**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

### Aula T/P7: Controle das populações microbianas – Antibiograma e antimicrobianos naturais

Profa. Elisabete Vicente ([bevicent@usp.br](mailto:bevicent@usp.br))

**Resumo:**

**DIA 1: - Apresentação da Prática e do Questionário para Estudos.**

**DIA 2: Leitura de Análise dos Resultados, Discussão e Conferência de algumas Respostas do Questionário.**

**DIA 3: Relatório Final e de todas Questões Respondidas.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| A drawing of a cartoon character  Description automatically generated | ***Olá!***  ***Recado:*** | **- As Tarefas propostas (Dia 1) estão em fonte preta,**  **- As Análises, Discussões e Respostas das Questões (Dia2) estão em fonte colorida.** |

**Introdução**

## O bem-estar do homem e suas conveniências dependem em grande parte, do controle que ele exerce sobre os microrganismos. Isto é demonstrado em muitas de nossas atividades diárias, tais como purificação das águas, pasteurização de leite e refrigeração de alimentos. As principais razões para o emprego de métodos de controle dos microrganismos são: prevenir a transmissão de doenças infecciosas; prevenir a deterioração de alimentos e prevenir contaminações microbianas.

A inibição ou destruição dos microrganismos pode ser feita por meio de agentes químicos ou físicos. Entre os **agentes físicos** mais frequentemente utilizados estão: as diferentes formas de calor (considere as diferenças entre calor seco e calor úmido), as baixas temperaturas e as radiações. Quanto aos **agentes químicos**, inúmeros são empregados, tais como: formol, fenol, óxido de etileno, entre outros. Ainda podemos acrescentar a **filtração** de soluções, que embora não iniba ou mate os microrganismos, permite a remoção destes com consequente esterilização.

No controle das populações microbianas, os **antibióticos** são muito importantes e, por isto, serão estudados com atenção especial em Aula T (Antibióticos e Resistência bacteriana) e em aula T/P (Antibiograma).

A diferença fundamental entre **Antibióticos** e “**Agentes antimicrobianos químicos**” (Desinfetantes e Antissépticos) reside no fato de que os antibióticos podem ser introduzidos no organismo, desde que, em doses prescritas que não causem danos à célula animal, pois têm toxicidade seletiva (veremos com mais detalhes isto na Aula T. Os agentes químicos, de modo geral, são agressivos às células e só podem ser utilizados na desinfecção de instrumentos e de superfícies (Desinfetantes) ou na antissepsia da pele e mucosas (Antissépticos), como veremos na Aula T – Esterilização e Desinfecção).

**OBJETIVo**

Nesta Aula T/P, serão estudados “**Antibiograma e antimicrobianos naturais**”.

Controle das populações microbianas – Antibiograma e antimicrobianos natuarais

A drawing of a cartoon character

Description automatically generated

**PRÁTICA A: Antibiograma - DIA 1:**

**A) Introdução:**

O antibiograma é um teste que permite a verificação *in vitro* da sensibilidade de uma bactéria a vários antibióticos. Este método foi desenvolvido por **Kirby-Bauer**. A sensibilidade é demonstrada pela zona ou halo de inibição de crescimento que se forma ao redor do disco de antibiótico.

O tamanho do **diâmetro do halo de sensibilidade** é **medido em mm** e é analisado frente aos valores de um padrão em uma Tabela fornecida pelo fabricante dos antibióticos em análise (**Tabela 1**). Este procedimento permite se saber se a bactéria é: **Sensível**, apresenta **Sensibilidade Intermediaria**, ou é **resistente** ao antibiótico presente no disco.

O antibiograma é uma técnica fundamental, pois permite a escolha do antimicrobiano apropriado para o controle de infeções bactérias. Assim, tem como objetivo determinar a sensibilidade aos antibióticos da bactéria em análise causadora da infeção.

**B) Material:**

1 - Tubo com cultura líquida de *Staphylococcus aureus*;

2 - Tubo com cultura líquida de *Escherichia coli*;

3 - Placas contendo meio sólido Mueller- Hinton (2 unidades);

4 - Discos com Antibióticos;

5 - Zaragatoas (2 unidades), Pinça (1 unidade), régua (1 unidade)

**C) Procedimento:**

1. Utilizando uma zaragatoa e a técnicas de assepsia, coletar bactérias de uma cultura fresca bacteriana;

2. Espalhar uniformemente as células sobre a superfície de meio sólido Mueller-Hinton contido numa placa de Petri;

3. Deixar secar a superfície;

|  |  |
| --- | --- |
| 4. Dispensar os discos de antibióticos na tampa da placa de Petri. Utilizando uma pinça, depositar os discos na superfície da cultura em meio sólido, tendo o cuidado de deixá-los uniformemente e bem espaçados. Não arrastar os discos sobre o meio de cultura porque a difusão inicia-se imediatamente (**Fig. 1**); | UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO Núcleo de Pesquisas em Ciências  Biológicas Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PDF Download  grátis |

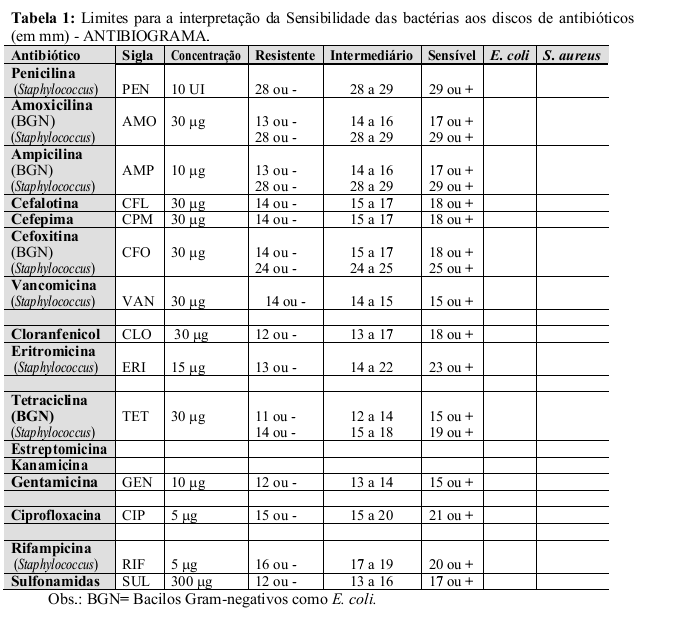
5. Incubar em estufa, a 37 ºC, durante 16-24 horas.

**D) Resultados:**

1. Utilizando uma régua, meça os diâmetros (mm) dos halos de inibição de crescimento em torno de cada um dos discos de antibióticos e registre os dados obtidos no **Quadro 1.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Antibiograma.jpeg | Diâmetro do halo de inibição de crescimento | image.png |

**Fig. 4**: Medição de halos de inibição de crescimento de colônias bacterianas

****

**DIA 2: Leitura de Análise dos Resultados, Discussão e Conferência de algumas Respostas do Questionário.**

**D) Resultados**

Suponha que você está no Lab e tiras seguintes fotos dos Antibiogramas (abaixo). Obs: As fotos estão em tamanho aproximado ao real para uma tela de computador de 13 polegadas. (O diâmetro interno da placa tem 8 cm). Em círculos azuis, estão assinalados os SIGLAS dos NOMES dos Antibióticos em cada disquinho e suas respectivas concentrações.

Obs: Nos Antibiogramas, *E. coli* é considerado um bacilo Gram-negativo (BGN)

|  |
| --- |
|  |
|  |

**Agora você já tem todos os Resultados. Complete o Relatório e Responda as Questões.**

**Vamos lá!**

**E) Análise e Interpretação:**

1. Utilizando a Tabela padrão (**Tabela 1**), analise a sensibilidade das bactérias aos diversos antibióticos pesquisados. Registre suas análises no **Quadro 1** abaixo (exemplos: em azul)

Quadro 1: Resultados do antibiograma dos isolados *E. coli* e *S. aureus* analisados.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  | **Resultados obtidos** | | |
| Nome do Antibiótico | Sigla | Conc | **R** | **I** | **S** | *E. coli* | *S. aureus* | Resultado |
| **Penicilina** | **PEN** | **10** | 28 ou - | 28 a 29 | 29 ou + |  |  |  |
| Ciprofloxacina | **CIP** | 5 | 15 ou - | 15 a 20 | 21 ou + |  | 25 | S |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**QUESTOES PARA ESTUDO e FIXAÇÃO**

1. O que é e qual a utilidade de um Antibiograma?

2. Quais foram os resultados experimentais obtidos pelo seu grupo? Defina o perfil de sensibilidade de cada uma das bactérias para os antibióticos testados?

3. Que explicações você pode dar para justificar a resistência encontrada frente a alguns dos antibióticos testados?

4. Devem ser utilizados discos de antibióticos diferentes para pesquisa de sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas? Por quê?

5. Qual a diferença de um antibiótico **bacteriostático** e um **bactericida**?

6. O que é **CIM** (ou **MIC**)?

**PRÁTICA B- Complementar: Antimicrobianos Naturais- DIA 1:**

**A) Introdução:**

Muitos vegetais contêm compostos que são inibidores de crescimento de microrganismos e, na natureza, exercem papel importante na resistência destes vegetais a vários patógenos. São exemplos desta resistência natural o alho, o cravo, e vários temperos. Com o passar os tempos o homem aprendeu a utilizá-los visando o aumento do tempo de prateleira de alimentos.

A ação antimicrobiana destes aditivos alimentares pode ser verificada analisando-se de **extratos** ou **partes homogeneizadas** de vegetais colocados frente a culturas de microrganismos. A seguir, vamos fazer a análise da presença de compostos antimicrobianos em alguns temperos vegetais.

**B) Material:**

1 - Tubo com cultura líquida de *Staphylococcus aureus*;

2 - Tubo com cultura líquida de *Escherichia coli*;

3 - Placas com meio completo sólido TSA.

4.-Podem ser utilizados: Alho, cebola, coentro, orégano, tomilho, hortelã, cravo, etc.

5 - Zaragatoas ou Cotonetes. (2 unidades), Pinça (1 unidade), régua (1 unidade)

6. Graal e pistilo.

7. Discos de papel de filtro.

**C) Procedimento:**

1. Mergulhar o cotonete na suspensão do microrganismo;

2. Espalhar sobre a superfície do meio solido com o cotonete que foi embebido na cultura;

3. Macerar o agente antimicrobiano a ser testado, separadamente, em graal;

4. Embeber os discos de papel de filtro no macerado e colocá-los sobre a superfície do meio semeado;

5. Incubar a 37 °C, em estufa, por 16-24 horas e observar os halos de inibição.

**D) Resultados:**

1. Desenhe no **Figura** **5** abaixo os Resultados obtidos com os antimicrobianos naturais utilizados

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Alho\_\_\_ | \_\_\_\_\_\_\_\_ | \_\_\_\_\_\_\_\_ |

**Figura 5**: Efeito antimicrobiano de temperos e de aditivos alimentares caseiros.

**E) Análise, Discussão e Conclusões:**

**QUESTOES PARA ESTUDO e FIXAÇÃO**

1. Como explicar os resultados obtidos?

2. Comente a vantagem da prática de emprego de condimentos como o alho no tempero de alimentos.

**PRÁTICA B- Complementar: Antimicrobianos Naturais DIA 2:**

**D) Resultados**

**D) Resultados**

Suponha que você está no Lab e tiras seguintes fotos:

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  | Este alho em pedaço não ficou bem encaixado no meio. Por isto, para análise e melhor fazer sempre um macerado, como na Fig. ao lado. |

**E) Análise, Discussão e Conclusões:**

Agora você já tem todos os Resultados. Complete o Relatório e Responda as Questões.

Vamos lá!

**QUESTOES PARA ESTUDO e FIXAÇÃO**

1. Como explicar os resultados obtidos?

2. Comente a vantagem da prática de emprego de condimentos como o alho no tempero de alimentos.