

CAP. 01**CONCEITOS BÁSICOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO****Thereza Christina Vessoni Penna****Irene Alexeevna Machoshvili****1.1 ESTERILIZAÇÃO TÉRMICA. CONCEITOS BÁSICOS DA CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA.****INTRODUÇÃO**

Esterilização é o processo que objetiva destruir todas as formas de vida com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de conservação e de utilização do produto. Conservar é manter as características do produto durante a vida útil de armazenamento (vida de prateleira) à temperatura ambiente.

Esterilidade ou nível de segurança é a incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização, durante a conservação e utilização de um produto. A manutenção do nível de esterilidade conferido a um produto garante o prolongamento da vida útil de prateleira e depende das operações pré-esterilização, de esterilização e pós-esterilização.

Os métodos de esterilização permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas em produtos farmacêuticos, médico-hospitalares e alimentícios. O método escolhido depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presente no item considerado. O calor, a filtração, a radiação e o óxido de etileno podem ser citados como agentes esterilizantes.

O calor não é somente o agente esterilizante mais usado como também o mais econômico e mais fácil de controlar. O calor úmido quando comparado ao calor seco é um processo efetivo em função do uso de temperaturas mais baixas e, do curto período de tempo necessário para garantir o nível de esterilidade proposto².

Sendo os esporos bacterianos altamente resistentes às condições ambientes adversas, eles são usados como indicadores biológicos na avaliação do nível de esterilidade atingido, e de possíveis falhas operacionais.

Esporos de *Bacillus stearothermophilus* são considerados convenientes indicadores biológicos na esterilização pelo calor úmido, particularmente à temperatura de referência de 121°C. Os esporos de *Bacillus subtilis* são empregados nos processos de esterilização pelo calor seco e pelo óxido de etileno e os esporos de *Bacillus pumilus* indicados para validar processos cujo agente esterilizante é a radiação iônica^{1,6,7}.

No método de esterilização onde se emprega o calor úmido, na forma de vapor saturado, o agente responsável pelo aquecimento é o vapor de água saturado, ao qual correspondem valores de temperatura e de pressão definidos. A completa retirada de ar da câmara de esterilização assegura ao sistema atingir a temperatura de esterilização definida, à pressão correspondente àquela indicada no manômetro do equipamento⁵.

A ação letal do calor é uma relação tempo - temperatura, dependente de fatores que definem a intensidade do tratamento e do tempo de exposição ao calor para reduzir a população microbiana a níveis estabelecidos.

Os indicadores físicos e biológicos são recomendados para validar ciclos de esterilização e condições de processamento: (i) os indicadores físicos, termopares conectados a um registrador de temperatura, são distribuídos em diferentes pontos da

câmara e da carga, e medem a distribuição do calor, indicando os pontos frios; e (ii) os indicadores biológicos, microrganismos resistentes ao agente esterilizante, são utilizados para verificar se as medidas físicas garantem o nível de esterilidade estabelecido^{3,6,7}.

O procedimento tempo - temperatura selecionado depende do produto, do tipo, do teor e da fonte dos contaminantes antes da esterilização, da aplicação de métodos para minimizar tal contaminação e preveni-la pós - processamento, contribuindo para assegurar o êxito da esterilização^{4,5}.

CRESCIMENTO MICROBIANO

Às condições favoráveis de crescimento, os microrganismos presentes nos produtos, iniciam sua multiplicação. Se forem realizadas contagens microbianas periódicas, estas podem ser representadas graficamente colocando o logaritmo decimal do número de microrganismos viáveis por mililitro de diluição do produto em questão na ordenada (eixo de y) e a unidade de tempo de crescimento na abscissa (eixo de x). Obtém -se assim a curva de crescimento, que é caracterizada por quatro fases distintas, denominadas de fase de latência (lag), exponencial ou logarítmica, estacionária e de declínio ou morte

A fase de latência caracteriza o tempo necessário ao ajuste dos microrganismos ao novo ambiente físico-químico. O prolongamento máximo dessa fase aumenta a vida útil de prateleira do produto.

Durante a fase logarítmica ou exponencial, as células se dividem em ritmo constante, e o incremento do número de células é diretamente proporcional ao tempo de geração. A velocidade de multiplicação bacteriana é proporcional ao número de células presentes, e pode ser representada pela equação^{1,4}: $\text{Log } N = \text{Log } N_0 + (k/2.303)t$ (1), onde Log N é o

logarítimo decimal da população após um tempo (t) de incubação (horas); $\text{Log } N_0$ é o logaritmo decimal da população no tempo inicial ($t = 0$); k é a constante de velocidade específica de crescimento por hora (h^{-1}). A fase logarítmica deve ser inibida antes, durante e após o processamento do produto, definindo o nível de esterilidade do produto final.

O tempo necessário para que o número de células dobre, isto é $N=2N_0$ é denominado tempo de geração (g). Substituindo N por $2N_0$, a equação (1) pode ser representada por $\text{Log } (2N_0)=\text{Log}N_0+(k/2.303)g$, ou por $\text{Log } (2N_0) - \text{Log } N_0= (k/2.303)g$ onde $\text{Log } (2N_0/N_0)=(k/2.303)g$, e $\text{Log } 2 = (k/2.303) g$. Portanto $g= (2.303/k)\text{Log } 2$, então $g= 0.693/k$. O tempo de geração (g) é expresso em horas. A velocidade de crescimento é normalmente expressa em termos de tempo de geração ou por seu recíproco, a constante de velocidade exponencial de crescimento expressa em gerações por hora, obtida da relação: $\mu=1/g$.

Na fase estacionária a velocidade de crescimento é constante, o microrganismo é mais resistente a qualquer agente físico (calor, radiação) ou químico (cloro, óxido de etileno). Para bactérias do gênero *Bacillus* e *Clostridium* é a fase de esporulação, dependendo da temperatura e do valor do pH do produto.

Durante a fase de morte ou inibição do crescimento o número de células viáveis decresce em ritmo constante, e logaritmicamente, frente às condições desfavoráveis do meio ambiente. O processo de esporulação continua.

Para acelerar a fase de morte microbiana, foi escolhido o calor úmido como agente esterilizante físico destrutivo.

DESTRUIÇÃO MICROBIANA

O produto se mantém conservado se não houver a manifestação dos microrganismos presentes; isto significa dizer que, após a exposição ao calor úmido, poderá haver microrganismos dormentes ou em estado latente de sobrevivência, que não se multiplicarão durante a vida útil de prateleira, porque o produto não oferece condições favoráveis de germinação e reprodução.

Os procedimentos de esterilização, de pasteurização e de higienização utilizam o calor úmido no controle da carga microbiana presente no produto.

O número final de microrganismos sobreviventes expostos ao calor úmido representa o efeito do processo. A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica, equivalente à cinética química de uma reação de 1ª ordem. O fenômeno de destruição térmica pode ser representado pelo modelo de curva linearizada, semi - logarítmica de sobreviventes. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição à temperatura constante resulta em curva linearizada decrescente. A variação do número de sobreviventes, com o tempo de exposição, é função do número de microrganismos inicialmente presentes, e é representada pela equação: $\text{Log } N_f = \text{Log } N_0 - (k/2.303)t$ (2), onde $\text{Log } N_f$ é o logaritmo decimal da população sobrevivente após um tempo (t) de exposição; $\text{Log } N_0$ é o logaritmo decimal da população no tempo inicial (t=0); k é a constante de velocidade específica de destruição por unidade de tempo (t). Para um mesmo microrganismo todos os parâmetros de tratamento devem ser mantidos constantes durante o tempo de exposição estabelecido; pois a resistência térmica é função da concentração de vapor úmido presente.

Para o modelo de curva semi - logarítmica de sobreviventes, o tempo necessário para a destruição de 90% da população de esporos é o intervalo de tempo exigido para a curva percorrer 1 (um) ciclo logarítmico. O intervalo de tempo de redução decimal (valor D) é o principal parâmetro de avaliação das características de termoresistência da população microbiana homogênea.

O valor D ou Tempo de Redução Decimal é o intervalo de tempo à temperatura constante de tratamento para uma redução de 90% da população microbiana, inicialmente presente no produto. O valor D é o inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta calculada utilizando-se do método da regressão linear, através dos mínimos quadrados, aplicado à região linear da curva de sobrevivência. O valor D relaciona-se à constante específica de reação através da relação: $D = (2.303/k)$ (3). Portanto a equação (2) pode ser igualmente representada por $\text{Log } N_f = \text{Log } N_0 - (1/D)t$ (4).

O nível de destruição térmica (n) é o número de ciclos logarítmicos reduzidos [$n = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_f = \text{Log } (N_0 / N_f)$] (5) na população microbiana. Se o nível de destruição térmica corresponder a um ciclo reduzido (n=1), então o tempo total de processo (t) é equivalente ao tempo de redução decimal valor D. Logo o tempo de processo à temperatura de referência (T_r) é um múltiplo do tempo de redução decimal: $t_{Tr} = n \times D_{Tr} = [\text{Log } (N_0 / N_f)] \times D_{Tr}$ (6).

O bioindicador adequado deve apresentar uma população de esporos e uma termoresistência ao processo de esterilização superiores àquelas dos microrganismos originalmente presentes no produto a ser esterilizado.

NÍVEL DE ESTERILIDADE OU “STERILITY ASSURANCE LEVEL” (SAL)

O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população do bioindicador define o nível de esterilidade ou “Sterility Assurance Level”(SAL) do produto final. O nível de segurança do processo define a probabilidade de falha prevista para a operação, estabelece o número final de sobreviventes (N_f) por unidade de produto e define o tempo de processo à temperatura de referência.

Os níveis de destruição e de número final (N_f) de esporos sobreviventes por unidade de produto, assumindo população inicial unitária ($N_0 = 1$ UFC), sugerem uma população sobrevivente de *Clostridium botulinum* de $N_f = 10^{-12}$ UFC (1 unidade contaminada para cada 10^{12} unidades do produto) equivalente a 12 ciclos reduzidos; para bactérias mesófilas não patogênicas (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*) uma população final de $N_f = 10^{-5}$ UFC (1 unidade contaminada para cada 10^5 unidades do produto) equivalente a 5 ciclos reduzidos; para bactérias termófilas não patogênicas (*Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum*), $N_f = 10^{-3}$ UFC (1 unidade contaminada para cada 10^3 unidades do produto) equivalente a 3 ciclos reduzidos.

O nível de esterilidade é o nível de certeza de ausência de multiplicação microbiana, durante a conservação e utilização de um produto; e depende da população inicial (N_0) do produto. O nível de segurança definido em $N_f = 10^{-6}$ (uma unidade de produto contaminada em cada 10^6 unidades expostas) é equivalente à redução de 12 ciclos logarítmicos na população microbiana original do produto, admitindo $N_0 = 10^6$ UFC por unidade. As medidas preventivas podem aumentar o nível de segurança para um universo superior a $N_f > 10^{-6}$ UFC por unidade do produto.

CURVA TDT. VALOR Z.

A relação entre tempos de processo a diferentes temperaturas para um mesmo nível de destruição microbiana é definida através da curva do tempo de destruição térmica (TDT- thermal death time). A curva TDT é representada pelo logaritmo decimal do tempo de redução decimal (D) ou de seus múltiplos ($t = n \times D$) em função da temperatura de referência. Para o modelo de curva TDT semi - logarítmica, o intervalo de temperatura necessário para a redução de 90% do tempo de redução decimal (valor D) é denominado valor z. Se o valor D_{T_1} à temperatura T_1 for conhecido, então o valor D_{T_2} à temperatura T_2 pode ser calculado, através da curva TDT representada pela equação: $D_{T_2} / D_{T_1} = 10^{(T_1-T_2)/z}$ (7). Portanto, o valor "z" representa o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição. Quanto menor o valor z, tanto maior a variação da velocidade de destruição com a temperatura de exposição.

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO. VALOR F_{Tr} .

Na determinação dos parâmetros de resistência térmica de microrganismos, o tempo de aquecimento e de resfriamento são desprezados, e a temperatura de tratamento é mantida constante.

Na prática, os tratamentos a temperaturas constantes são raros devido à inércia térmica dos materiais.

Para avaliar o efeito do tratamento em termos de número de ciclos reduzidos na população microbiana, as temperaturas variáveis do produto em relação ao tempo de

processo, o valor F_{Tr} ou o tempo equivalente, à temperatura de referência deve ser determinado.

Valor F_{Tr} é o intervalo de tempo de aquecimento necessário, à temperatura de referência constante, para se obter o nível de destruição pré-estabelecido. O valor F_{Tr} é o tempo equivalente, em minutos, à temperatura de referência que o produto permaneceria, considerando aquecimento e resfriamento instantâneos. O nível de destruição térmica ou letalidade do processo pode ser calculado a partir da multiplicação do número de reduções logarítmicas (n) pelo valor D específico à temperatura de referência ($F_{Tr} = n.D$).

A temperatura de referência depende do tratamento térmico empregado, assim como do indicador biológico escolhido. O valor F_{Tr} pode vir acompanhado por dois índices F_{Tr}^z , que indicam temperatura de referência T_r e o valor z . Logo, $F_{121^\circ C}^{10^\circ C}$ é o tempo equivalente de processo à temperatura de referência de $121^\circ C$, para valor “ z ” de $10^\circ C$.

Para calcular o valor F_{Tr} é necessário conhecer a variação da temperatura do produto com o tempo de processo. A equação que relaciona o valor F e a variação da temperatura do produto com o tempo de processo é simplificada para: $F_{Tr} = \int 10^{(T-Tr)/z} dt$; sendo a taxa letal (L) representada por: $L = 10^{(T-Tr)/z}$. O valor F_{Tr} representa a área sob a curva da relação da taxa letal com o tempo de tratamento. O método mais utilizado para estimar a área sob a curva e determinar o valor F_{Tr} é aquele proposto por PATASHNIK, denominado método trapezoidal. Sendo a taxa letal (L) adimensional, o produto da sua multiplicação com o tempo de tratamento tem unidade de tempo, e é equacionado por: $F_{Tr} = \Sigma (L_1+L_2+L_3+L_4...L_{n-1}) \times \Delta t$, onde Δt é o intervalo de tempo entre duas medidas sucessivas de temperatura.

O método trapezoidal de PATASHNIK só pode ser utilizado quando o intervalo de tempo entre duas leituras sucessivas de temperatura for constante, inferior ou igual a dois minutos. Para este método o número de medidas de temperatura do tempo de tratamento deverá ser o máximo conseguido, para que o valor F seja muito próximo ao real.

1.2 INDICADORES BIOLÓGICOS

Indicador biológico consiste de um preparado de um microrganismo específico, resistente a um determinado processo de esterilização. É usado para qualificação de uma operação física de um aparelho de esterilização, no desenvolvimento e estabelecimento de processo de esterilização validado para um artigo específico, e na esterilização de equipamento, material e embalagens para processamento asséptico. É usado também para monitorar um ciclo de esterilização uma vez estabelecido.

O indicador biológico apresenta-se em duas formas principais, cada uma das quais incorpora uma cultura viável de uma espécie conhecida de microrganismo. Em uma, os esporos são adicionados a um veículo (disco ou tira de papel de filtro, vidro ou plástico) e embalado de modo que mantenha a integridade da carga inoculada e que o agente esterilizante exerça seu efeito quando necessário. Em outra, os esporos são adicionados a unidades representativas do lote a ser esterilizado (produto inoculado), ou a unidades similares (produto similar inoculado). Um produto inoculado não deve afetar adversamente as características de performance dos esporos viáveis. Se o material a ser esterilizado é um líquido, e se for impraticável adicionar um indicador biológico a unidades selecionadas do lote, esporos viáveis podem ser adicionados a um produto similar, mas com a condição de que a resistência do produto ao processo de esterilização seja a mesma do produto original a ser esterilizado.

Um indicador biológico usado para monitoramento de um processo de esterilização pode ser inadequado, e pode também ser insatisfatório para validação de ciclos de esterilização que podem diferir em suas necessidades para aplicações específicas.

O uso eficiente dos indicadores biológicos para o monitoramento de um processo de esterilização requer profundo conhecimento do produto a ser esterilizado e suas partes componentes (material e embalagens) e no mínimo uma idéia geral dos prováveis tipos e número de microrganismos constituintes da carga microbiana do produto antes da esterilização.

Para uma esterilização segura usando um indicador biológico contendo 5×10^5 a 5×10^6 esporos de uma cepa específica por unidade de indicador, as seguintes características são obtidas .

Indicador biológico

O indicador biológico ou bioindicador pode ser definido como preparação caracterizada de microrganismos específicos, e portadores de grande resistência a um particular processo de esterilização. Bioindicadores de conhecidos níveis de população microbiana são utilizados com o propósito de dar segurança ao processo de esterilização executado.

Esporos de *Bacillus stearothermophilus* são usados como indicador biológico nos processos de esterilização pelo vapor úmido, esporos de *Bacillus subtilis* empregados nos processos de esterilização pelo calor seco e pelo óxido de etileno e esporos de *Bacillus pumilus* indicados para validar processos cujo agente esterilizante é a radiação iônica (USP XXIII).

Esporos de *Bacillus stearothermophilus* são considerados convenientes indicadores biológicos na esterilização pelo calor úmido, particularmente na temperatura de 121°C.

Esporos viáveis de microrganismos considerados indicadores biológicos adequados à validação do sistema em autoclave devem sobreviver ao tratamento de 100°C durante 10 horas .

As culturas viáveis, de microrganismos resistentes ao processo de esterilização específico, podem ser usadas na forma de suspensão, ou impregnadas em veículos como por exemplo fitas de papel de filtro, sendo imprescindível não haver interferência do veículo na resistência do microrganismo (USP XXII).

Fita de papel filtro inoculada com número definido de esporos de uma cepa bacteriana selecionada e de conhecida resistência a um determinado tipo de esterilização é um bioindicador muito usado. O veículo inoculado deverá ser embalado individualmente, de forma que seja mantida a sua integridade, e quando usado apropriadamente sofra o efeito do agente esterilizante .

Quando usados na forma de suspensão, os bioindicadores são adicionados à unidades representativas da carga a ser esterilizada e quando impregnados em veículos deverão ser colocados em posições estratégicas, assegurando uma homogeneidade de ação em todos os pontos da câmara esterilizante .

As principais vantagens dos bioindicadores em fitas de papel de filtro são: baixo custo, pequeno tamanho e facilidade no manuseio .

Esterilidade absoluta (100% de morte) teoricamente não existe, devido à natureza logarítmica da cinética de morte microbiana .

O indicador biológico é o parâmetro escolhido para certificar-se de que o nível de esterilidade estabelecido para o produto é alcançado, conferindo a certeza de esterilidade frente à margem de segurança mínima definida de apenas 1 unidade contaminada em 10^6 unidades do produto processado (VESSONI PENNA, 1994).

Segundo GRAHAM & BORIS (1993) é necessário que haja um controle adequado na fabricação, no armazenamento e no emprego dos bioindicadores. Este controle é fundamental, em função de muitos fatores influenciarem no desempenho ideal do indicador biológico.

Segundo a USP XXII, é de suma importância que o usuário faça uma completa avaliação do indicador biológico antes de colocá-lo em uso, e assim confirmar se o mesmo é portador das características exigidas.

CAPUTO et al. (1980) alertaram que sendo o crescimento resposta de um indicador biológico rotineiramente usado na fabricação e na liberação de produtos estéreis,

um controle adequado no sistema de recuperação assegura uma válida representação da eficiência do processo. Após serem submetidos ao processo de esterilização, os esporos de *Bacillus stearothermophilus* deverão ser estocados ao intervalo de 2°C a 8°C até o momento da inoculação no meio de cultura. O armazenamento ao intervalo de 20°C a 25°C poderá afetar a viabilidade dos mesmos.

A recuperação dos esporos de *Bacillus stearothermophilus* é mais eficiente quando gorduras ácidas são absorvidas pelo amido adicionado ao meio (ZECHMAN & PFLUG, 1991).

O cloreto de sódio e a púrpura de bromocresol, quando adicionados ao meio de recuperação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* estressados pelo calor devem ser usados em pequenas proporções uma vez que, em quantidades elevadas atuam como inibidores (ZECHMAN & PFLUG, 1991); GRAHAM & BORIS, 1993).

SIKES (1993) , JAY (1994) e seus colaboradores indicam o uso do cálcio na suplementação do meio de cultura como um fator favorável à recuperação dos esporos de *Bacillus stearothermophilus*, quando esses são submetidos ao processo de esterilização.

As preparações comerciais de indicadores biológicos devem favorecer o uso adequado dos mesmos e fornecer as seguintes informações: cepa, ATCC, número de esporos por veículo, número de lote, valores dos parâmetros característicos de termoresistência e informação para a determinação dos mesmos, indicação de uso, forma adequada de armazenamento e prazo de validade (FARM. BRAS. IV).

Quando usado na forma adequada o bioindicador quantifica satisfatoriamente a eficiência do processo de esterilização pela integração dos fatores letais de tempo e de temperatura, sobre a população microbiana. Portanto, ele tem por função estabelecer, avaliar e monitorar os parâmetros físicos do ciclo de esterilização para o equipamento definido, qualificar o nível de esterilidade alcançado e documentar a eficiência do processo.

Características de Indicador Biológico Típico

Tipo de Esterilização	Exemplo de valor D típico (minutos)	Faixa dos valores D para seleção de BI apropriado (min)	Limites para uma resistência apropriada (Dependentes de um valor D particular)	
			Tempo de sobrevivência	Tempo de morte
Calor Seco 160°C	1,9	Mín. 1,0 Máx. 3,0	Mín. 4,0 Máx. 12,0	10,0 30,0
Calor Seco 121°C	5,0	Mín. 2,0 Máx. 15,0	Mín. 8,0 Máx. 60,0	20,0 150,0
Óxido de Etileno (600 mg/l) 54° 60 RH%	3,0	Mín. 2,6 Máx. 5,8	Mín. 10,4 Máx. 23,2	26,0 58,0
Vapor 121°C	1,9	Mín. 1,5 Máx. 3,0	Mín. 6,0 Máx. 12,0	15,0 30,0

Referência Bibliográfica

1. FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo, Atheneu, 1988. pt. 1, cap. X. 1 - 2
2. INTERNATIONAL FEDERATION OF THE PHARMACEUTICAL INDUSTRIES. Sterility assurance based on validation of the sterilization process steam under pressure. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v. 43, n. 5, p. 226-230, 1989.
3. INTERNATIONAL FEDERATION OF THE PHARMACEUTICAL INDUSTRIES. Validation and control of non-standard sterilization process. *J. Parenter. Sci. Technol.* Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 1- 15, 1993.
4. VESSONI PENNA, T. C. Validação de processos de esterilização. Conceitos básicos *Laes & Haes*, São Paulo, v.15, n. 88, p. 46-48, 1994.
5. VESSONI PENNA, T. C., MACHOSHVILI, I. A., BASTON, L.M. Importância da autoclave em lactário hospitalar. *Laes & Haes*, São Paulo, v.16, n.91. p.68-74. 1994.
6. UNITED States Pharmacopeia. 22 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990., p.1706-1710, 1625-1626.
7. UNITED States pharmacopeia. 23. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 1847-1849, 1976-1981.
8. Graham, G. S. and Boris, C. A. "Chemical and biological indicators". In: R. F. Morrissey, and G. B. Phillips eds. "Sterilization Technology: a practical guide for manufacturers and users of health care products". Van Nostrand Reinhold, New York, 1993. p. 36-69.
9. CAPUTO, A. R., ROHN, K. J., MASCOLI, C. C. Recovery of biological indicator organisms after sublethal sterilization treatment. *J. Parenter. Drug Assoc.*, Philadelphia, v. 34, n. 5, p. 394-397, 1980.

10. ZECHMAN, L. G., PFLUG, I. J. *Bacillus stearothermophilus* spore recovery altered by media concentration and formulation. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 56, n. 5, p. 1408 - 1411, 1991
11. SIKES, A., WHITFIELD, S., ROSANO, D. J. Recovery of heat-stressed spores of *Bacillus stearothermophilus* on solid media containing calcium and magnesium-deficient agar. *J. Food Prot.*, Ames, v. 56, n. 8, p. 706-709, 1993.
12. Vessoni Penna, T.C., Machoshvili, I.A., Taqueda, M.E.S. "*Bacillus stearothermophilus* sporulation response to different composition media", *Journal of Parenteral Science Technology*, 52(5): 198-208, 1998.

LITERATURA RECOMENDADA

Gerhardt,P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Krieg,N.R. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, 1994.

Adams, M.R.; Hope, C.F.A. Rapid methods in food microbiology. Elsevier Science Publishers B.V., 1989.

Collins, C.H. Métodos microbiológicos. Ed. Acribia, 1969.

Kirsop, B.E.; Snell, J.J.S. Maintenance os microorganisms. A manual of laboratory methods. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. Academic Press, Inc., 1984.

Sgarbieri, V.C. Proteínas em alimentos protéicos. Livraria Varela LTDA, 1996.

Tortora, G.J.; Funke,B.R.; Case, C.L. Introducción a la microbiología. Ed. Acribia, S.A., 1993.