Controle do crescimento microbiano

Terminologia relacionada ao controle do crescimento microbiano

- **Esterilização**: Destruição ou remoção de todas as formas de vida microbiana, incluindo os endosporos, possivelmente com exceção dos príons.
- **Descontaminação**: o tratamento de um objeto ou uma superfície, de modo a torná-los seguros à manipulação.
- **Desinfecção**: Destruição ou remoção de patógenos na forma vegetativa, embora possa não eliminar todos os microrganismos.
- **Sepse:** indica contaminação bacteriana.
- **Asséptico**: significa que um objeto ou área está livre de patógenos.
- **Antissepsia**: Destruição de patógenos na forma vegetativa em tecidos vivos.
- **Degerminação**: Remoção de micro-organismos de uma área limitada, como a pele ao redor do local da aplicação de uma injeção. Basicamente uma remoção mecânica feita com algodão embebido em álcool.
- **Sanitização**: tratamento que reduze o número de microrganismos a níveis seguros de saúde pública.
- **Agente antimicrobiano**: produto químico natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de microrganismos.
- **Concentração inibitória mínima (CIM):** mede a atividade antimicrobiana. Menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo-teste.
- **Agentes biocidas**: tratamentos que causam a morte direta dos micro-organismos. Ligam-se fortemente a seus alvos celulares e matam as células dos micro-organismos.
- **Agentes biostáticos**: tratamentos que inibem ou diminuem o crescimento e a multiplicação de bactérias. São geralmente inibidores de algum importante processo bioquímico, como a síntese proteica, e a ligação é relativamente fraca; se o agente é removido, as células podem retomar seu crescimento. Muitos antibióticos se enquadram nesta categoria.
- **Agentes biolíticos**: matam as células devido à lise e liberação do conteúdo citoplasmático. A lise resulta em uma diminuição tanto no número de células viáveis quanto no número de células total.

A escolha de um desinfetante depende da eficácia, segurança, toxicidade, efeitos corrosivos e facilidade de remoção, entre outros fatores. No entanto, a eficácia dos desinfetantes é frequentemente afetada pela presença de materiais orgânicos, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, concentração, tempo de exposição e resistência bacteriana**.**

Fatores que influenciam a efetividade dos tratamentos antimicrobianos

- **Número de micro-organismos**. Quanto mais micro-organismos existem no início, mais tempo ou concentração são necessários para eliminar a população inteira.

- **Influências ambientais**. A presença de matéria orgânica (gorduras e proteínas especialmente) inibe frequentemente a ação dos antimicrobianos químicos. Os desinfetantes agem melhor em condições climáticas mais quentes porque sua atividade é condicionada a reações químicas dependentes de temperatura. Tratamentos com calor são muito mais eficientes sob condições ácidas.

- **Tempo de exposição**. Os antimicrobianos químicos frequentemente requerem exposição prolongada para que os microrganismos ou endosporos mais resistentes sejam afetados.

- **Características microbianas**. Os microrganismos variam consideravelmente quanto à susceptibilidade aos agentes antimicrobianos em função de sua constituição. Os príons são as formas mais resistentes, resistindo à desinfecção e à autoclave, seguido dos endósporos bacterianos, as micobactérias, os cistos e os oocistos protozoários, bactérias gram-negativas, fungos vegetativos e esporos de fungos, vírus não envelopados, bactérias gram-positivas e os vírus envelopados. Micro-organismos em biofilmes sobre superfícies são mais difíceis de serem atingidos com eficiência pelos biocidas.

Dianas dos agentes antimicrobianos

- **Síntese da parede celular**

- **Membrana plasmática**: Danos aos lipídeos ou proteínas da membrana plasmática por agentes antimicrobianos produzem câmbios na permeabilidade, potencial, na síntese de ATP e no transporte de elétrons, causando o extravasamento do conteúdo celular no meio circundante e interferindo no crescimento da célula.

- **Citoplasma**: coagula-se.

- **Proteínas, enzimas e ribossomos**: sofrem desnaturação pelo rompimento das ligações de hidrogênio, produzindo a perda da estrutura tridimensional, e das ligações covalentes.

- **Ácidos nucleicos DNA e RNA**: sofrem danos que frequentemente são letais para a célula, que não pode mais se replicar, nem realizar funções metabólicas normais como a síntese de enzimas.

- **Biossíntese de lipídeos**

Métodos físicos de controle do crescimento microbiano

1. Esterilização pelo calor

Todos os microrganismos apresentam uma temperatura máxima de crescimento, acima da qual o crescimento é impossível, geralmente porque uma ou mais estruturas-chave celulares são destruídas ou uma proteína-chave é desnaturada.

A eficácia do calor como agente esterilizante é medida por:

- **Ponto de morte térmica**: é a menor temperatura em que todos os micro-organismos em uma suspensão líquida específica serão mortos em 10 minutos.
- **Tempo de morte térmica**: é o tempo mínimo em que todas as bactérias em uma cultura líquida específica serão mortas, em uma dada temperatura. É fortemente afetado pelo tamanho da população testada: um maior tempo é necessário para matar todas as células de uma população grande, do que para uma população pequena.
- **Tempo de redução decimal**: período requerido para uma redução do 90% na viabilidade de uma população microbiana, a uma dada temperatura. É independente do número original de células.

A morte decorrente do aquecimento é uma função exponencial (de primeira ordem), ocorrendo mais rapidamente à medida que a temperatura se eleva. O tipo de calor também é importante: o calor úmido tem maior poder de penetração que o calor seco e, em certa temperatura, promove uma redução mais rápida no número de organismos vivos. O tempo de redução térmica é também uma função inerente da resistência ao calor dos microrganismos presentes; conforme esperado, termófilos e hipertermófilos são mais resistentes que os mesófilos. O meio onde o aquecimento é realizado também influencia na morte tanto de células vegetativas como de endósporos. A morte microbiana é mais rápida em pH ácido do que com pH neutro. Altas concentrações de açúcares, proteínas e gorduras dificultam a penetração do calor, geralmente aumentando a termorresistência dos organismos, ao passo que altas concentrações de sais podem aumentar ou diminuir a resistência ao calor, dependendo do organismo. Células desidratadas e endósporos são mais resistentes ao calor do que as células úmidas.

a. <u>Esterilização por calor úmido</u>

- **Fervura:** mata as formas vegetativas dos patógenos bacterianos, quase todos os vírus, e os fungos e seus esporos em 10 minutos aproximadamente.
- **Autoclave:** método usado para esterilizar itens que podem suportar altas temperaturas e pressões. A autoclave é um dispositivo de aquecimento selado que usa vapor sob pressão para matar os microrganismos. Quanto maior a pressão na autoclave, maior a temperatura. A autoclave utiliza vapor a uma pressão de 15 psi para alcançar 121°C, temperatura a qual morrem os endósporos termorresistentes após 15-20 min.
- **Pasteurização:** utiliza um aquecimento controlado para eliminar todas as bactérias patogênicas e reduzir o número total de microrganismos presentes, incluídos os deteriorantes, aumentando consideravelmente o prazo de validade.

- *Pasteurização de alta temperatura e curto tempo (HTST)*: é a mais comum, e consiste na elevação da temperatura do líquido para 71°C durante 15 segundos pelo controle cuidadoso da taxa de fluxo, assim como do tamanho e da temperatura da fonte de calor. Então, o liquido é rapidamente resfriado.
- *Tratamentos de temperatura ultraelevada (UHT)*: aquecimento a 135°C por 1 minuto, podendo ser o liquido armazenado sem refrigeração por vários meses.
- *Pasteurização em massa*: ocorre quando o liquido é tratado em grandes cubas a 63-66°C por 30 minutos. Este método é menos eficiente porque o liquido se aquece e esfria lentamente, alterando o sabor do produto final.

b. Esterilização por calor seco

O calor seco mata por efeitos de oxidação. A **chama direta** esteriliza efetivamente a alça de inoculação, aquecendo o fio até obter um brilho vermelho. A **incineração** é um modo efetivo de esterilizar e eliminar papel, copos, sacos e vestimentas contaminadas. A **esterilização em ar quente** consiste em esterilizar os itens em um forno, a uma temperatura de cerca de 170°C mantida por aproximadamente duas horas.

2. Radiação ultravioleta e ionizante

- **Radiação UV:** de comprimento de onda entre 220 e 300 nm, é absorvida pelo DNA e pode causar mutações ou outros sérios efeitos a ele, podendo levar à morte do organismo exposto. A radiação UV é útil na desinfecção de superfícies e ar, no entanto, tem baixo poder de penetração.
- **Radiação ionizante**: radiação eletromagnética que ioniza a água, formando radicais hidroxila altamente reativos que reagem com os componentes orgânicos celulares, especialmente o DNA. A radiação ionizante é normalmente gerada por uma fonte de raios X e apresenta energia e poder de penetração suficientes para matar os microrganismos em itens volumosos. A destruição dos endósporos com radiação ionizante é mais difícil do que a de células vegetativas, e os vírus são mais difíceis de serem destruídos do que as bactérias.

3. Esterilização por filtração

A filtração é a passagem de um líquido ou gás através de um filtro contendo poros com um diâmetro médio de 0,2 µm que impedem a passagem de quaisquer células que possam estar presentes. Um vácuo é criado no frasco coletor, e a pressão do ar força a passagem do líquido pelo filtro. Gases ou líquidos sensíveis ao calor devem ser esterilizados por filtração.

Vários tipos de filtros são utilizados rotineiramente na microbiologia:

- Um **filtro de profundidade** é uma lâmina ou camada fibrosa, confeccionada por um conjunto aleatório de fibras de papel ou de borossilicato (vidro) sobrepostas. Os filtros de profundidade são importantes para fins de biossegurança. O fluxo laminar de biossegurança, com o fluxo de ar para dentro e para fora da câmara passando através de um filtro de profundidade, denominado filtro HEPA (filtro de partículas de ar de alta eficiência). Os filtros HEPA geralmente removem partículas-teste de 0,3 µm, ou maiores, com eficiência maior que 99,9%.

- Os **filtros de membrana** são o tipo mais comum de filtros utilizados para a esterilização de líquidos em laboratórios de microbiologia. Membranas filtrantes são compostas por polímeros que suportam altas tensões, como ésteres de celulose ou polímeros plásticos, produzidos de forma a apresentarem inúmeros poros diminutos de apenas 0,1 mm de espessura. Os poros de um filtro de membrana incluem, por exemplo, tamanhos de 0,22 µm e 0,45 µm, que são destinados a bactérias. A filtração é realizada com o auxílio de seringa, compressor ou bomba de vácuo, para forçar a passagem do líquido através do aparato de filtração até um recipiente coletor estéril.
- O **filtro nucleoporo** é confeccionado por filmes com espessura de 10 mm de policarbonato tratados com radiação, sendo em seguida cauterizados com um produto químico, gerando poros muito uniformes. Os filtros nucleoporos são geralmente utilizados no isolamento de espécimes para microscopia eletrônica de varredura. Os microrganismos são removidos de um líquido ou amostra natural, como a água de um lago, e concentrados em um único plano no filtro, onde podem ser observados ao microscópio.

4. Baixas temperaturas

O seu efeito depende da resistência do microrganismo e da intensidade da aplicação. Sob refrigeração (0-7°C), a taxa metabólica da maioria dos microrganismos é reduzida e não podem se reproduzir ou sintetizar toxinas (efeito bacteriostático). Só os psicótrofos ainda crescem lentamente, alterando o aspecto e o sabor dos alimentos após algum tempo. Sob congelamento (< 0°C), os microrganismos tornam-se dormentes se essas temperaturas são obtidas rapidamente, porém o congelamento lento é mais nocivo às bactérias porque os cristais de gelo que se formam e crescem rompem a estrutura celular e molecular bacteriana.

5. Alta pressão

Quando se aplica alta pressão em suspensões líquidas, ela se transfere instantânea e uniformemente para a amostra. Se a pressão for alta o suficiente, as estruturas moleculares das proteínas e dos carboidratos serão alteradas, resultando na rápida inativação das células bacterianas vegetativas. Os endosporos são relativamente resistentes à alta pressão. Mantêm o sabor, a coloração e os valores nutricionais dos produtos.

6. Dessecação

Os microrganismos não podem crescer ou se reproduzir sob dessecação, mas podem permanecer viáveis por anos. Só quando a água é oferecida a eles, podem retomar seu crescimento e divisão. Esse é o princípio da *liofilização*, ou congelamento-dessecação, um processo utilizado em laboratórios para preservação de microrganismos. A resistência das células vegetativas ao ressecamento varia com a espécie e o ambiente do organismo. Vírus e endosporos bacterianos são altamente resistentes.

7. Pressão osmótica

A pressão osmótica se baseia no uso de altas concentrações de sais e açúcares para conservar o alimento. Altas concentrações dessas substâncias criam um ambiente hipertônico que ocasiona a saída da água da célula microbiana. Os fungos e os bolores são muito mais capazes que as bactérias de crescer em materiais com baixa umidade ou altas pressões osmóticas.

Métodos químicos de controle do crescimento microbiano

São usados para controlar o crescimento de microrganismos em tecidos vivos e objetos inanimados. Poucos agentes químicos proporcionam a esterilidade, porém a maioria deles reduz as populações microbianas em níveis seguros ou removem as formas vegetativas de patógenos.

1. Compostos fenólicos e bifenóis

Contêm uma molécula de fenol que foi quimicamente alterada para reduzir suas propriedades irritantes ou aumentar sua atividade antibacteriana em combinação com um detergente. Lesam as membranas plasmáticas lipídicas. Permanecem ativos em presença de compostos orgânicos, são estáveis e persistem por longos períodos após a aplicação. Os bifenóis são derivados do fenol que possuem dois grupos fenólicos ligados por uma ponte, como o triclosano.

2. Biguanidas

Apresentam um amplo espectro de atividade, sendo especialmente efetivas contra gram-positivas e maioria de gram-negativas (exceto pseudômonas). Não apresentam atividade esporocida, mas possuem alguma ação contra vírus envelopados. Afetam principalmente as membranas celulares bacterianas. A biguanida mais conhecida é a clorexidina.

3. Halogênios

São agentes antimicrobianos eficazes, tanto isoladamente quanto como constituintes de compostos inorgânicos ou orgânicos.

O **iodo** é um antisséptico eficiente contra todos os tipos de bactérias, muitos endosporos, vários fungos e alguns vírus. Impede a síntese de algumas proteínas e causa alterações nas membranas celulares, sendo usado na desinfecção da pele e no tratamento de feridas. Um iodóforo é a combinação de iodo e uma molécula orgânica, da qual o iodo é lentamente liberado. Eles possuem a atividade antimicrobiana do iodo, mas não mancham e são menos irritantes.

O **cloro**, como gás ou em combinação com outras substâncias químicas (hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro e cloraminas), é amplamente usado como desinfetante. Sua ação germicida é causada pelo ácido hipocloroso (HOCl), formado quando o cloro é adicionado à água, sendo um forte agente oxidante de fácil difusão através da parede celular que impede o funcionamento de boa parte do sistema enzimático celular.

4. Álcoois

Álcoois como o etanol e o isopropanol matam efetivamente as bactérias e os fungos, mas não os endosporos e os vírus não envelopados. Seu mecanismo de ação é a desnaturação de proteínas, o rompimento de membranas e a dissolução de lipídeos. Os álcoois têm a vantagem de agir e então evaporar rapidamente, sem deixar resíduo.

5. Metais pesados e seus compostos

A prata, o mercúrio e o cobre são biocidas ou antissépticos com ação oligodinâmica (atividade antimicrobiana a baixas concentrações) que se combinam com os grupos sulfidrila nas proteínas celulares causando a sua desnaturação.

A **prata** é usada como antisséptico (nitrato de prata a 1%) e como agente antimicrobiano em embalagens plásticas de alimentos (nanopartículas de prata) e em camisas para reduzir odores.

O cloreto de **mercúrio** é um agente bacteriostático de amplo espectro, porém seu uso é limitado devido à sua toxicidade, poder de corrosão e ineficácia em presença de matéria orgânica.

O sulfato de **cobre** é usado como algicida em reservatórios, tanques, piscinas e aquários. O **zinco** é usado como antimicrobiano em telhas galvanizadas, impedindo o crescimento de algas.

6. Agentes de superfície

Os agentes de superfície (tensoativos ou surfactantes) podem reduzir a tensão superficial entre as moléculas de um líquido.

Os mais amplamente usados são os detergentes catiônicos, como os **compostos quaternários de amônio** (cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridínio). Alteram a permeabilidade celular e causam a perda de constituintes citoplasmáticos essenciais (K^+). São antimicrobianos eficazes contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, amebas e vírus envelopados, mas não matam endosporos ou micobactérias. São incolores, inodoros, insípidos, estáveis, facilmente solúveis e atóxicos, exceto em altas concentrações, porém a matéria orgânica interfere com sua atividade e são neutralizados por sabões e detergentes aniônicos.

O **sabão** é um agente degerminante que emulsiona os óleos dos microrganismos em gotículas pequenas que são removidas junto com a água.

Os **desinfetantes ácido-aniônicos** reagem com a membrana plasmática, são de amplo espectro, são atóxicos, não corrosivos e possuem rápida ação.

7. Conservantes químicos de alimentos

São adicionados aos alimentos para retardar sua deterioração.

O **ácido sórbico, o sorbato de potássio e o benzoato de sódio** inibem o crescimento de bolores em certos alimentos ácidos, interferindo no seu metabolismo ou na integridade de sua membrana plasmática. São ácidos orgânicos simples ou sais de ácidos orgânicos, que o corpo metaboliza prontamente e que em geral são considerados seguros em alimentos.

O **nitrato de sódio e o nitrito de sódio** interferem no crescimento de endosporos botulínicos presentes em produtos derivados de carne, porém a sua reação com os aminoácidos da carne produz os carcinogênicos conhecidos como nitrosaminas.

8. Antibióticos

A **nisina** é uma bacteriocina (proteína que é produzida por uma bactéria e que inibe outra) frequentemente adicionada ao queijo para inibir o crescimento de certas bactérias formadoras de endosporos que causam deterioração. A nisina é insípida, facilmente digerida e atóxica.

A **natamicina** (pimaricina) é um antibiótico antifúngico aprovado para uso em alimentos, principalmente para os queijos.

9. Aldeídos

Os aldeídos (formaldeído, glutaraldeído) são antimicrobianos muito eficazes que inativam as proteínas pela formação de ligações cruzadas covalentes com vários grupos funcionais orgânicos delas. O glutaraldeído é um desinfetante químico líquido menos irritante e mais efetivo que o formaldeído, sendo um dos poucos que pode ser considerado como agente esterilizante.

10. Esterilização química

Os **quimioesterilizantes gasosos** frequentemente são utilizados como substituintes de processos físicos de esterilização. Sua aplicação requer a utilização de uma câmara fechada similar a uma autoclave. O *óxido de etileno* forma ligações cruzadas em ácidos nucleicos e proteínas, inibindo funções celulares vitais. Ele é altamente penetrante e capaz de esterilizar à temperatura ambiente, matando todos os microrganismos e endosporos, mas requer um período de exposição prolongado, é tóxico e explosivo em sua forma pura.

A **esterilização por plasma** é um método confiável para a esterilização de instrumentos médicos tubulares. Os instrumentos são colocados em um recipiente ondem peróxido de hidrogênio é excitado em vácuo por um campo eletromagnético para formar o plasma. Este plasma possui muitos radicais livres, que rapidamente destroem todo tipo de microrganismos. Este processo possui elementos de esterilização tanto química quanto física e requer apenas baixas temperaturas, embora seja relativamente caro.

O uso de **fluidos supercríticos** em processos de esterilização combina métodos físicos e químicos. O dióxido de carbono comprimido em estado "supercrítico" apresenta maior solubilidade e menor tensão superficial, inativando a maioria dos organismos vegetativos que causam deterioração e que se desenvolvem em alimentos. Mesmo a inativação dos endosporos requer apenas uma temperatura de cerca de 45°C.

11. Peroxigênios e outras formas de oxigênio

Os peroxigênios são um grupo de agentes oxidantes que inclui:

- O **peróxido de hidrogênio**: é um bom antisséptico de objetos inanimados, e chega a apresentar efeito esporocida em concentrações elevadas. O peróxido suplanta as enzimas protetoras das bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas.
- O **ácido peracético**: é um dos mais efetivos esporocidas químicos líquidos disponíveis e pode ser usado como esterilizante. Seu modo de ação é similar ao do peróxido de hidrogênio. Não deixa resíduos tóxicos e é minimamente afetado pela presença de matéria orgânica.
- O **ozônio**: forma altamente reativa do oxigênio, gerada pela passagem de oxigênio por descargas elétricas de alta voltagem. É usado para complementar a cloração na desinfecção da água, pois ajuda a neutralizar sabores e odores. Também é utilizado na descontaminação de produtos alimentícios, superfícies de contato com alimentos, equipamentos e ambiente de processamento de alimentos. O ozônio é gerado no local e apresenta baixo impacto ambiental porque se decompõe rapidamente sem deixar resíduos tóxicos. O ozônio não tem dianas seletivas nos microrganismos, pelo que estes não foram capazes de gerar resistências. No entanto, a estabilidade do ozônio é afetada pelas condições de temperatura e pH e sua eficácia é diminuída pela presença de matéria orgânica.

12. Óleos essenciais

Atualmente, são conhecidos mais de 3000 óleos essenciais extraídos de diferentes partes das plantas, como flores, frutos, folhas, raízes e sementes. Os óleos essenciais têm uma versátil composição, que pode variar dependendo da área geográfica, do clima, da estação, da composição do solo, da idade, do ciclo vegetativo da planta e do método de extração utilizado, entre outros fatores. Ademais, numerosos óleos essenciais mostraram ter propriedades antioxidantes, bactericidas, antiparasitas, inseticidas, antivirais e antifúngicas. De fato, os óleos essenciais são capazes de causar mudanças na morfologia das células, nas propriedades físico-químicas da membrana, assim como alterar a produção de toxinas, romper a membrana intracelular, inibir reações enzimáticas e a divisão celular. Porém, a utilização dos óleos essenciais vem sendo limitada pelo seu sabor marcante, por terem pouca solubilidade e parcial volatilidade.

13. Água eletrolisada

É considerado um desinfetante seguro, não poluente e não corrosivo. É mais rentável do que os desinfetantes tradicionais porque, uma vez comprada a unidade geradora, as únicas despesas operacionais são água, sal e eletricidade. A atividade bactericida da água eletrolisada procede da ação combinada de pH, potencial de oxidação-redução e concentração de cloro disponível. Assim, a água eletrolisada danifica as membranas celulares e reduz a atividade enzimática.

14. Bacteriófagos

Consiste na aplicação de vírus que infectam as bactérias presentes na cadeia alimentar. Estes vírus expressam proteínas específicas, tais como endolisinas e outras hidrolases que degradam ou interferem diretamente na biossíntese de peptídeoglicanos bacterianos. Esta técnica é versátil para o controle de biofilmes, altamente ativa e específica (sem efeitos adversos sobre a microbiota intestinal e inócua para células de mamíferos), de baixo custo e geneticamente maleável. No entanto, o espectro de infeção limitado de cada bacteriófago necessita da identificação de patógenos bacterianos causais e da sua susceptibilidade a fagos. De fato, algumas bactérias podem desenvolver resistência aos fagos bloqueando a adsorção dos fagos, inibindo a injeção de genomas fágicos, sistemas de modificação de restrições e sistemas de infecção abortados. Além disso, os bacteriófagos devem ser geneticamente bem caracterizados para evitar a disseminação de traços indesejáveis (virulência e genes de resistência aos antibióticos) que possam envolver preocupações com a segurança. Em sistemas alimentares, diferentes fatores como a concentração e a taxa de difusão dos fagos, o estado fisiológico e a proporção de células imersas no biofilme, bem como condições ambientais (temperatura, pH, presença de compostos inibitórios) podem afetar adicionalmente a infecção das células do biofilme por fagos.

15. Nanopartículas

Nanopartículas de prata, ouro ou quitosana mostraram uma alta eficácia como antimicrobianos pela sua alta reatividade contra sistemas biológicos. Estas nanopartículas podem carregar adicionalmente outros antimicrobianos por encapsulação física, adsorção ou conjugação química, controlando a sua libertação e melhorando a sua atividade bactericida contra patógenos microbianos.