

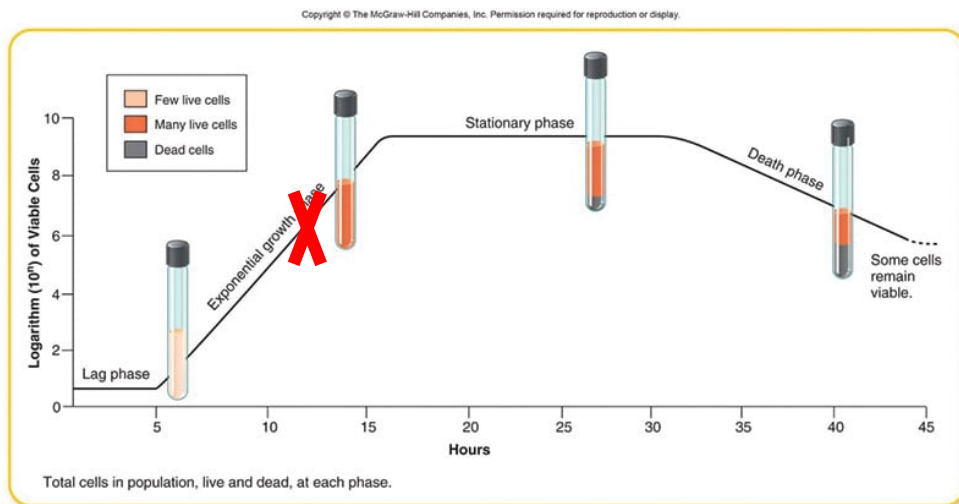
Microbiologia: da Teoria a prática

LOT2053

Profa. Tatiane da Franca Silva

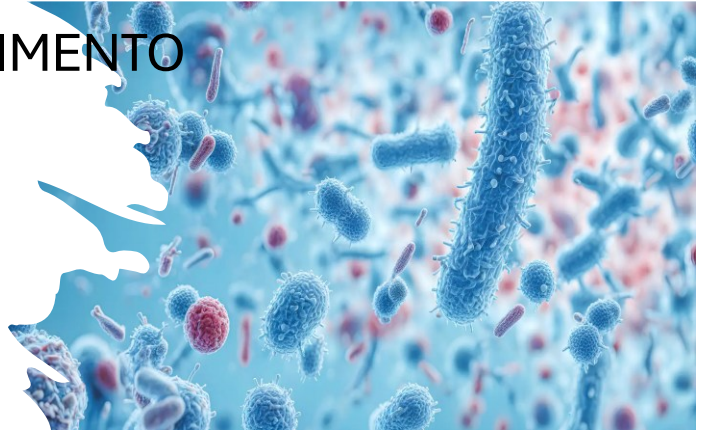
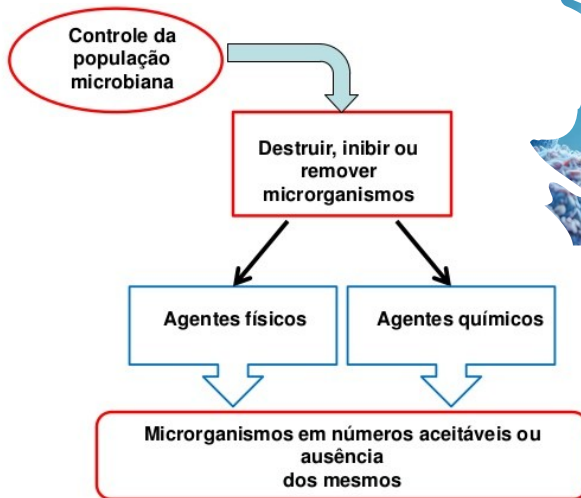
1

CURVA DE CRESCIMENTO FATORES INTRINSICOS X EXTRÍNSECOS



2

CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO



3

CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

MÉTODOS FÍSICOS

- ☐ Mais difundido é o uso do calor
- ☐ Fatores que influenciam :
temperatura, duração do tratamento térmico e o tipo de calor (úmido ou seco)

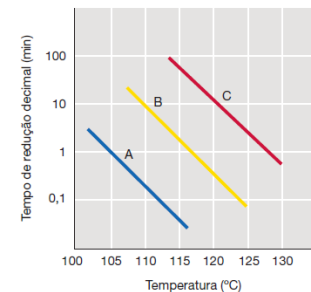
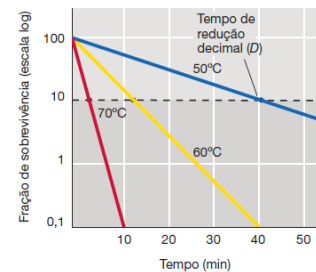


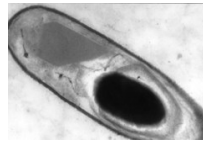
Figura 5.32 O efeito da temperatura na morte de microrganismos por calor: (a) O tempo de redução decimal (D) corresponde ao período de tempo em que apenas 10% da população original de um dado organismo (neste caso, um mesófilo) permanece viável, a uma determinada temperatura. A 70°C, D = 3 minutos; a 60°C, D = 12 minutos; a 50°C, D = 42 minutos. (b) Valores de D para um organismo-modelo das diferentes classes de temperatura: A, mesófilo; B, termófilo; C, hipertermófilo.

4

MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE: CALOR

☐ Autoclave

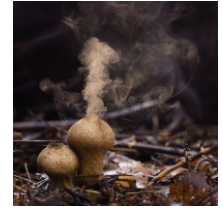
☐ 121°C por 15 minutos: eliminação de endosporos



Endósporo



Bacillus



Esporos de fungos

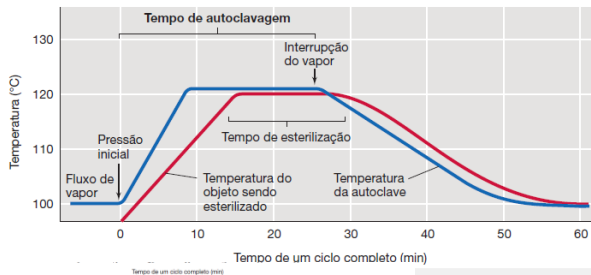


Figura 5.33 A autoclave e a esterilização pelo calor úmido. (a) O fluxo de vapor através de uma autoclave. (b) Um ciclo típico de autoclave. É apresentado o perfil temporal de aquecimento de um objeto relativamente volumoso. A temperatura do objeto aumenta e permanece mais lentamente do que a temperatura da autoclave. A temperatura do objeto deve atingir a temperatura alvo, sendo mantida por 10 a 15 minutos para garantir a esterilidade, independentemente da temperatura e do tempo registrados na autoclave. (c) Uma moderna autoclave de pesquisa. Observe a porta de tratamento por pressão e os controles de ciclo automáticos no painel à direita. Os queijos para a entrada de vapor e de exaustão localizam-se na lateral direita da autoclave.

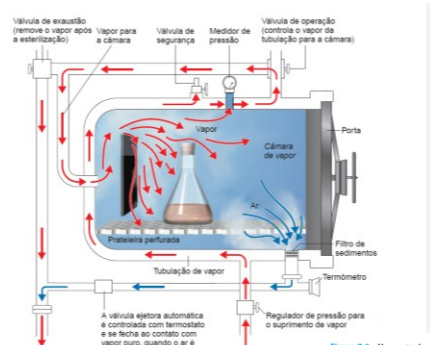


Figura 7.2 Uma autoclave. O vapor que entra ferve o ar para fora da porta inferior (seta azul). A válvula do ejetor automático permanece aberta enquanto uma mistura de ar e vapor está sendo pela tubulação de exaustão. Quando todo o ar tiver sido ejetado, a temperatura mais elevada do vapor puro é atingida, e a pressão na câmara aumenta.

6

MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE: CALOR SECO

☐ Oxidação dos constituintes orgânicos Menor eficiência que o calor úmido

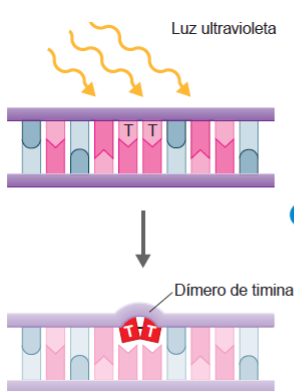
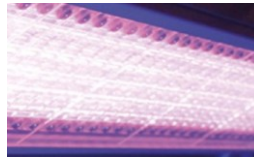
☐ Esterilização com calor quente: 170°C por cerca de duas horas.



8

MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE: RADIAÇÃO U.V

- ❑ Danos ao DNA
- ❑ Mutações: Dímero de timina



- 1 A exposição à luz ultravioleta leva as timinas adjacentes a fazerem ligações cruzadas, formando um dímero de timina e interrompendo o pareamento normal de bases.

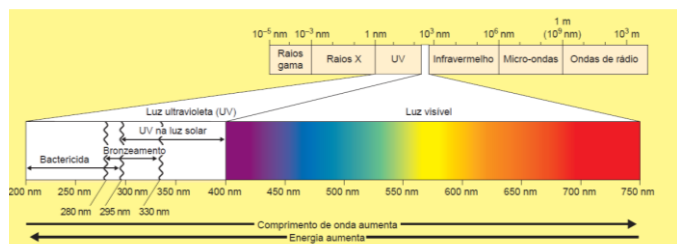


Fig. 7.5 O espectro de energia radiante. A luz visível e outras formas de energia radiante idem pelo espaço como ondas de vários comprimentos. A radiação ionizante, como os raios e X, possui um comprimento de onda mais curto que 1 nm. A radiação não ionizante, como a radiação (UV), possui um comprimento de onda entre 1 nm e cerca de 380 nm, onde o espectro

10

MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE: FILTRAÇÃO

- ❑ filtros de membrana: 0,22 a 0,45 μm (bactérias)
- ❑ filtros de HEPA (*high-efficiency particulate air*): 0,3 μm de diâmetro

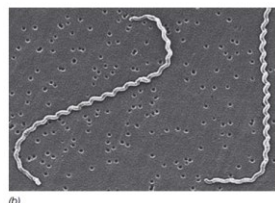
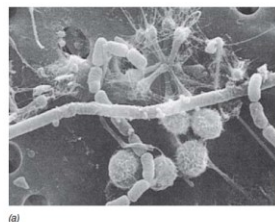


Figura 5.38 Micrografia eletrônica de varredura de bactérias retidas em membranas filtrantes nucleopóros. (a) Bactérias e algas aquáticas. O tamanho do poro é de 5 μm . (b) *Leptospira interrogans*. A bactéria tem diâmetro aproximado de 0,1 μm e até 20 μm de comprimento. O tamanho do poro é de 0,2 μm .



Figura 7.4 Esterilização com filtro, com uma unidade plástica descartável, pré-esterilizada. A amostra é colocada na câmara superior e forçada através do filtro de membrana pelo vácuo, para a câmara inferior. Os poros do filtro de membrana são menores que as bactérias, e assim, elas são retidas no filtro. A amostra esterilizada pode então ser decantada na câmara inferior. Um equipamento similar com discos de filtro removíveis é usado para cortar as bactérias em amostras (veja a Figura 6.18).

11



MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE: FRIO

- ☐ Congelamento profundo
- ☐ Diminuição das reações químicas
- ☐ Formação de cristais de gelo no citoplasma.

12

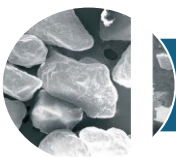
MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE: OUTROS MÉTODOS



Alta Pressão (*High-Pressure Processing* 100-800 MPa)



Dessecação: Interrupção do metabolismo

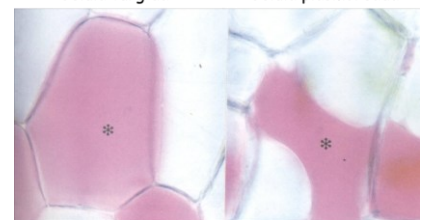


Pressão Osmótica: Plasmólise



Célula túrgida

Célula plasmolisada



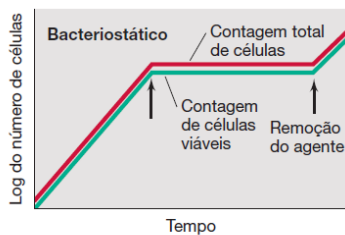
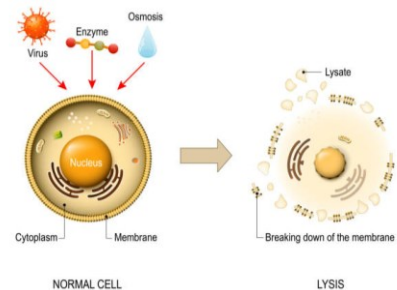
Appetzato-Guerreiro, 2003

13

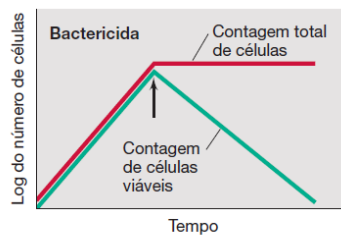
MÉTODOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO: QUÍMICOS

☐ Agentes Antimicrobianos

- ✓ Atuação “státicos” (crescimento). Ex: Bacteristático
- ✓ Atuação “cida” (morte). Ex Bactericida
- ✓ Atuação “lítica” (morte por lise). Ex: Bacteriolítico



(a)



(b)

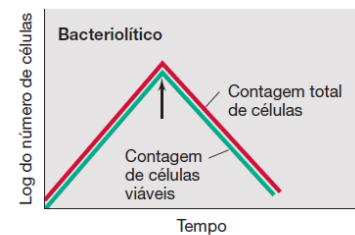


Figura 5.39 Diferentes agentes antimicrobianos. (a) Agentes bacteriostáticos inibem, mas não matam. (b) Agentes bactericidas matam. (c) Agentes bacteriolíticos lisam as células. Na altura indicada pela seta, uma concentração de inibição de crescimento de cada agente antimicrobiano foi adicionada a uma cultura em crescimento exponencial. A turbidez e as contagens de células viáveis mostradas são características de cada tipo de agente.

14

MÉTODOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO QUÍMICOS

☐ Desinfetante (uso externo): células vegetativas

- ✓ **Fenol e compostos fenólicos** : primeiro agente químico usado para o controle microbiano
- ✓ Lesões na membrana



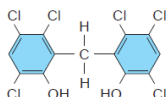
Joseph Lister (1865)



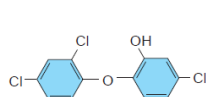
(a) Fenol



(b) O-fenilfenol



(c) Hexaclorofeno (um bifenol)



(d) Triclosano (um bifenol)

Figura 7.7 A estrutura dos fenólicos e dos bifenóis.



15

MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO

- ☐ Antissépticos : Atóxicos suficientes para uso
in vivo topico (Externo)

células vegetativas

✓ Álcool

desnaturação de proteínas, mas também pode romper membranas e dissolver muitos lipídeos.



Tabela 7.6 Ação biocida de concentrações variadas de etanol em solução aquosa contra *Streptococcus pyogenes*

Concentração de etanol (%)	Tempo de exposição (seg)				
	10	20	30	40	50
100	C	C	C	C	C
95	NC	NC	NC	NC	NC
90	NC	NC	NC	NC	NC
80	NC	NC	NC	NC	NC
70	NC	NC	NC	NC	NC
60	NC	NC	NC	NC	NC
50	C	C	NC	NC	NC
40	C	C	C	C	C

Nota: C = houve crescimento; NC = não houve crescimento.

18

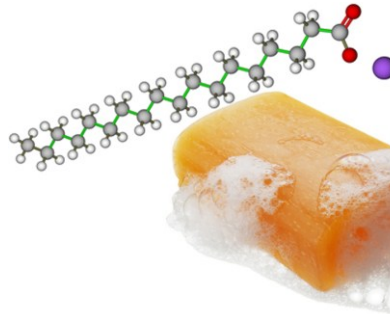
MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO

- ☐ Antissépticos

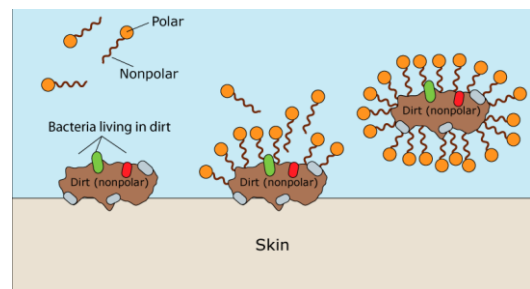
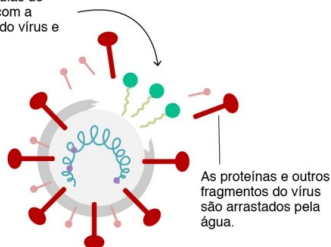
✓ Detergente

Poros nas membranas

Aniônicos: $[C_9H_{19}COO]^-Na^+$ (sabão)



A cauda das moléculas de sabão se conecta com a membrana lipídica do vírus e a rompe.



19

MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO

☐ Antisséptico

Peróxido de Hidrogênio: liberam radicais livres de hidroxila dentro da célula



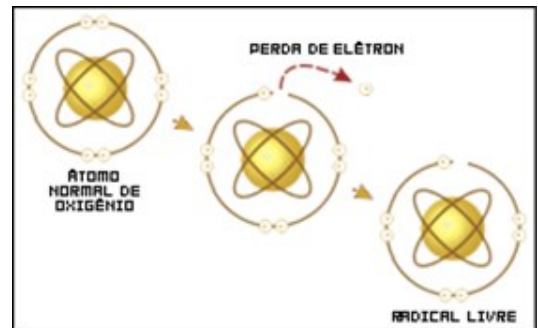
Radicais Livres

Alterações/ Lesões

Proteínas

Lipídios

DNA



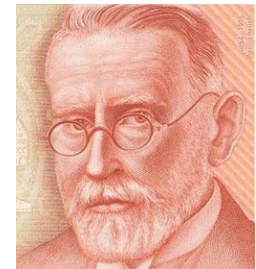
20

MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRSCIMENTO

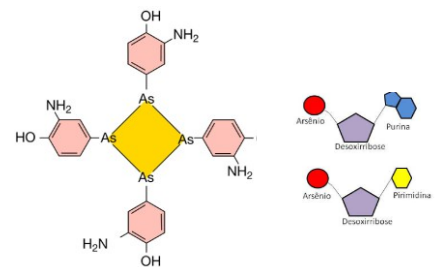
☐ Drogas Antimicrobianos – uso *in vivo* (Interno)

☐ Sintéticos:

Salvarsan – Composto com Arsênio. Utilizado no tratamento da Sífilis. Muito tóxico.



Paul Erlich - Prêmio Nobel 1908



22

MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO

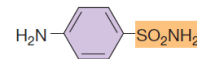
❑ Drogas Antimicrobianas – uso *in vivo* (Interno)

❑ Sintéticos

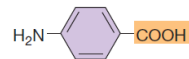
❑ Interfere nos metabolismo secundário

Sulfas –análogos de fatores de crescimento

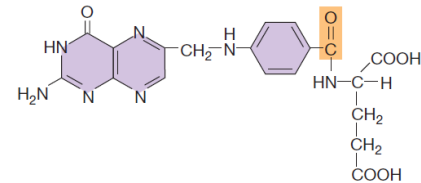
Vermelho de Prontosil 1932



(a) Sulfanilamida



(b) Ácido *p*-aminobenzoico



(c) Ácido fólico

Figura 27.23 Sulfas. (a) A sulfa mais simples, sulfanilamida. (b) A sulfanilamida é um análogo do ácido *p*-aminobenzoico, um precursor do (c) ácido fólico, um fator de crescimento.

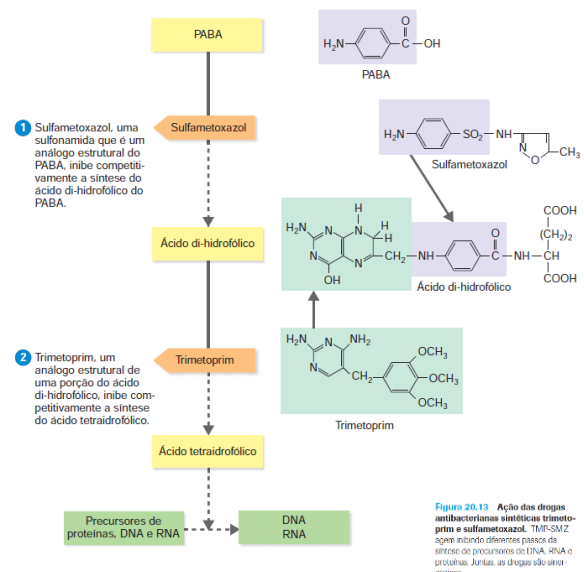
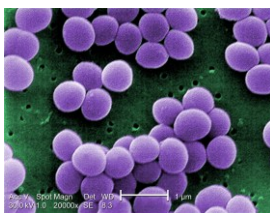
23

MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO

❑ Bloqueia a síntese de ácido fólico, inibindo a síntese de ácidos nucleicos

❑ Ex: trimetoprima comumente usado para *Staphylococcus aureus*

❑ Gram-positivas e negativas



24

MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO

- ❑ Drogas Antimicrobianas – uso *in vivo* (Interno)
- ❑ Antibióticos: produzidos por microrganismos
- ❑ Alexander Fleming (1929)
- ❑ Ganhadores do Premio Nobel em Fisiologia de Medicina 1945



Sir Alexander Fleming



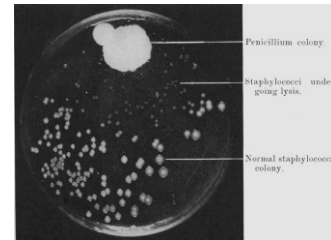
Ernst B. Chain



Sir Howard Florey

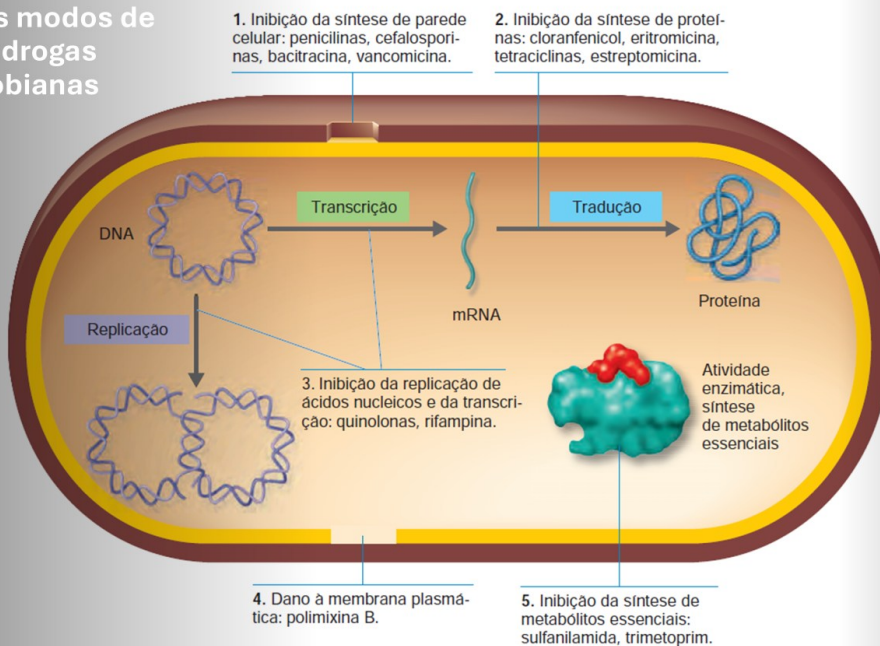


Figura 20.1 Observação laboratorial de antibióticos. Qualquer presença de plaques micro-organismos de antibióticos naturais, especialmente de solo, com frequência verá exemplos de inibição bacteriana por antibióticos produzidos por bactérias, principalmente espécies do gênero *Streptomyces*.



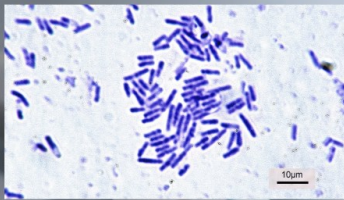
25

Principais modos de ação das drogas antimicrobianas

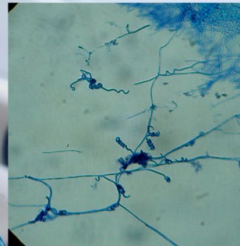


27

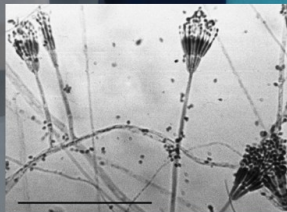
ANTIBIÓTICOS



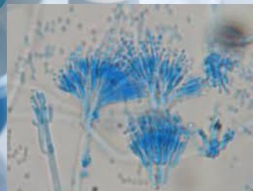
Bacillus



Streptomyces



Cephalosporium



Penicillium

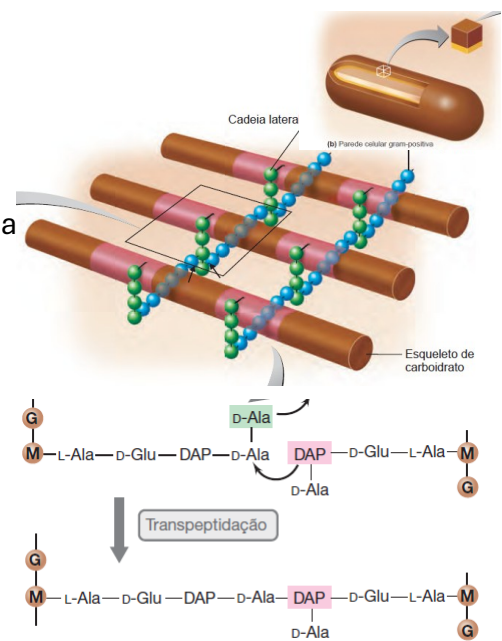
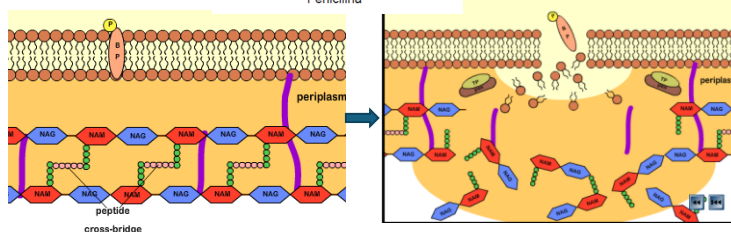
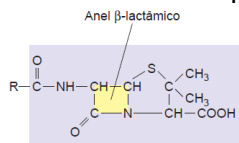
Mais da metade são produzidos por *Streptomyces*

Tabela 20.1 Fontes representativas de antibióticos	
Micro-organismo	Antibiótico
Bastonetes gram-positivos	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacitracina
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Polimixina
Actinomicetos	
<i>Streptomyces nodosus</i>	Anfotericina B
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Clorotetraciclina e tetraciclina
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Eritromicina
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomicina
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicina
Fungos	
<i>Cephalosporium</i> spp.	Cefalosporina
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griseofulvina
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina

29

ANTIBIÓTICOS

- ☐ β-lactâmicos
- ☐ inibidores da biossíntese de parede celular bacteriana
- ☐ Afeta a transpeptidação
- ☐ ativos contra bactérias Gram positivas



(h) **Figura 5.8** Síntese de peptidoglicano. (a) Transporte dos precursores de peptidoglicano através da membrana citoplasmática para o ponto de crescimento da parede celular. A autoflúorescência das ligações glicosídicas no peptidoglicano preexistente, enquanto a glicose se sintetiza, ligando o peptidoglicano ao anel do novo. (b) A reação de transpeptidação, que forma a ligação cruzada final entre duas cadeias de peptidoglicano. A penicilina inibe essa reação.

30

ANTIBIÓTICOS

β-lactâmicos

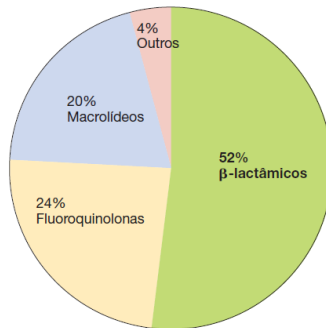


Figura 27.22 Produção anual mundial e uso de antibióticos. Estima-se que cerca de 10.000 toneladas métricas de agentes antimicrobianos são fabricadas anualmente em todo o mundo. Os antibióticos β-lactâmicos incluem as cefalosporinas (30%), as penicilinas (7%) e outros β-lactâmicos (15%). "Outros" incluem as tetraciclínas, os aminoglicosídeos e todos os outros fármacos antimicrobianos.

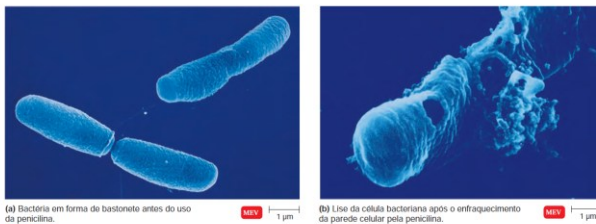
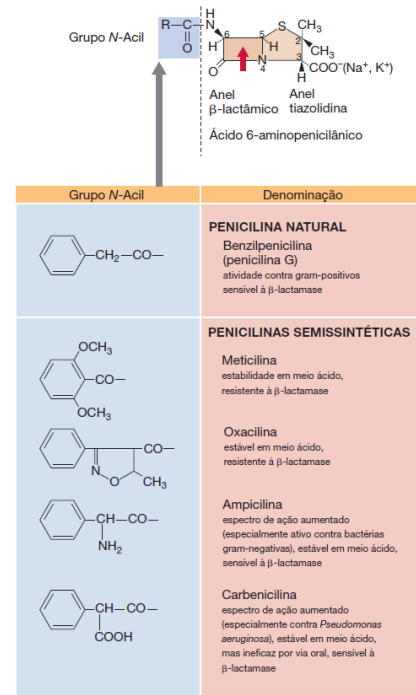


Figura 28.3 Inibição da síntese celular bacteriana pela penicilina.



31

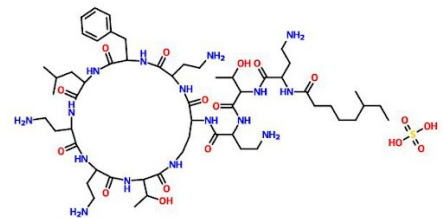
ANTIBIÓTICOS

Mudanças na permeabilidade da membrana plasmática

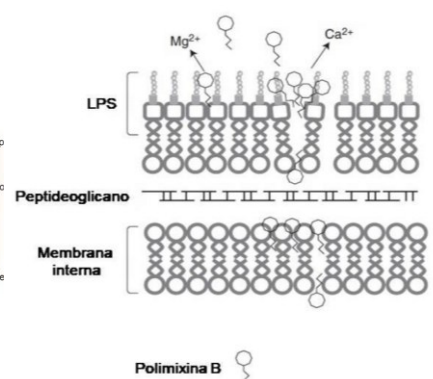
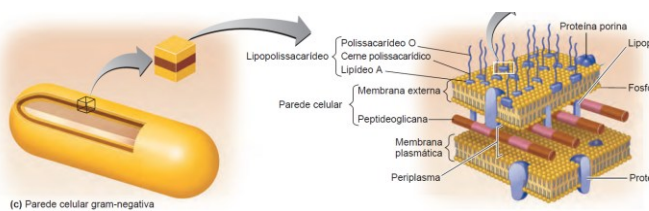
Ex: Polimixina B (bactericida): Interage com os LPS

(Lipopolissacarídeos)

Espectro bacterias Gram-negativas

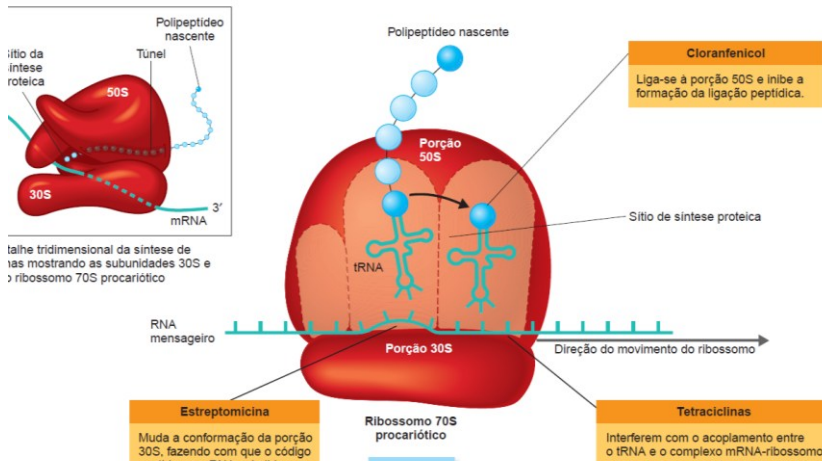


Polimixina B



32

ANTIBIÓTICOS



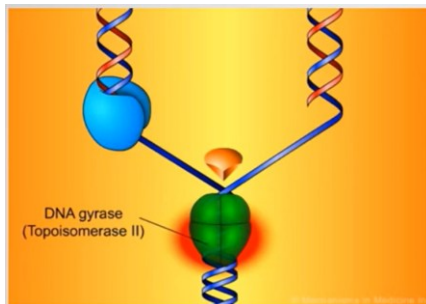
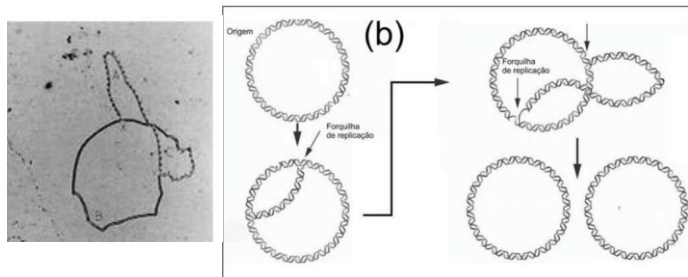
(b) Diagrama indicando os diferentes pontos onde o cloranfenicol, as tetraciclina e a estreptomicina exercem suas atividades

Figura 20.4. A inibição da síntese proteica por antibióticos. (a) O detalhe mostra como o ribossomo procarionótico 70S é montado a partir de duas subunidades, 30S e 50S. Percorrendo como a cadeia polipeptídica nascente atravessa um túnel na subunidade 50S do sítio de síntese de proteínas. (b) O diagrama mostra os diferentes pontos onde o cloranfenicol, as tetraciclina e a estreptomicina exercem suas atividades.

33

ANTIBIÓTICOS

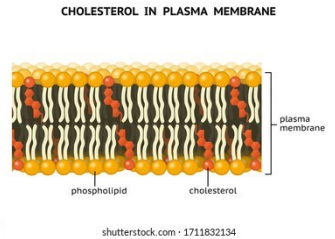
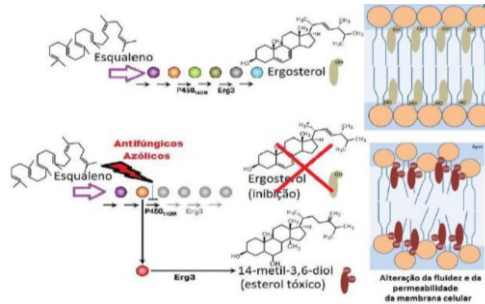
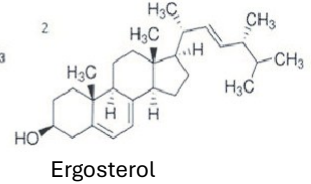
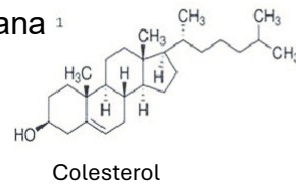
- ❑ Inibidores da síntese de ácidos nucleicos (DNA/RNA)
- ❑ Ex: **Quinolonas e fluoroquinolonas:**
Inibem a DNA girase



34

DROGAS ANTIFUNGICAS

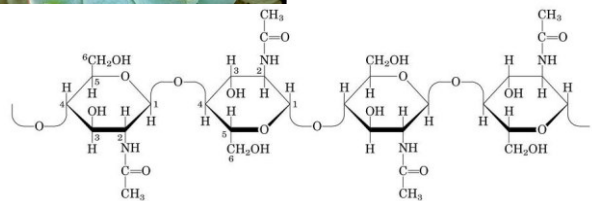
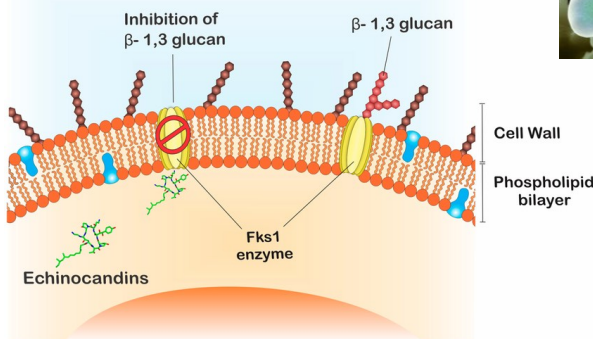
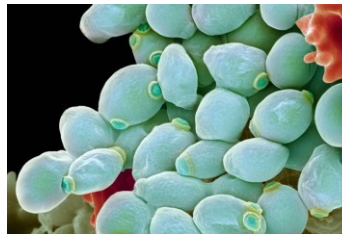
- ❑ Mudança na permeabilidade da membrana ¹ plasmática
- ❑ Inibe a síntese de Ergosterol
- ❑ Azóis e as Alilaminas



37

DROGAS ANTIFUNGICAS

- ❑ inibidoras de parede celular inibem a atividade da 1,3 b-D-glucano sintase
- ❑ Afetam a biossíntese de quitina
- ❑ Ex: equinocandinas e polioxinas



Quitina

38

RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

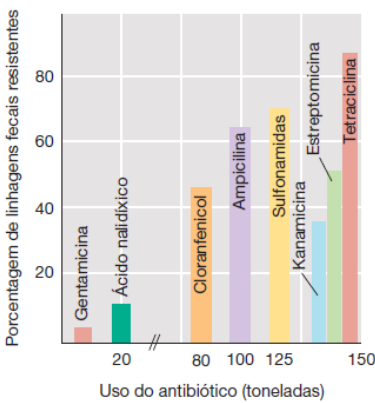


Figura 27.34 Padrões de resistência a fármacos observados em patógenos. (a) Relação entre o uso do antibiótico e a porcentagem de bactérias resistentes ao antibiótico, isoladas de pacientes diarréicos. Os agentes utilizados em maior quantidade, conforme indicado pela quantidade produzida comercialmente, correspondem àquelas aos quais linhagens resistentes ao fármaco são mais frequentes. (b) Porcentagem de casos relatados de gonor-

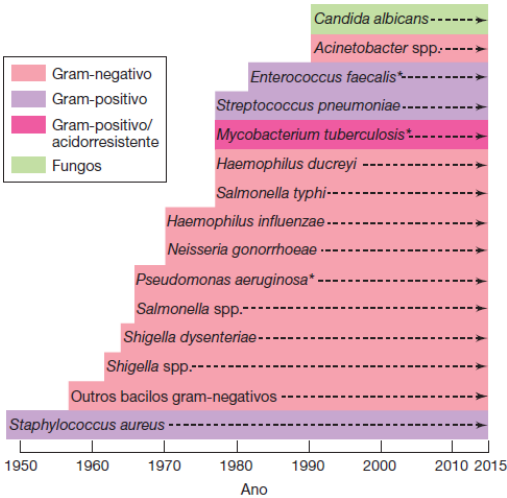


Figura 27.35 O surgimento da resistência aos fármacos antimicrobianos em alguns patógenos de seres humanos. Os asteriscos indicam que algumas linhagens destes patógenos atualmente não podem ser tratadas com os fármacos antimicrobianos conhecidos.



39

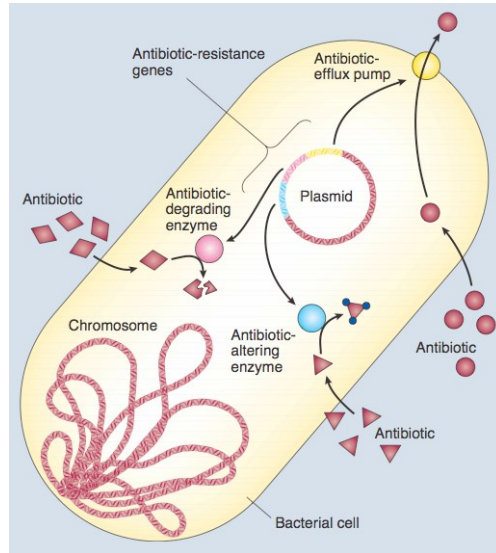
Tabela 27.8 Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos

Mecanismo de resistência	Exemplo de antibiótico	Base genética da resistência	Mecanismo presente em:
Redução da permeabilidade	Penicilinas	Cromossômica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bactérias entéricas
Inativação do antibiótico Exemplos: β-lactamases; enzimas modificadoras, tais como metilases, acetilases, fosforilases e outras	Penicilinas Cloranfenicol Aminoglicosídeos	Plasmidial e cromossômica Plasmidial e cromossômica Plasmidial	<i>Staphylococcus aureus</i> Bactérias entéricas <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Bactérias entéricas <i>Staphylococcus aureus</i>
Alteração do alvo Exemplos: RNA-polimerase, rifamicina; ribossomo, eritromicina e estreptomicina; DNA-girase, quinolonas	Eritromicina Rifamicina Estreptomicina Norfloxacino	Cromossômica	<i>Staphylococcus aureus</i> Bactérias entéricas Bactérias entéricas Bactérias entéricas <i>Staphylococcus aureus</i>
Desenvolvimento de uma via bioquímica resistente	Sulfonamidas	Cromossômica	Bactérias entéricas <i>Staphylococcus aureus</i>
Efluxo (bombeamento para fora da célula)	Tetraciclina Cloranfenicol Eritromicina	Plasmidial Cromossômica Cromossômica	Bactérias entéricas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus</i>

40

ANTIBIÓTICOS

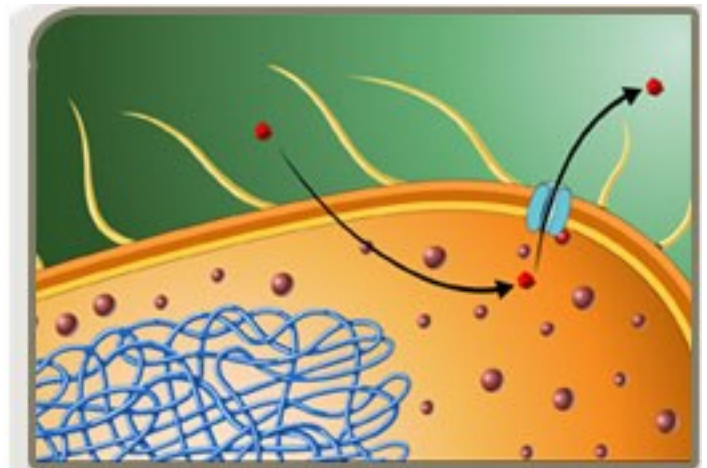
- ❑ Mecanismos de resistência em bactérias Gram (-) e Gram (+).



41

ANTIBIÓTICOS

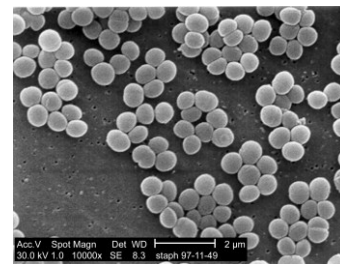
- ❑ Mecanismo de resistência a Tetraciclina
- ❑ Ex: Bomba de efluxo de Tetraciclina



42

ANTIBIÓTICOS

- ❑ Microorganismos resistentes a Penicilina: Gene β -lactamase
- ❑ Penicilinas (Cefalosporina) resistentes a β -lactamase
- ❑ Alternativa: penicilinas + clavulanato de potássio (inibidor da β -lactamase)



Staphylococcus

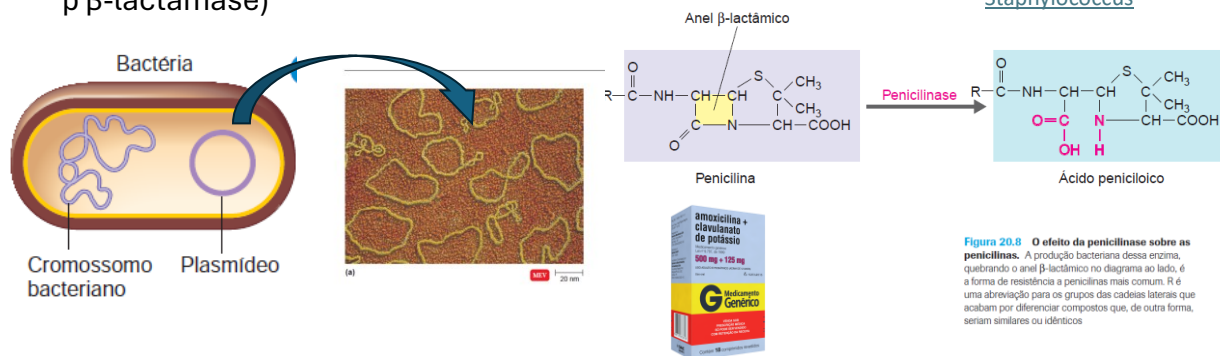
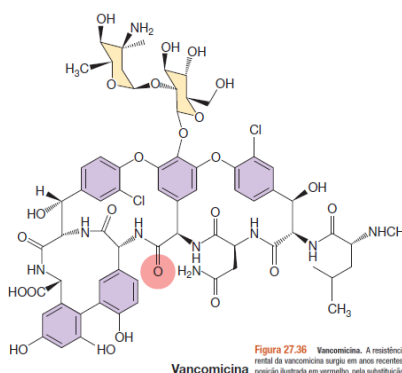
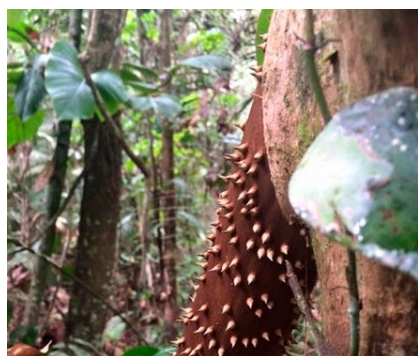


Figura 20.8 O efeito da penicilinase sobre as penicilinas. A produção bacteriana dessa enzima, quebrando o anel β -lactâmico no diagrama ao lado, é a forma de resistência a penicilinas mais comum. R é uma abreviação para os grupos das cadeias laterais que acabam por diferenciar compostos que, de outra forma, seriam similares ou idênticos.

43

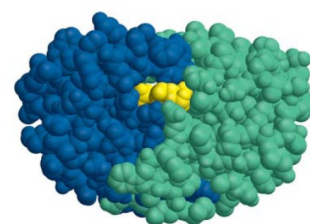
NOVOS FARMACOS

- ❑ Análogos de compostos antimicrobianos existentes
- ❑ Drogas geradas por computador
- ❑ Busca por novos compostos na natureza



Vancomicina

Figura 27.36 Vancomicina. A resistência intermediária à estrutura parental da vancomicina surgiu em anos recentes. No entanto, a modificação na posição ilustrada em vermelho, pela substituição do grupo metileno (-CH₂) pelo oxigênio carbonil restaura parte da atividade perdida. Assim como a penicilina, a vancomicina atua prevenindo a ligação cruzada do peptidoglicano e é mais efetiva contra polígonos Gram-positivos.



(a) Protease do HIV

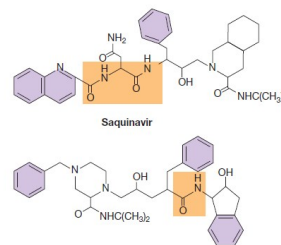


Figura 27.37 Fármacos anti-HIV gerados por computador. (a) O inibidor da protease do HIV. As cadeias polipeptídicas individuais estão ilustradas em verde e azul. Um peptídeo (em amarelo) encontra-se ligado ao sítio ativo. A protease do HIV cliva uma proteína precursora do HIV, uma etapa necessária à maturação viral. O bloqueio do sítio da protease pelo peptídeo apresentado inibe o processamento do precursor e a maturação do HIV. Esta estrutura é derivada de informações disponibilizadas no Protein Data Bank. (b) Este fármaco anti-HIV são análogos de peptídeos, referidos como inibidores de protease, desenvolvidos computacionalmente para bloquear o sítio ativo da protease do HIV. As regiões destacadas em laranja apresentam as regiões análogas às ligações peptídicas nas proteínas.

44

B-LACTAMICOS

Contra bactérias gram-negativas; requer injeção
Contra bactérias gram-positivas; administração oral

Resistente à penicilinase
Ampla espectro
Ampla espectro; combinada com um inibidor de penicilinase
Um monobactamo; eficiente contra bactérias gram-negativas, incluindo
Um carbapenemo; espectro de ação muito amplo

Cefalosporina de primeira geração; atividade similar à penicilina; requer injeção
Cefalosporina de quarta geração; administração oral

Contra bactérias gram-positivas; aplicação tópica
Um tipo glicopeptídico; resistente à penicilinase; contra bactérias gram-positivas

Inibe a síntese de ácido micólico, um componente da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*
Inibe a incorporação de ácido micólico na parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*

50

INIBIDORES DE SÍNTESE PROTEICA		
Cloranfenicol		Ampla espectro de ação; potencialmente tóxico
Aminoglicosídeos		
Estreptomicina		Ampla espectro de ação, incluindo micobactérias
Neomicina		Uso tópico; ampla espectro de ação
Gentamicina		Ampla espectro de ação, incluindo <i>Pseudomonas</i> spp.
Tetraciclínas		
Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina		Ampla espectro de ação, incluindo clamídias e rickettsias; aditivo de rações animais
Macrolídeos		
Eritromicina		Alternativa à penicilina
Azitromicina, claritromicina		Semissintéticos; espectro de ação mais amplo e penetração tecidual superior à eritromicina
Telitromicina (Ketek)		Nova geração de macrolídeos semissintéticos, usados para combater a resistência a outros macrolídeos
estreptograminas		
Quinupristina e dalfopristina (Synercid)		Alternativa ao tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas resistentes à vancomicina
Oxazolidinonas		
Linezolida (Zyvox)		Útil principalmente contra bactérias gram-positivas resistentes à penicilina
DANO À MEMBRANA PLASMÁTICA		
Polimixina B		Uso tópico; bactérias gram-negativas, incluindo <i>Pseudomonas</i> spp.
INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLEICOS		
Rifamicinas		
Rifampina (ou rifampicina)		Inibe a síntese de mRNA; tratamento de tuberculose

51

Drogas agrupadas de acordo com o mecanismo de ação	Comentários
Quinolonas e fluoroquinolonas	
Ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina	Inibem a síntese de DNA; amplo espectro de ação; infecções do trato urinário
Gatifloxacina	Quinolonas da geração mais nova; potência aumentada contra bactérias gram-positivas
INIBIDORES COMPETITIVOS DA SÍNTESE DE METABÓLITOS ESSENCIAIS	
Sulfonamidas	
Trimetoprim-sulfametoxazol	Amplo espectro de ação; a combinação é muito utilizada

52

ANTIBIÓTICOS

- ☐ Inibidores da síntese de ácidos nucleicos (DNA/RNA)
- ☐ **Rifamincina:** inibe a síntese de RNA
- ☐ **Quinolonas e fluoroquinolonas:** Inibem a DNA girase

células eucarióticas não contêm DNA girase. Eles contêm uma topoisomerase de DNA tipo II, mas as quinolonas a inibem apenas em concentrações muito maiores do que aqueles necessários para inibir as enzimas bacterianas

54