de esterilización.  $N_f$  solo puede alcanzar el valor de cero a tiempo infinito por lo que no puede asegurarse nunca la completa esterilidad del medio de cultivo. Mientras el valor de  $N$  se mantiene por encima de la unidad, el mismo posee significado real, cuando el mismo disminuye y toma valores decimales, su significado es estadístico. Un valor de  $N_f$  de 0,01 implica que es esperable que 1 de cada 100 ciclos de esterilización fallen.

El valor del tiempo de calentamiento se calcula despejando el valor de  $t$  de la ecuación anterior.

El valor de  $k$  depende del medio y, por supuesto, del microorganismo. Su comportamiento en relación con la temperatura, al igual que otras constantes cinéticas, es a través de la ecuación de Arrhenius

$$k = A.e^{-\epsilon/RT}$$

donde  $A$  es una constante de proporcionalidad y no cambia en forma notoria con la temperatura;  $R$ , la ecuación general de los gases,  $T$  la temperatura absoluta y  $\epsilon$  es la energía de activación aparente para la destrucción de los esporos. Si se escribe la

ecuación en forma logarítmica se puede obtener una relación lineal entre  $\ln k$  y  $1/T$  donde la pendiente es  $-\epsilon/R$ .

Dado que los bioreactores de gran tamaño pueden tardar un tiempo considerable en llegar a la temperatura de trabajo y a fin de minimizar el tiempo de retención (lo cual ahorra energía y disminuye la destrucción de componentes del medio) se calcula el tiempo que hay que mantener a  $121\text{ }^\circ\text{C}$  teniendo en cuenta que por encima de  $100\text{ }^\circ\text{C}$  ya existe una considerable destrucción celular.

Como no existe un único valor de  $k$  durante el calentamiento y el enfriamiento, se debe estimar un valor promedio en cada parte del ciclo. Dicha estimación se realiza resolviendo la siguiente ecuación

$$\tilde{k} \text{ (cal o enf)} = \frac{\int_{t_0}^{t_f} k dt}{t_f - t_0}$$

**Practica:**

**Objetivo:**

Determinar experimentalmente el perfil de calentamiento y enfriamiento de un ciclo de esterilización por calor húmedo a fin de calcular el tiempo de retención a  $121\text{ }^\circ\text{C}$ .

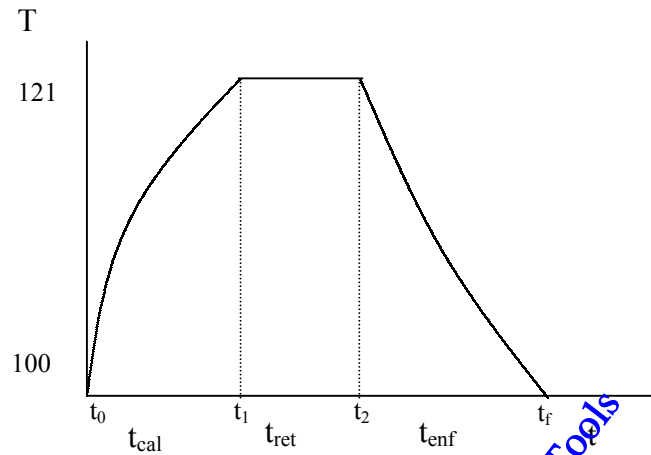
Equipo: Autoclave eléctrica conteniendo un biorreactor con de agua.  
Termocupla.

Procedimiento:

- 1) Se coloca el con agua dentro del autoclave
- 2) Se coloca el extremo de la termocupla dentro del reactor en contacto con el agua
- 3) Se cierra y enciende el autoclave
- 4) Una vez alcanzados los  $100\text{ }^\circ\text{C}$  se toman medidas en función del tiempo de la temperatura de la cámara y del agua dentro del recipiente.
- 5) Cuando la temperatura alcanza  $121\text{ }^\circ\text{C}$  se apaga el autoclave y se registra la temperatura hasta alcanzar nuevamente los  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

La curva obtenida de  $T$  vs.  $t$  es del tipo:

Los tiempos  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_f$  corresponden al comienzo y final del calentamiento (0 y 1) y del enfriamiento (2 y f) y poseen una carga de contaminación  $N_0$ ,  $N_1$ ,  $N_2$  y  $N_f$  respectivamente.



Para calcular el tiempo de retención a 121 °C debe conocerse los valores  $N_1$  y  $N_2$ . Para ello hay que conocer cuanto aportan a la muerte de los contaminantes los períodos de calentamiento y enfriamiento. Para tal fin se toma el valor de  $k$  para cada temperatura de tabla y se realiza una grafica de  $k$  vs.  $t$ . Integrando entre  $t_0$  y  $t_1$  y entre  $t_2$  y  $t_f$  se puede conocer, sabiendo la carga inicial y el nivel de confianza que se desea alcanzar, los valores de  $N_1$  y  $N_2$ . Sabiendo  $N_1$ ,  $N_2$  y  $k_{121}$  se puede calcular fácilmente el tiempo de retención a 121 °C.

Para calcular el tiempo de retención, suponer una contaminación de  $10^5$  UFC/mL y un valor de confianza final de 99,9%.

Método alternativo.

Como una rápida aproximación, se puede utilizar el método conocido como método de los nablas ( $\nabla$ )

Consideraciones: Se supone que los perfiles de calentamiento y enfriamiento por encima de los 100 °C son lineales y con pendiente de un grado por minuto.

Se define entonces al parámetro  $\nabla = \ln \frac{X_0}{X_f} = \int_{t_0}^{t_f} k dt$  y se asume que el valor de  $\nabla$  es 0

a 100 °C se puede construir una tabla de valores de  $\nabla$  alcanzados antes de arribar a cada temperatura. La siguiente tabla se obtuvo mediante la integración de un perfil lineal de 1 °C/min utilizando los valores de  $k$  dados por la ecuación de Arrhenius para el *B. st.*

Temp	k min <sup>-1</sup>	∇	Temp	k min <sup>-1</sup>	∇
100	0.019	0	116	0.835	3.989
101	0.025	0.044	117	1.045	5.034
102	0.032	0.076	118	1.307	6.341
103	0.040	0.116	119	1.633	7.973
104	0.051	0.168	120	2.037	10.010
105	0.065	0.233	121	2.538	12.549
106	0.083	0.316	122	3.160	15.708
107	0.105	0.42	123	3.929	19.638
108	0.133	0.553	124	4.881	24.518
109	0.168	0.720	125	6.056	30.547
110	0.212	0.932	126	7.506	38.080
111	0.267	1.199	127	9.293	47.373
112	0.336	1.535	128	11.494	58.867
113	0.423	1.957	129	14.200	73.067
114	0.531	2.488	130	17.524	90.591
115	0.666	3.154			

Método de cálculo:

Se divide a la esterilización en tres periodos, calentamiento, retención y enfriamiento. Entonces:

$$\nabla_{tot} = \nabla_{cal} + \nabla_{ret} + \nabla_{enf}$$

donde  $\nabla_{tot} = \ln \frac{X_0}{X_f}$

$\nabla_{cal}$  y  $\nabla_{enf}$  sacan de la tabla el igual que  $k_{ret}$ . Calculando  $\nabla_{tot}$  se puede despejar el tiempo de retención sabiendo que  $\nabla_{tot} = k_{ret} t_{ret}$

Si la velocidad de calentamiento o enfriamiento fueran distintos a 1 °C/min, el valor

de  $\nabla$  se corrige de la siguiente forma:  $\nabla_{corr} = \frac{\nabla_{tabla} \times t_{exp}}{t_{tabla}}$

donde  $t_{exp}$  es el tiempo experimental de calentamiento o enfriamiento y  $t_{tabla}$  es el tiempo teórico para alcanzar la T de trabajo con un perfil de 1°C/min.

**Calcular el tiempo de retención con este método y compararlo con el tiempo obtenido por el método de integración.**