

**UM PROCEDIMENTO SIMPLES PARA A
REUTILIZAÇÃO DE MATERIAL PLÁSTICO
PARA CULTURAS CELULARES**



EMBRAPA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Vinculada ao Ministério da Agricultura

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES - CNPSA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: José Sarney

Ministro da Agricultura: Iris Rezende Machado

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Presidente: Ormuz Freitas Rivaldo

Diretores: Ali Aldersi Saab

Derli Chaves Machado da Silva

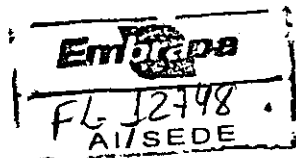
Francisco Ferrer Bezerra

Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves - CNPSA

Chefe: Paulo Roberto Souza da Silveira

Chefe Adjunto Técnico: Hacy Pinto Barbosa

Chefe Adjunto de Apoio: Adenir José Basso



Um procedimento simples para a reutilização de
material plástico para culturas celulares

Cheryl Ann Rowe - Biol., B.Sc.

Carlos H. Romero - Méd. Vet., Ph.D.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura
Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves - CNPSA
Concórdia, SC.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à
EMBRAPA-CNPSA
BR 153 - Km 110 - Vila Tamanduã
Caixa Postal D-3
89.700 - Concórdia - SC
Telefone: (0499) 440122 e 440070
Telex: (0492) 271 EBPA BR

Tiragem: 500 exemplares

Rowe, Cheryl Ann

Um procedimento simples para a reutilização de material plástico para culturas celulares, por Cheryl Ann Rowe e Carlos H. Romero. Concórdia, SC, EMBRAPA-CNPSA, 1987.

9p. (EMBRAPA-CNPSA. Documentos, 13)

1. Medicina veterinária - técnicas de laboratório. I. Romero, Carlos H. , colab. II. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Concórdia, SC. III. Título. IV. Série.

○ CDD. 636.089028

© EMBRAPA-1987

SUMÁRIO

1. Introdução	5
2. Metodologia	7
3. Resultados e Conclusão	9

UM PROCEDIMENTO SIMPLES PARA A REUTILIZAÇÃO DE MATERIAL PLÁSTICO PARA CULTURAS CELULARES

1. INTRODUÇÃO

Material de plástico é usualmente utilizado no laboratório para o cultivo de células, especialmente, para a propagação e ensaios com vírus. O crescimento celular na superfície de plástico é sempre superior àquele obtido em material de vidro, devido a uma melhor adesão celular ao material plástico não tóxico e a tratamentos especiais da superfície de crescimento na fase final do processo de fabricação. As paredes finas dos utensílios de plástico facilitam também a avaliação microscópica das culturas, especialmente para avaliação da atividade citopática dos vírus. A única grande desvantagem dos recipientes de plástico, reside no fato de serem tradicionalmente descartáveis, de utilização única, onerando ostensivamente os seus custos. Os utensílios de plástico, porém, podem ser reutilizados após tratamento com óxido de etileno, mas o equipamento esterilizador é caro e o processo de degasificação é lento. Relatos recentes indicam, que as microondas são eficientes na esterilização de alimentos (Culkin & Fung 1975) e garrafas de plástico (Sanborn et al. 1982).

No laboratório de Virologia, manipulam-se constantemente vírus de aves e suínos, os quais são propagados em culturas celulares cultivadas em recipientes de plástico, importados geralmente dos EUA. Devido ao alto custo do material,

de não se dispor de produtos nacionais de idêntica qualidade e das dificuldades na importação de novo material, foi necessário desenvolver um método de desinfecção, lavagem e esterilização que permitisse a reutilização do material plástico. Após breve fase de experimentação, demonstrou-se que um procedimento que envolvia desinfetantes clorinados e tratamento com microondas parecia a combinação ideal para a reciclagem dos utensílios de plástico. Os plásticos testados correspondem a garrafas Corning de 150, 75 e 25cm²; placas de Petri Falcon de 150 x 25 mm, 100 x 20 mm, 60 x 15 mm e 35 x 10 mm; placas Falcon, Linbro e Dynatech, para microtitulação, de poliestireno de 127 x 95 mm e de 96 orifícios de fundo plano. As células manipuladas nestes utensílios foram: culturas celulares primárias de fibroblastos e de fígado de embrião de galinha, rim de pinto, células primárias de rim de suíno e as linhagens celulares Vero, MA-104, SK-6, (rim de suíno) e FLK (rim de feto ovino). Os seguintes vírus de aves são rotineiramente propagados para fins de preparação de antígenos para imunodifusão, soroneutralização e ensaio imunoenzimático (ELISA) ou para fins de isolamento primário e preparação de estoques: vírus da doença de Marek, vírus herpes de peru, vírus da bronquite infecciosa, adenovírus tipo I de perus e frangos, vírus da bouba, reovírus, vírus da doença de Gumboro, vírus da síndrome da queda de postura e vírus da laringotraqueíte infecciosa. Similarmente, são ensaiados os vírus da gastroenterite transmis-

sível e o vírus da doença de Aujeszky. Todos esses vírus são citopatogênicos in vitro, induzindo alterações citopáticas quando avaliados em culturas celulares susceptíveis. O procedimento aqui descrito tem sido eficaz em descontaminar os utensílios de plástico reciclados de todos os vírus mencionados não se havendo observado sequer um caso de contaminação viral cruzada devido a possível deficiência deste método de esterilização.

2. METODOLOGIA

Como aparelho esterilizador, utiliza-se um forno de microondas, de fabricação nacional, marca Sanyo, Modelo EM 9003B, que opera na frequência de microondas de 2450 MHz.

O procedimento de reciclagem do material plástico para culturas celulares é o seguinte:

O material plástico contendo culturas infectadas ou não infectadas é submerso em bandeja de plástico, contendo 10 - 15 litros de solução de hipoclorito de sódio, a 2% em água de torneira, permanecendo ali por um período mínimo de 16 horas. A solução de hipoclorito descola e desintegra as células, assim como, inativa os vírus dos sobrenadantes e os vírus liberados como consequência do rompimento celular. Exerce também uma função de limpeza das superfícies internas e externas do plástico. Os utensílios de plástico são agitados ao serem retirados do hipoclorito, para descolar completamente os detritos celulares.

res, e enxaguados imediatamente, seis vezes em água de torneira. Após rápida drenagem, os plásticos são colocados em bandejas com 15 litros de água destilada, onde são enxaguados outras seis vezes. Finalmente, o material é transferido a outra bandeja contendo 15 litros de água destilada em destilador de vidro, enxaguando-se outras seis vezes, para logo ser drenado e secado na estufa a 48°C. O material é estocado e esterilizado imediatamente antes de sua utilização. Antes de iniciar o processo de esterilização, coloca-se um frasco de vidro contendo aproximadamente 300 ml de água comum (até a metade do frasco) no centro da placa de vidro no interior do forno. As garrafas são esterilizadas na posição vertical, com as tampas frouxas, em número máximo de quatro a seis; as placas de Petri e as placas para microtitulação são esterilizadas em apenas uma camada com a superfície para o crescimento celular para cima e com as tampas fechadas. A esterilização é realizada durante 6 a 8 minutos, utilizando-se o seletor Forte do forno de microondas. Ao final de cada ciclo de esterilização, se faz necessário resfriar a placa de vidro na torneira de água comum antes de iniciar um novo ciclo de esterilização. Esta última operação evita o sobreaquecimento do vidro e a deterioração do plástico.

3. RESULTADOS E CONCLUSÃO

Este simples, rápido e relativamente econômico procedimento de desinfecção, lavagem e esterilização, tem permitido a reutilização de utensílios plásticos por mais de 30 vezes, sem deterioração significativa da qualidade da superfície para o crescimento celular. O procedimento vem sendo utilizado no laboratório de Virologia há três anos, com resultados excelentes, sem problemas de contaminação viral cruzada ou contaminação bacteriana e fúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CULKIN, K.A. & FUNG, D.I.C. Destruction of Escherichia coli and Salmonella typhimurium in microwave cooked soups. J. Milk Food Technol., 38: 8-15, 1975.
- SANBORN, M.R.; WAN, S.K. & BULARD, R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. Appl. Environ. Microbiol., 44(4): 960-4, 1982.