

# Controle, inativação e conservação de de microrganismos



*Microbiologia*

*Prof<sup>a</sup>. Larissa Picada Brum*

# Controle e inativação de microrganismos

- Se refere às diferentes formas de inativar “matar” ou remover os **microrganismos**, reduzir o número e inibir o crescimento.
- O método de escolha depende do tipo de material que contém o microrganismo.
- Este controle pode ser feito através de **métodos físicos** e **métodos químicos**.

Os microrganismos são considerados mortos quando perdem a sua capacidade de se multiplicar de forma irreversível.

Ou proibir a entrada!!!

# SEÑOR PASAJERO



La República Argentina  
es un país que cuida  
la sanidad de  
sus alimentos.

**Está prohibido ingresar  
productos o subproductos  
de origen animal  
y vegetal.**



Declare el contenido de  
su equipaje.

**Limpeza e desinfecção**



**Microrganismos patogênicos**

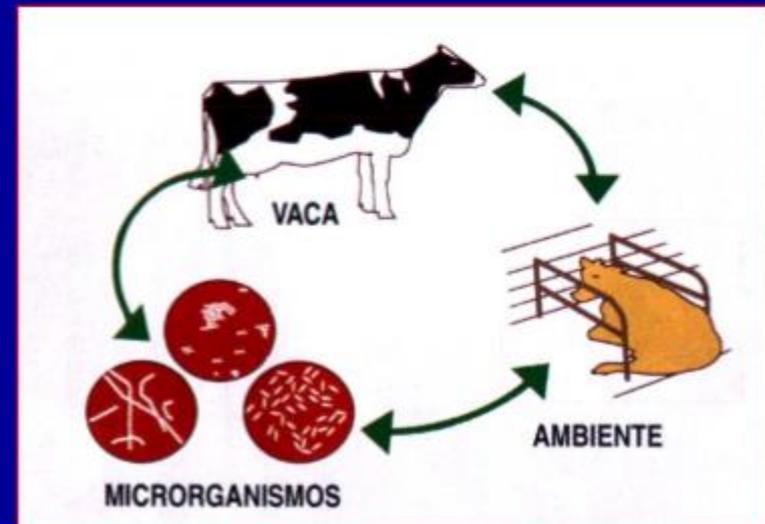


**Baixa concentração**



**Diminuição de doenças**

Deve ser abrangente e rotineiro

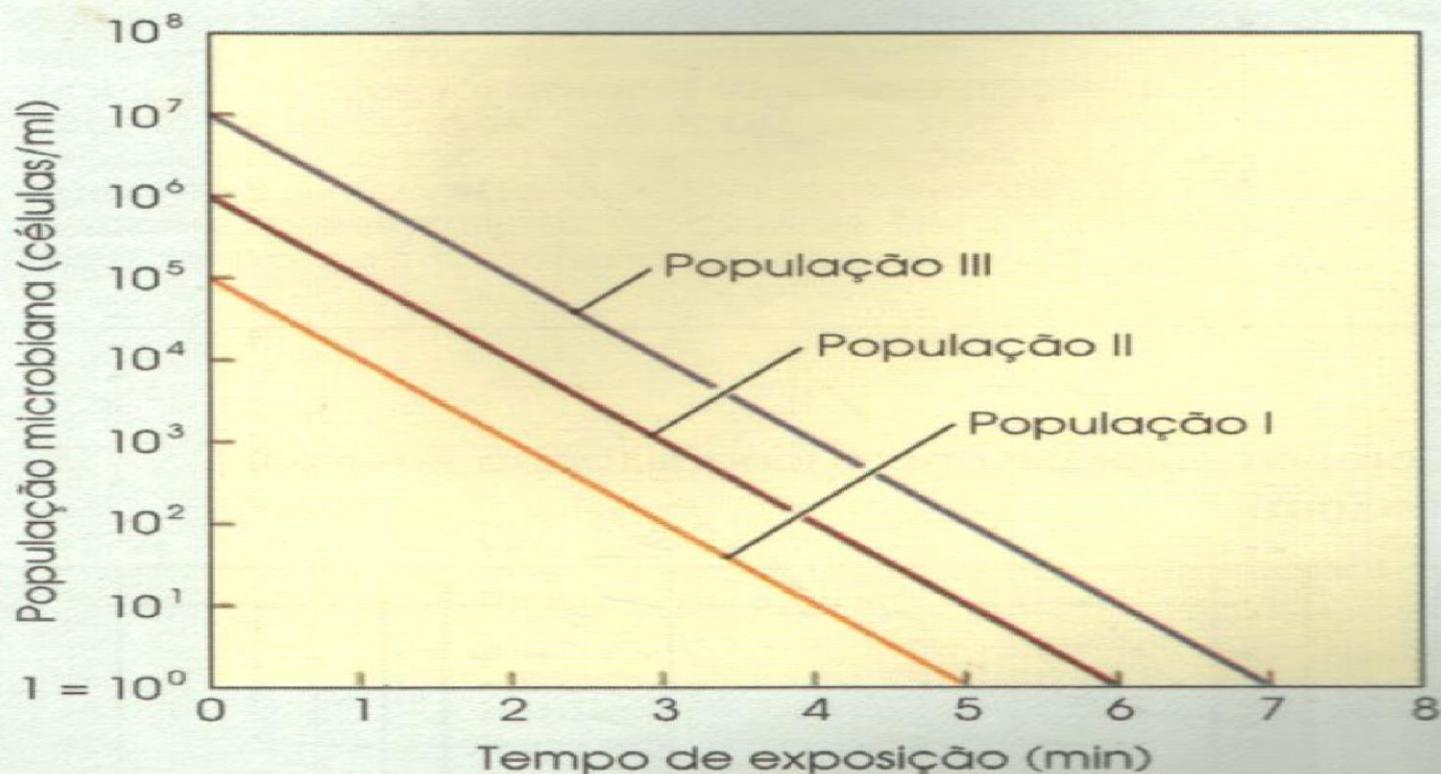


## Condições que Afetam a Atividade de um Agente aptogênico

- Tamanho da população susceptível
- Intensidade ou concentração do agente (bactéria, vírus, fungo, parasita também).
- Tempo de exposição ao agente
- Temperatura do ambiente, relação com a sobrevivência e multiplicação do agente.
- Natureza do meio onde o agente se encontra: **umidade, ph...**
- Tipo de microrganismo

## Tamanho população inicial de um agente irá influenciar sobre a efetividade de uma substância

**FIGURA 7.2** O gráfico mostra a taxa de morte de três populações diferentes de microrganismos expostos a um mesmo agente microbicida. A população I é a menor e é destruída em um período de tempo mais curto. As populações II e III requerem um período de tempo maior para serem destruídas porque as populações iniciais eram maiores.



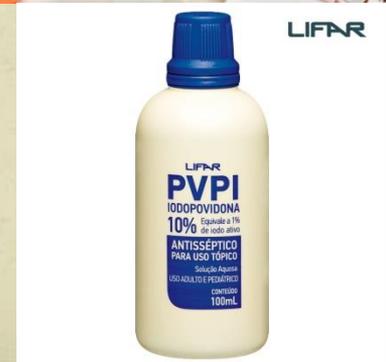
# Tipos de Agentes, métodos de inativação e controle e Mecanismos de ação

- Controle agentes por métodos Físicos
  - Esterilização pelo calor
  - Esterilização por radiação
  - Esterilização por filtração



# Controle Antimicrobiano por Agentes Químicos

- ✓ Agentes químicos de uso externo (tópico).
  - ✓ Agentes Antimicrobianos Utilizados *In vivo*
    - ✓ Fármacos antimicrobianos sintéticos
    - ✓ Antibióticos
    - ✓ Fármacos antifúngicos
    - ✓ Fármacos antivirais
    - ✓ Desinfetantes ou produtos químicos de limpeza e desinfecção



## Controle Antimicrobiano por Agentes Físicos

- Quando uma população microbiana é submetida ao calor, a redução do número de indivíduos viáveis ocorre de forma exponencial.
- Portanto, quanto mais tempo se passar exposto ao calor, menor a quantidade de microrganismos em determinado meio.

# Controle Antimicrobiano por Agentes Físicos

✓ **Calor**~ barato e fácil;  
~ Os microrganismos são considerados mortos quando perdem a sua capacidade de se multiplicar de forma irreversível.

A inativação é dependente da resistência, quantidade e estágios metabólicos do microrganismo.



- Desnaturação de proteínas;
- Fluidificação dos lipídeos;
- Os três parâmetros que podem expressar essas diferenças:  
temperatura, tempo e grau de  
resistência.

# Controle Antimicrobiano por Agentes Físicos

## ✓ Calor Úmido

\* desnaturação de proteínas e enzimas

- a) Água fervente (100 °C)
  - ~ células vegetativas x esporos; 15 a 30min.
  
- b) Sob pressão (autoclavagem) – 121 °C – 15min.
  - ~ rápido aquecimento
  - ~ grande penetração
  
- c) Pasteurização ~ 1860: Louis Pasteur
  - 62,8 a 65°C/30 min
  - ou 72 °C/15s
  - UHT (130-150°C/2 a 4 segundos)

# Calor úmido

- **a) Fervura**
  - Não é um método de esterilização, mas após cerca de 15 a 30 minutos de fervura pode inativar uma grande quantidade de microrganismos, mas não é eficaz contra endósporos bacterianos e alguns vírus.



## b) Autoclavação

- O mecanismo é a desnaturação de proteínas.
- Se os materiais a serem submetidos à autoclavação não forem deformados pelo calor ou umidade, este é o melhor método a ser empregado.
- A autoclave é um aparelho que trabalha com temperatura e pressão elevadas.
- Utiliza-se esse processo para esterilização de meios de cultura, soluções, utensílios e instrumentos.

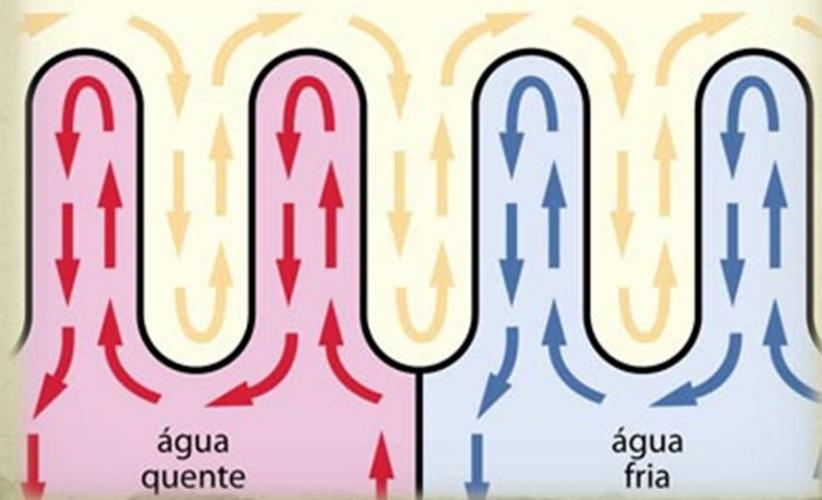


- **c) Pasteurização**

- O mecanismo de ação da pasteurização também é a desnaturação de proteínas.
- Este método foi desenvolvido por Louis Pasteur em 1846.
- Consiste em aquecer o produto em uma determinada temperatura, por um certo tempo e logo após, resfriá-lo.
- Este processo reduz o número de microrganismos, mas não assegura sua esterilização. Muito utilizado na esterilização de leite, creme de leite, cerveja etc...



4°C aquecimento → 72°C resfriamento → 4°C



# Controle Antimicrobiano por Agentes Físicos

## ■ Radiações

- ✓ Utilizam radiações, mas tem um custo elevado. Formam radicais superativos e destroem o DNA. Utilizado para esterilização de produtos cirúrgicos
  
- a) Ionizante: ionização das moléculas, alto poder de penetração.
  - ✓ raios gama
  - ✓ raios-X
  - ✓ feixes de elétrons
  
- b) Não-ionizantes: a mais empregada é a luz ultravioleta, que altera o DNA através da formação de dímeros. As lâmpadas germicidas são de baixo poder de penetração.

b) Não ionizante: luz ultravioleta, excita os elétrons produzindo vários tipos de reação:

- ✓ DNA (mais afetado) - dímeros de pirimidina
- ✓ possui baixo poder de penetração



J. Martinko

## Radiações – usos:

- ✓ Usados para esterilizar seringas plásticas, luvas, cateteres, fios de sutura.
- ✓ Dependem do comprimento de onda, da intensidade, da duração e da distância da fonte para esterilizar.
- ✓ MICROONDAS~ As radiações emitidas não afetam o microrganismo, mas geram calor, esterilizando meios de cultura e materiais.

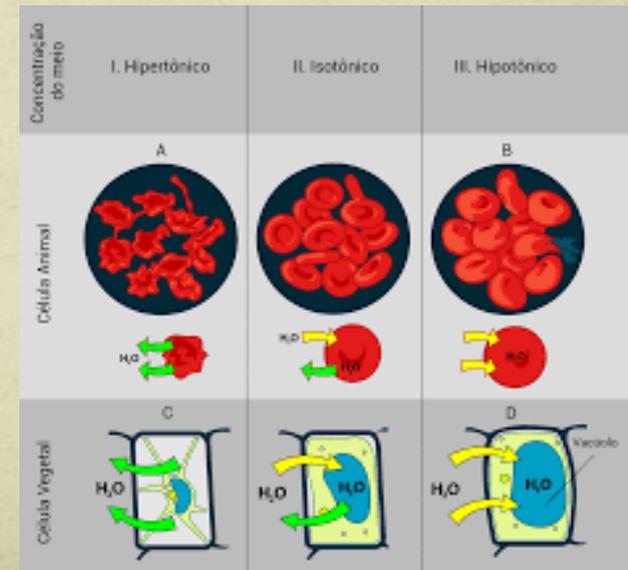
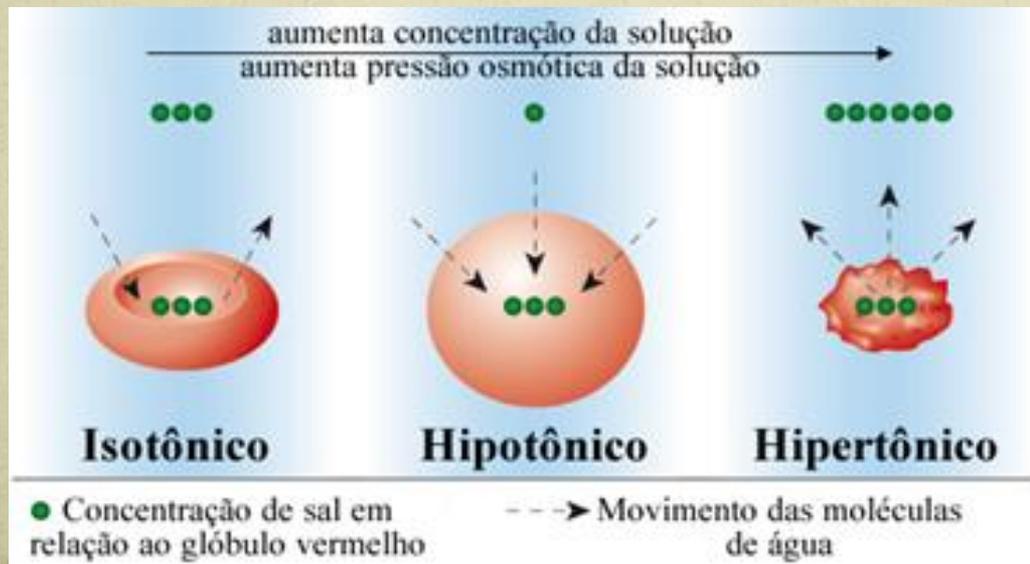
## Sensibilidade de Microrganismos à Radiação:

<b>Espécie ou função</b>	<b>Tipo de micro-organismos</b>	<b>D10* (Gy)</b>
<i>Clostridium botulinum</i>	Bacteria Gram-positiva, anaeróbia, esporulante	3.300
<i>Clostridium tetani</i>	Bacteria Gram-positiva, anaeróbia, esporulante	2.400
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteria Gram-positiva, aeróbia, esporulante	600
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Bacteria Gram-negativa	300
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacteria Gram-negativa	200
<i>Lactobacillus brevis</i>	Bacteria Gram-positiva	1.200
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Bacteria Gram-negativa, resistente à radiação	2.200
<i>Aspergillus niger</i>	Bolor	500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura	500
Febre aftosa	Vírus	13.000
Coxsackie	Vírus	4.500
Inativação enzimática		20.000-50.000
Desinfestação de insetos		1.000-5.000

\*D10 corresponde à quantidade de radiação necessária para reduzir em dez vezes (uma unidade logarítmica) a população inicial, ou nível de atividade. Gy = grays; 1 gray = 100 rads. A dose letal para humanos é de 10 Gy.

# Pressão Osmótica

- Quando em contato com meios hipertônicos (alta concentração de sais e açúcares) as células dos microrganismos perdem água por osmose, ficando murchas, impedindo assim o crescimento bacteriano. Método utilizado para conservar alimentos.



# Controle Antimicrobiano por Agentes Físicos

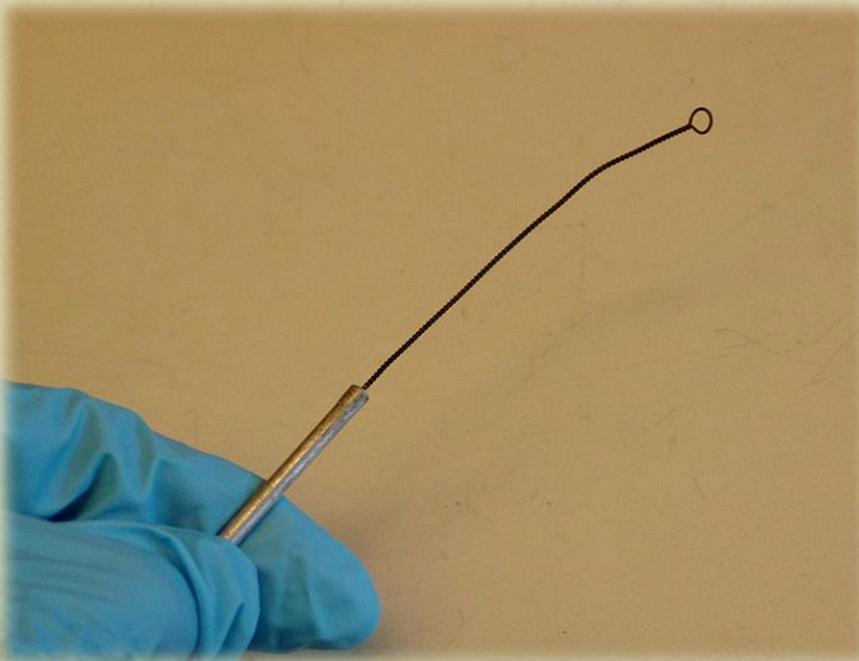
## ✓ Calor Seco

- Flambagem;
- Incineração: eliminação de contaminantes e cadáveres. Também é muito eficaz. Utilizado para incinerar diversos tipos de materiais, como papéis, materiais hospitalares, carcaças de animais, etc... Também oxida todo o material até virar cinzas
- Forno de Pasteur
  - \* 160 °C durante 2 h

# Calor Seco

## Flambagem

- É um método simples, porém muito eficaz. Consiste em colocar a alça de platina diretamente sobre o fogo, oxidando todo o material até virar cinzas.

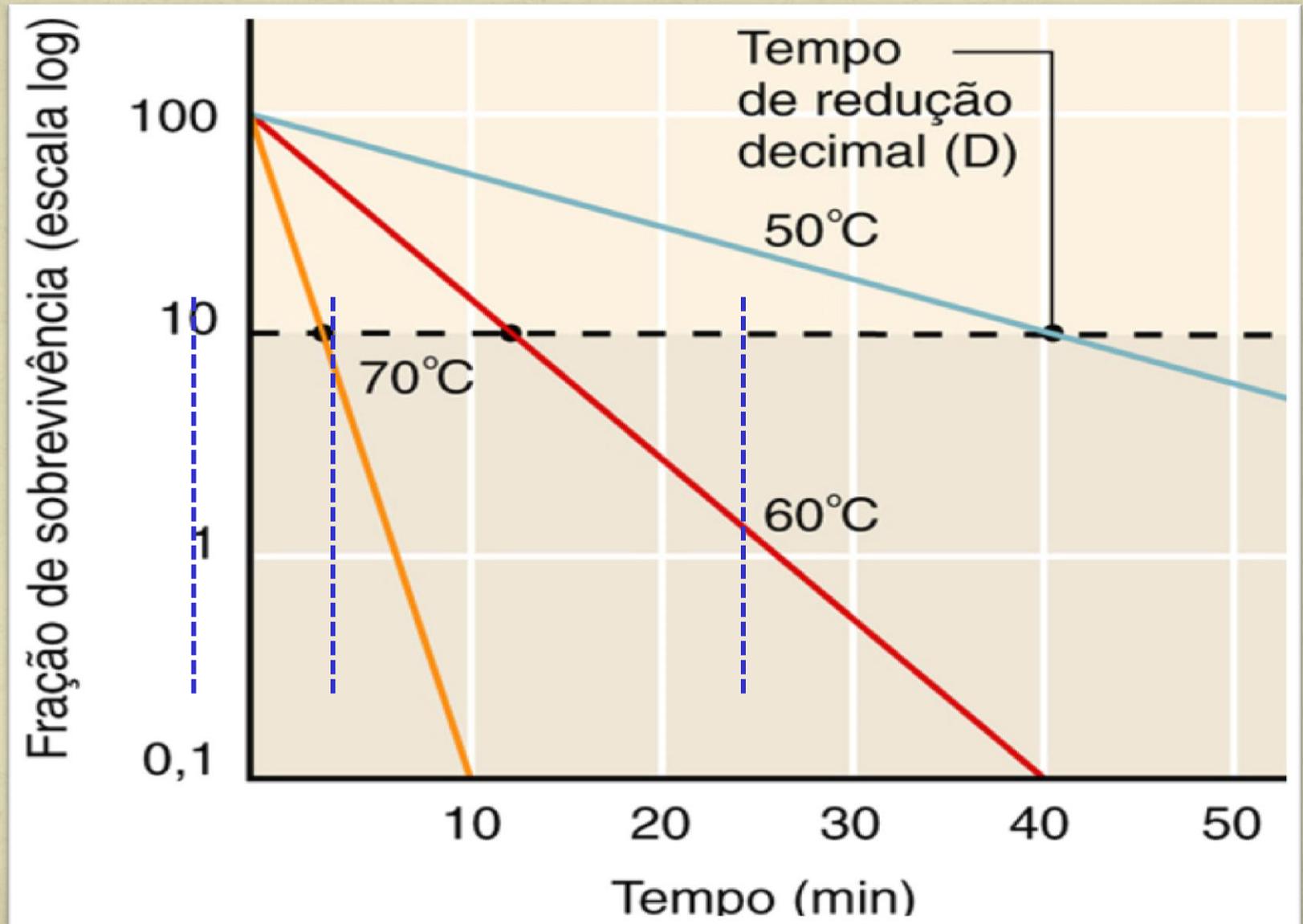


## Fornos

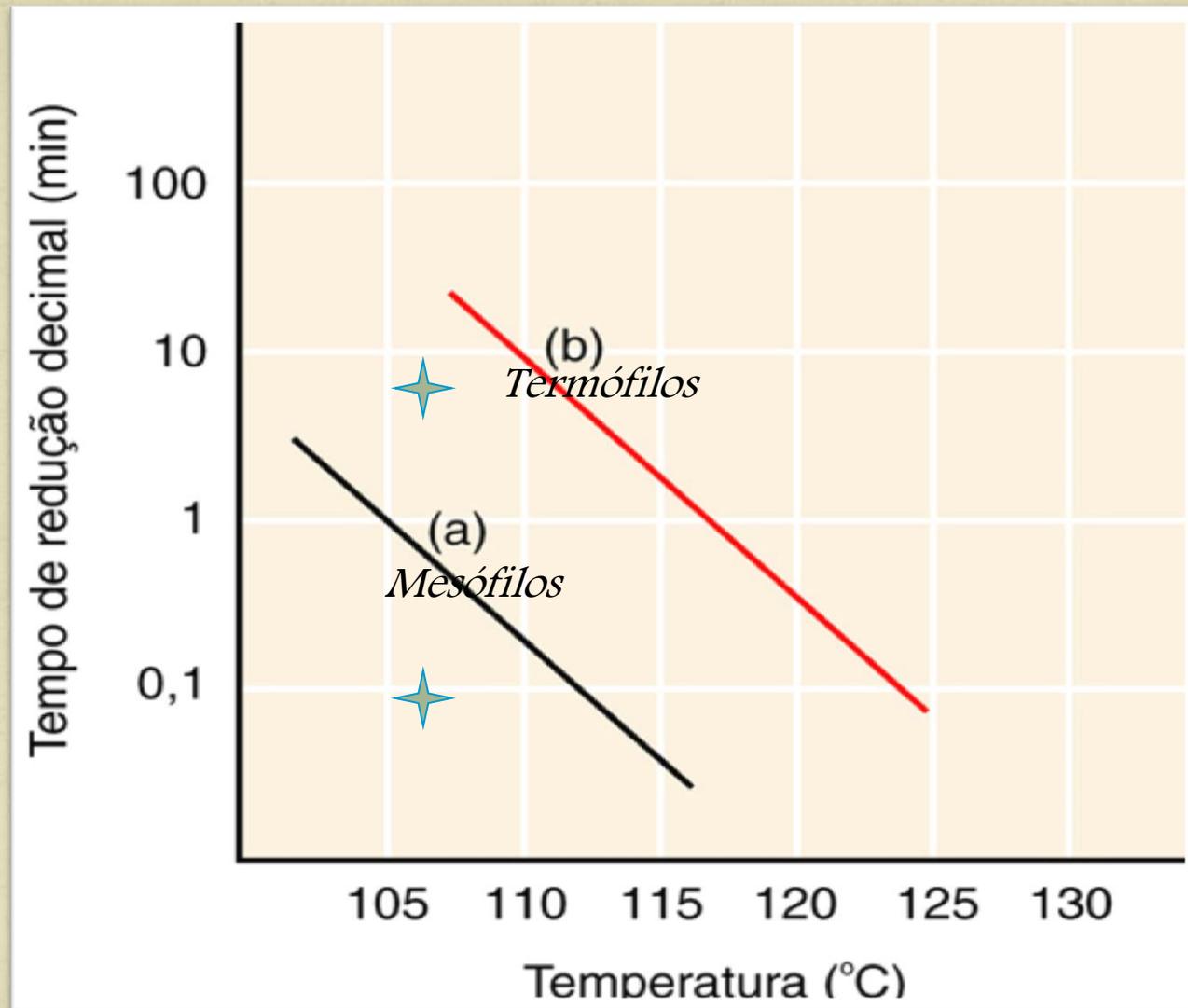
- Normalmente é utilizado para esterilizar vidrarias. Deve-se atentar bem à relação tempo x temperatura.



## Tempo de sobrevivência bacteriana ao calor



## Relação Entre Temperatura e Tempo de Morte em Mesófilos e Termófilos



## Tempo necessário para matar endósporos bacterianos pelo calor

Espécie	Calor úmido		Calor seco	
	Temp °C	Tempo (min)	Temp °C	Tempo (min)
<i>Bacillus anthracis</i>	100	8-15	140	>180
	105	5-10	160	9-90
			180	3
<i>Clostrid. botulinum</i>	100	300-530	120	50
	110	32-90	130	15-35
	115	10-40	140	5
<i>C. perfringens</i>	100	5-45	120	50
	105	5-27	130	15-35
	115	4	140	5
	120	1		
<i>C. tetani</i>	100	5-90	130	20-40
	105	5-25	140	5-15
			160	12

# Filtração

- Separação mecânica- a passagem de soluções ou gases através de filtros retém os microrganismos, então pode ser empregada na remoção de bactérias e fungos, entretanto, passarão a maioria dos vírus.



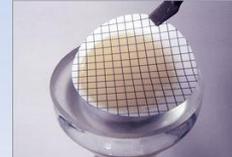
**Membrana Filtrante**



**Stericup**  
Unidade filtrante STERICUP com membrana express 0,22mm e PVDF 0,45 um, funil e frasco coletor.



Sterifil aseptic  
Suporte de filtração a vácuo  
Sterifil em polissulfona, composto de funil, base e copo coletor.



Transferir a membrana para placa de Petri e incubar

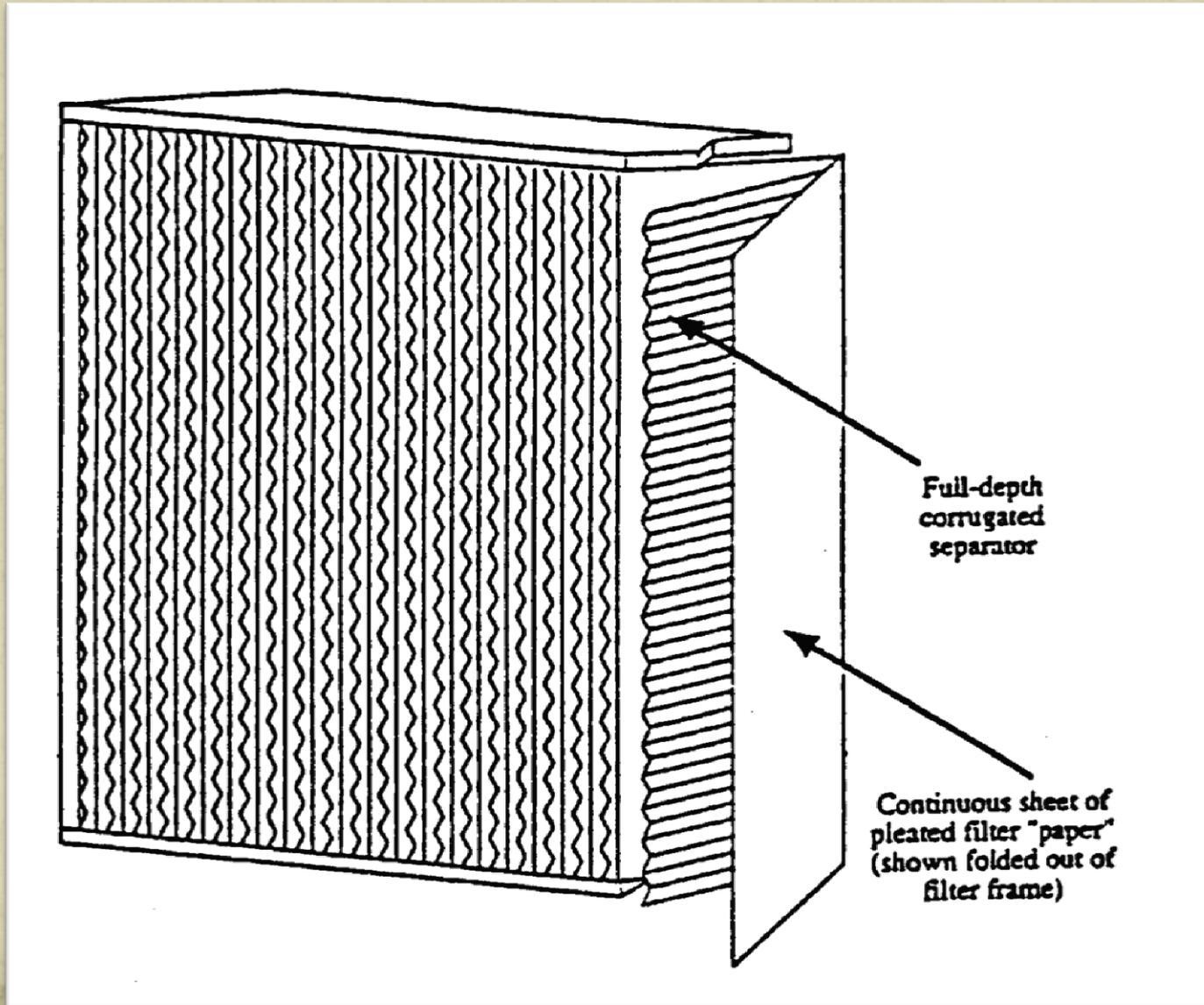
# Controle Antimicrobiano por Agentes Físicos

## ■ Filtração

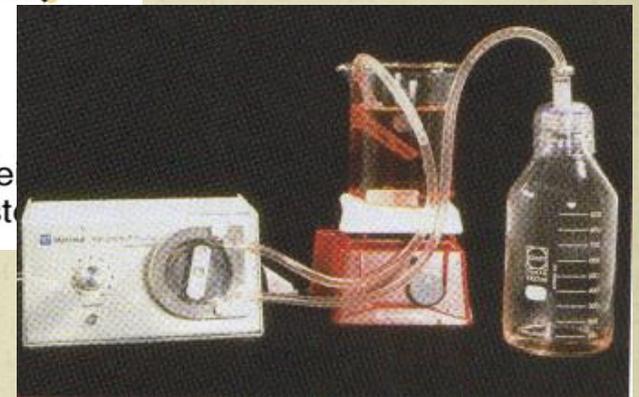
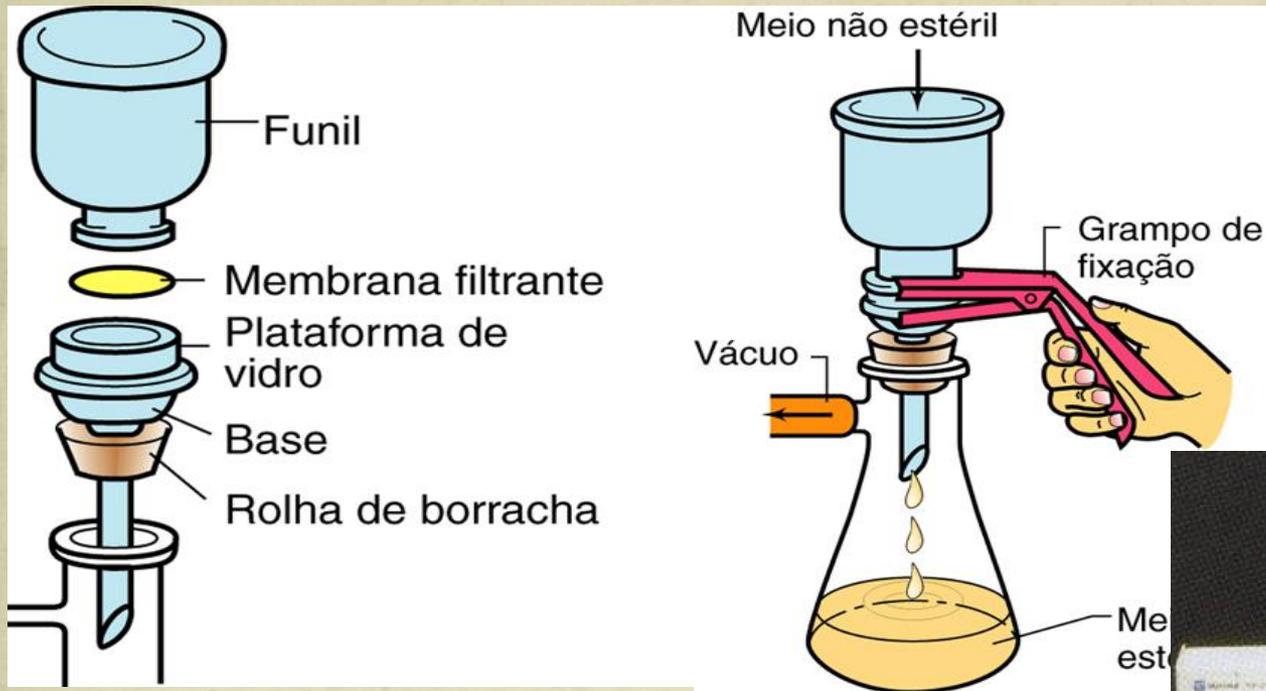
- ✓ Chamberland (1884): primeiro filtro bacteriológico de porcelana para água
- ✓ Modernos: membranas de ésteres de celulose
  - ~ poros uniformes
  - ~ diâmetro variável
  - ~ descartáveis

\* ex. filtros HEPA (*high efficiency particulate air*): acetato de celulose dobrado ao redor de folhas de alumínio ~ retém 99% da matéria particulada

## Filtros HEPA Utilizados em Câmaras de Fluxo Laminar

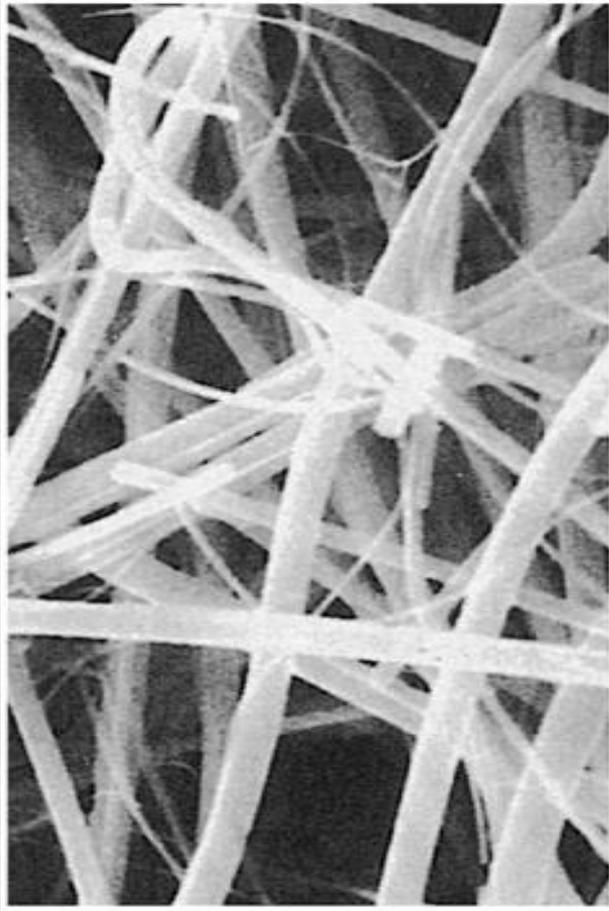


# Unidades de Membranas Filtrantes Descartáveis

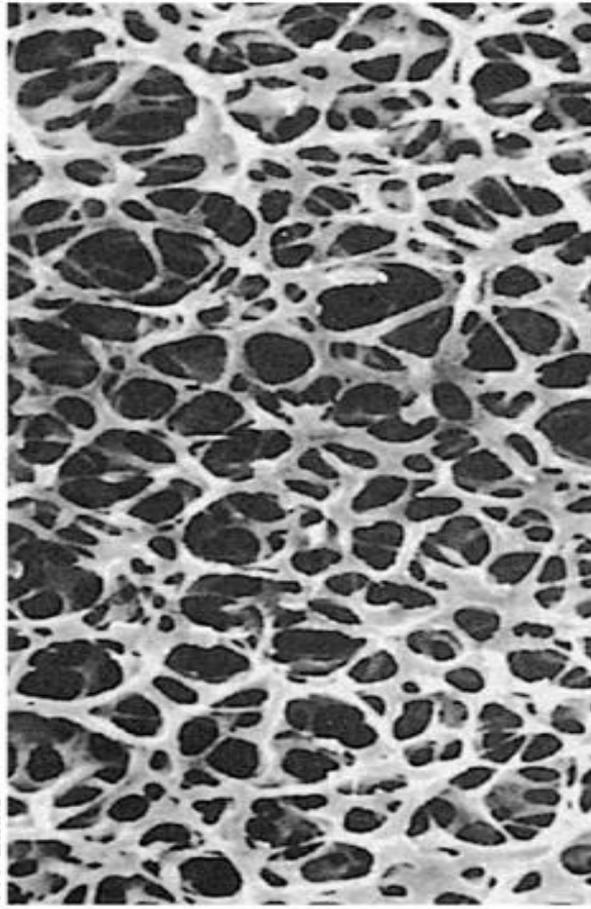


✓ Muito utilizados na preparação de meios de cultura para cultivo celular, produção de soros hiperimune, entre outros.

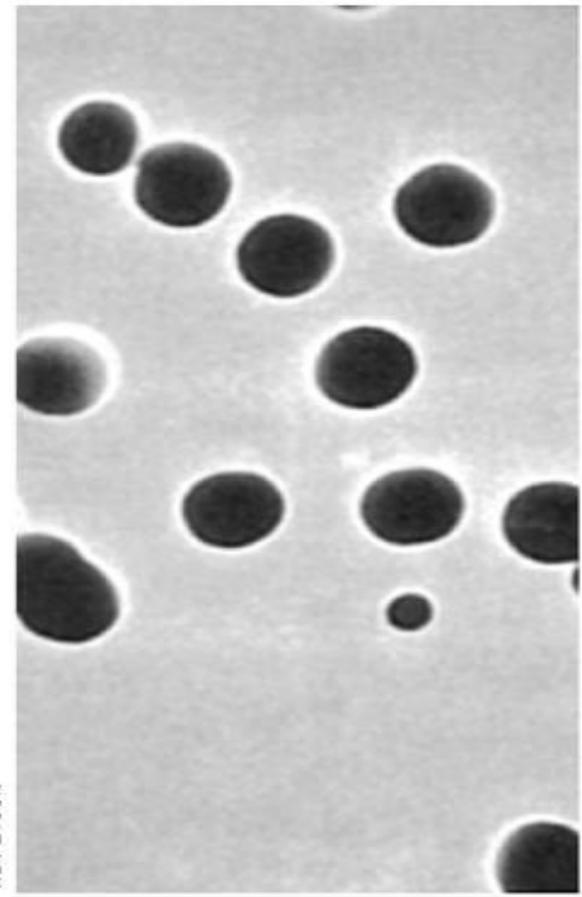
# Filtros Microbiológicos



Filtro de profundidade  
(Fibras de papel ou de  
borossilicato)



Membrana Filtrante  
(Acetato de celulose,  
nitrocelulose ou  
polissulfona)



Filtro Nucleoporo  
(Filmes de policarbonato)

# Controle Antimicrobiano por Agentes Químicos

- Características de um bom agente de controle químico:
  - Alta toxicidade para os microrganismos;
  - Solúvel em água;
  - Estabilidade química elevada;
  - Inócuo para o homem, plantas e animais
  - Capacidade de penetração na matéria orgânica;
  - Toxicidade para os microrganismos em temperatura ambiente;
  - Não ser corrosivo, nem manchar;
  - Desodorante e detergente.

# Controle Antimicrobiano por Agentes Químicos: exemplos de algumas moléculas

## ▪ Esterilizantes

### a) Óxido de etileno

- ✓ ativo contra células vegetativas e endósporos;
- ✓ alta penetração, mas necessita longa exposição;
- ✓ líquido abaixo de 10,8°C, acima disso é um gás;

### b) Alquilantes (alquilação de proteínas)

- ✓  $\beta$ -propionolactona
- ✓ Glutaraldeído
- ✓ Formaldeído (formol)

# Controle Antimicrobiano por Agentes Químicos

## ▪ Desinfetantes

a) **Fenóis (ácido)**: primeiro agente químico usado para o controle microbiano.

- ✓ efetivo agente antisséptico em hospitais.
- ✓ solução a 5% mata células vegetativas, mas não os endósporos.

b) **Alcoóis**

- ✓ Etílico a 60-85%: mata células vegetativas.
- ✓ Metanol: mais eficiente porém muito tóxico.
  - ✓ Desnaturação de proteínas.
  - ✓ Dissolvem os lipídeos da membrana

# Controle Antimicrobiano por Agentes Químicos

c) **Halogênios:** iodo, cloro, bromo

✓ Iodo e compostos relacionados: agente oxidante, combina-se com a tirosina, inativando proteínas.

✓ Cloro: formação de ácido hipocloroso liberando radicais de oxigênio.

d) **Metais pesados:** chumbo, zinco, prata, cobre, mercúrio

✓ combinam-se com proteínas, provocando sua inativação ex: timerosal= mercúrio

e) **Detergentes**- desnaturação das membranas

✓ Aniônico (sabão)

✓ Catiônicos: (Cloroeto de amônio)



# Agentes de superfície

## Compostos quaternários de amônio

- **Mecanismo de ação:** alteram a permeabilidade da membrana, inibem enzimas, desnaturação de proteínas;
  - Ativas contra G<sup>+</sup> e pouco menos ativas contra G<sup>-</sup>.
- **EXEMPLOS:**
  - Cloreto de benzalcônio
  - Cloreto de cetilpiridínio → Cepacol
  - Clorexidina

# Quadro 1. PROPRIEDADES DOS DESINFETANTES

DESINFETANTE							
Propriedades	Glutaraldeído	Clorexidina	Cloro	Iodo	Fenol	Amônia quaternária	Formol
Bactericida	+	+	+	+	+	+	+
Fungicida	+	-	-	+	+	±	+
Viricida	+	+	±	+	+	±	+
Toxicidade	+	-	+	-	+	-	+
Faixa de pH efetivo	Alcalino	Alcalino	Ácido	Ácido	Neutro	Alcalino	Alcalino
Ação na presença de matéria orgânica	++++	+	+	+++	++++	++	++++

**+** : Atividade do desinfetante

**-** : Ausência de atividade

**±** : Atividade limitada a condições especiais.

Fonte: Código Zoosanitário Internacional – O.I.E. - 1986.

# Indicadores Biológicos para teste de controle e estrelização

- Usado para suspensões-padrão de esporos bacterianos que são submetidos à esterilização juntamente com os materiais a serem esterilizados.
- Após o processo, os indicadores são colocados em meios de cultura adequados. Se não houver crescimento, é porque o processo de esterilização foi eficiente.



# Preservação de microrganismos

## Múmia do Homem de Gelo revela novos dados sobre bactérias estomacais

BOLZANO, Itália - O cadáver mumificado de 5.300 anos de idade, conhecido como Ötzi ou Homem de Gelo, está proporcionando aos cientistas novas pistas sobre as infecções estomacais.

Os cientistas do Instituto das Múmias e do Homem do Gelo, localizado no norte da Itália, extraíram a bactéria *Helicobacter pylori* das entranhas da múmia e realizaram uma análise de seu DNA. Ela revelou que as bactérias encontradas no Homem do Gelo pertenciam a uma cepa nunca vista nos seres humanos de hoje.

“Ele [o Homem do Gelo] era portador de uma cepa mais pura, uma cepa não híbrida; podemos dizer também que a história da genética das populações com *Helicobacter* na Europa é bem diferente do que se pensava anteriormente”, disse Albert Zink, presidente do EURAC.

Os cientistas esperam realizar estudos posteriores para obter mais informações sobre a evolução e o surgimento das bactérias.



A múmia do Homem do Gelo encontrada perfeitamente preservada em uma geleira do Tirol, vista na (Eurac) Academia Europeia de Bolzano, norte da Itália. Foto de 04 de dezembro de 2015, REUTERS / Südtiroler Archäologiemuseum /

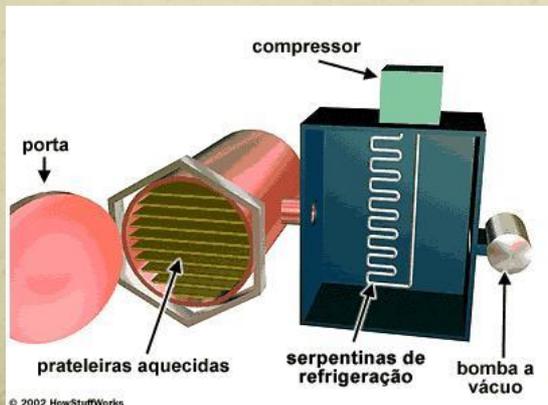
## Baixas Temperaturas, usadas em geral para preservação de microrganismos

- Não têm efeito esterilizante, apenas interrompem o crescimento bacteriano, preservando os microrganismos.
- Preservação de alimentos, drogas;
- Inibição das reações metabólicas;
- Formação de cristais de gelo (congelamento);
- Redução da água disponível.



# Liofilização usadas em geral para preservação de microrganismos

- Este é um método para preservação de microrganismos.
- Sabe-se que na ausência de água alguns microrganismos têm o seu metabolismo reduzido e até ausente, porém permanecem viáveis.
- Através da liofilização a água é removida do interior das células e os microrganismos são preservados em condições especiais de armazenamento e temperatura.



# Agentes Antimicrobianos Utilizados *In vivo*



## Agentes Antimicrobianos Utilizados *In vivo*

- ~ A maioria dos agentes físicos é muito drástica e a maioria dos agentes químicos é muito tóxica para uso interno em humanos.
- ~ Mesmo antissépticos moderados podem ser aplicados somente sobre a pele.
- ~ Diferentes tipos de fármacos antimicrobianos são produzidos continuamente pela indústria farmacêutica.
- ~ Os fármacos antimicrobianos são classificados de acordo com sua estrutura molecular, seu mecanismo de ação e seu espectro de atividade antimicrobiana.
- ~ Categorias de fármacos antimicrobianos: *Agentes Sintéticos ou Quimioterápicos, Antibióticos naturais ou semi-sintéticos.*

Podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação, estrutura ou molécula química (origem). No entanto, existem outras classificações como pelo espectro de ação.



# Mecanismos de ação

Bactericida

Bacteriostático

- 
- concentração da droga
  - sensibilidade do germe

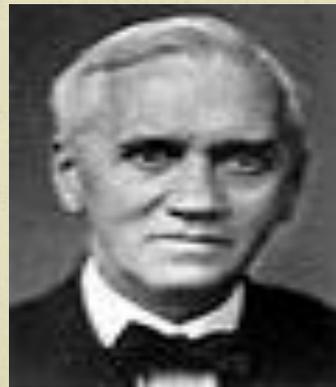
# Agentes Antimicrobianos Utilizados *In vivo*

## ▪ Antibióticos

**Definição:** Agentes antimicrobianos produzidos por microrganismos (bactérias e fungos) exibindo função de inibir ou matar outros microrganismos

“Descoberta da Penicilina (1928) e seus efeitos curativos em várias doenças infecciosas“

Antibióticos comercial em 1941.



*Alexander Fleming*

## Ex: Alguns Agentes Antimicrobianos

- ✓ **Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos:** derivados de aminoácidos, possuem anel betalactâmico.
  - 50% dos antibióticos produzidos mundialmente;
  - Produtores: *Penicillium chrysogenum*: penicilina  
*Acremonium* spp.: cefalosporina;
- Inibem a síntese de peptidoglicano (transpeptidação)
- Provocam a liberação de autolisinas: digestão da parede já existente;
- Espectro: ativos contra bactérias Gram positivas;
- Principais representantes: penicilinas e cefalosporina
- Aparecimento de resistência: produção de  $\beta$ -lactamases.
- Outros vancomicina e cloranfenicol

# Principais Agentes Antimicrobianos

## ✓ Antibióticos Aminoglicosídeos: derivados de açúcar.

- Aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas;
- Principal representante: Estreptomicina (produzida por *Streptomyces griseus*);
- Ação: inibição da síntese de proteínas (ligação com a subunidade 30S);
- Espectro: ativos contra G<sup>-</sup> e G<sup>+</sup>, usados clinicamente contra Gram negativos;
- Rápido aparecimento de cepas resistentes;
- Apenas 3% do total de antibióticos produzidos;
- Outros: gentamicina, ampicacina, neomicina, paromomicina;

## ✓ Antibióticos Macrolídeos: derivado de açúcares.

- Grande anel lactona conectado com açúcares;
- Principal representante: Eritromicina (produzida por *Streptomyces erythreus*);
- Ação: inibição da síntese de proteínas ~ combina-se com a subunidade 50S ribossomal;
- Ativos contra bactérias Gram + e Gram -;
- Usado em substituição à penicilina para pacientes alérgicos;
- Outros: azalídeos: azitromicina; claritromicina; glicosídeos ácidos: novobiocina,

- **Outros:** Derivados de acetatos e propionatos;
- Polienicos: nistatina;
- Aromaticos:
  - Tetraciclinas
  - Glicilciclinas
  - Rifamicinas
  
- Esteróides: ácido fusídico;
- Derivados do griseano: griseofulvina;
- Existem muitos outros agentes bacterianos, contra diferentes gêneros e espécies de bactérias.
- **Sulfonamidas: possuem enxofre na sua formula quimica, atuam em nível de metabolismo. Várias utilizações (ação bacteriostática).**

# Mecanismos de Ação de Alguns dos Principais Agentes Antimicrobianos de Procariotos

## ✓ Principais alvos:

- ~ Parede celular
- ~ Membrana plasmática
- ~ Processos biossintéticos:  
*síntese de proteínas (ribossoma 30 s)*  
*síntese de ác. nucléicos*

**Síntese da parede celular**

- Ciclosserina
- Vancomicina
- Bacitracina
- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Monobactâmicos
- Carbapenemos

**DNA girase**

- Quinolonas
  - Ácido nalidíxico
  - Ciprofloxacina
  - Novobiocina

**Elongação do RNA**

Actinomicina

**RNA polimerase DNA**

- Rifampina
- Estreptovaricinas

**Síntese proteica (inibidores de 50S)**

- Eritromicina (macrolídeos)
- Cloranfenicol
- Clindamicina
- Lincomicina

**Síntese proteica (inibidores de 30S)**

- Tetraciclínas
- Espectinomicina
- Estreptomina
- Gentamicina
- Kanamicina
- Amicacina
- Nitrofuranos

**Síntese de lipídeos**

Plantesisimicina

**Síntese proteica (rRNA)**

- Mupirocina
- Puomicina

**Metabolismo de Ácido Fólico**

- Trimetoprim
- Sulfonamidas

THF



DHF



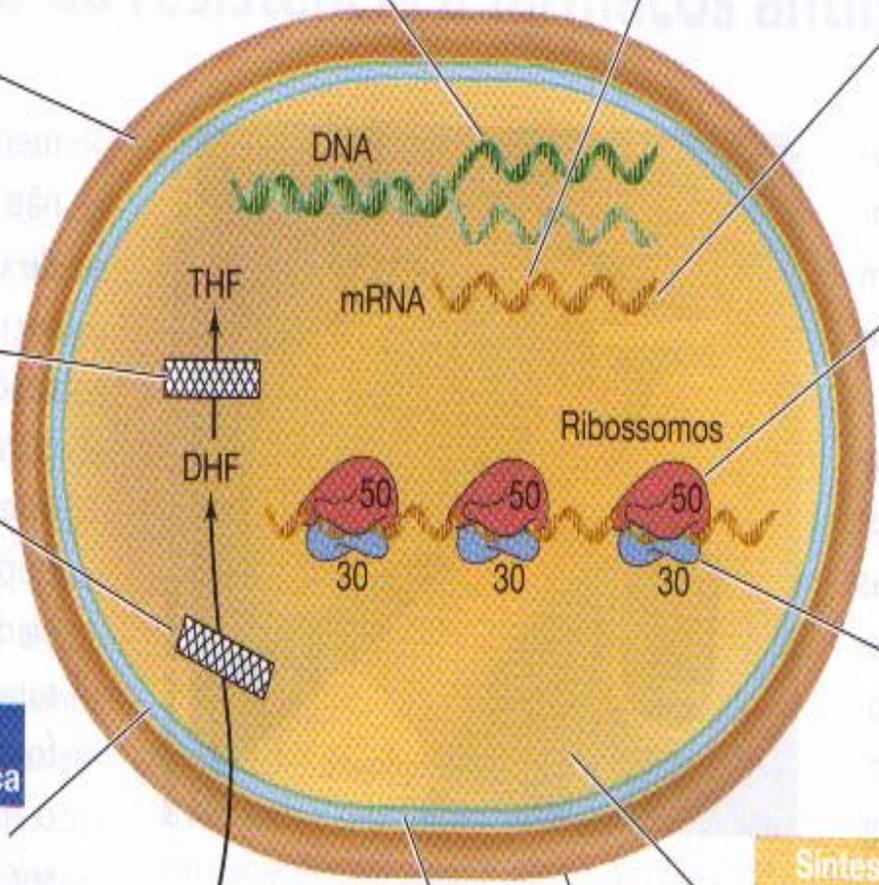
**Estrutura e função da membrana citoplasmática**

- Polimixinas
- Daptomicina

PABA

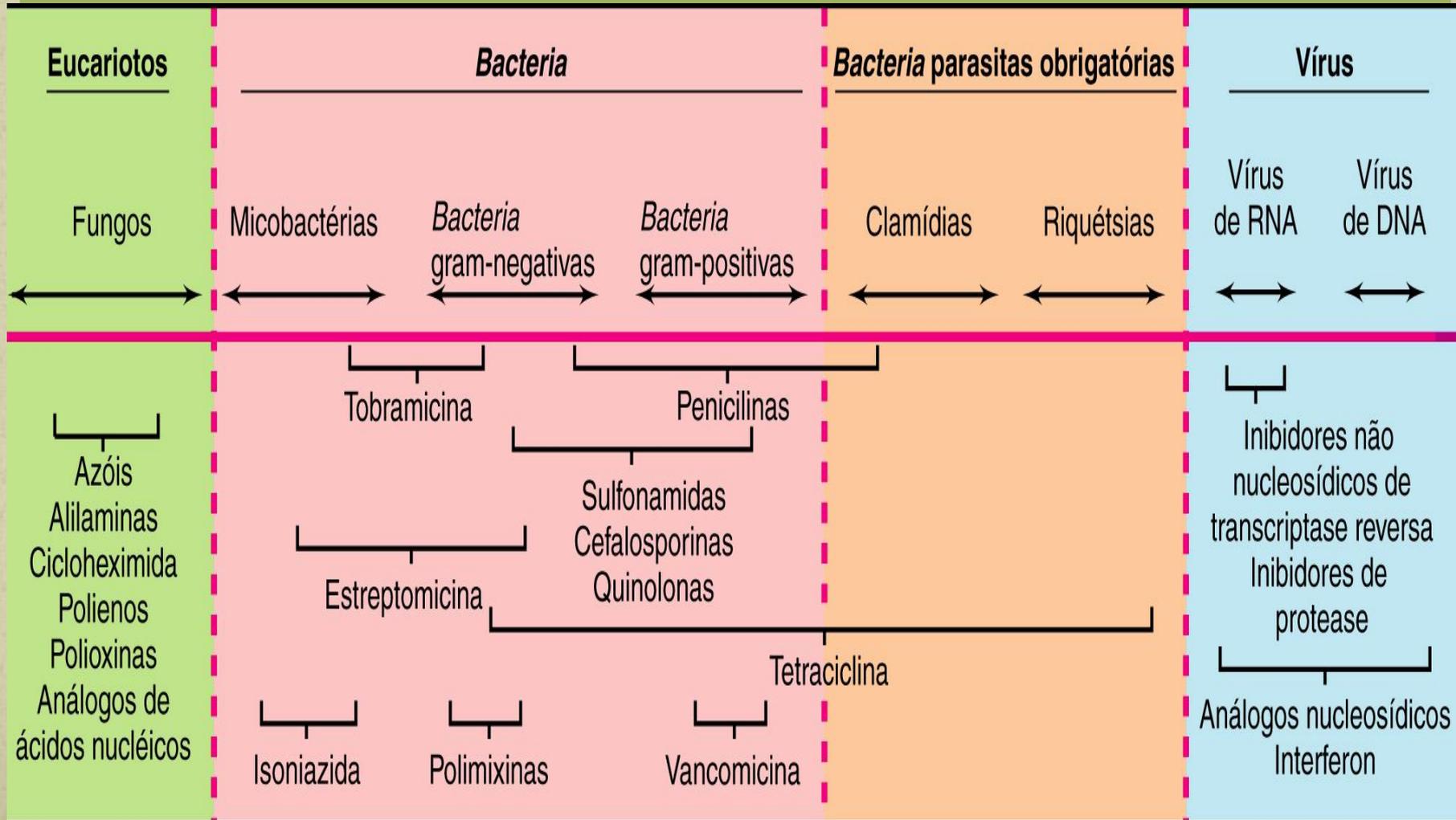
Membrana citoplasmática

Parede celular

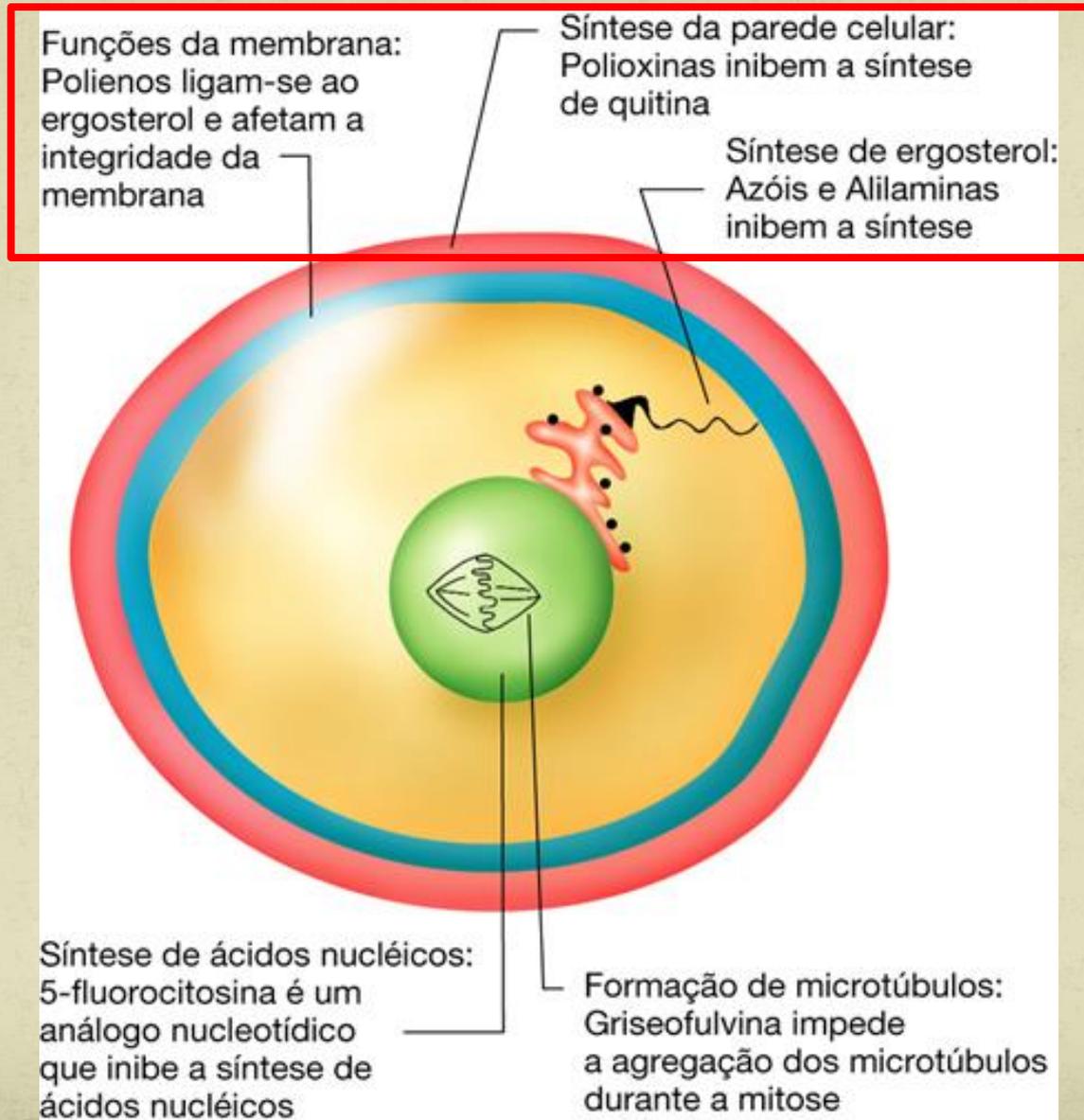


# Antibióticos

**Espectro de ação:** \* Largo espectro (ex: Tetraciclina)  
 \* Baixo espectro (ex: Vancomicina)



# Mecanismos de Ação de Agentes Quimioterápicos Antifúngicos



# Teste de Difusão em Discos ~ Antibiograma



Outra definição de controle biológico é, “Controle de um microrganismo por outro microrganismo”.

Por esses conceitos, o controle biológico inclui práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambas;

Melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de microrganismos; introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos.



Muito  
obrigada

