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

### Aula T/P4-A: Controle das populações microbianas - Agentes antimicrobianos químicos e físicos.

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 (Dia 2 e Dia 3) 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).

Nesta Aula T/P, serão estudados alguns “**Agentes antimicrobianos químicos e físicos**”.

**OBJETIVo**

Nesta aula vamos apresentar e discutir como podem ser realizados o “Controle microbiológico microbiano” pela ação de: 1) Calor, 2) Antissépticos, 3) Desinfetantes e 4) Radiação Ultravioleta (RUV).

**PRÁTICA 1: Controle microbiologico pelo calor** - **Influência da temperatura em culturas de *E. coli* e *Bacillus* sp**

Neste experimento vamos analisar o efeito que o calor exerce sobre bactérias esporuladas (como bactérias do gênero ***Bacillus***) e não esporuladas (como a bactéria ***Escherichia coli***). Será que estas bactérias têm padrões diferentes de resistência ao calor?

**DIA 1: A) Execução do Experimento**

##### A) Material

1. Cultura de *Escherichia coli* (bactéria não esporulada).

2. Cultura de *Bacillus subtilis* (bactéria esporulada).

3. Tubos contendo 1ml de solução salina estéril.

4. Placas de Petri contendo ágar nutriente.

5. Banho-maria a 80 ºC.

6. Alça de platina.

**B) Método 1: Atividade ação do calor a 80 ºC – Fornecido por um Banho-Maria.**

1. Divida o fundo das placas de Petri em 4 partes iguais. Anote 0 no primeiro quadrante, 10 no segundo, 20 no terceiro e 30 no quarto quadrante **(Fig. 1);**

3. Identifique o microrganismo que será estudado em cada placa;

4. Faça uma diluição de cada cultura em estudo em solução salina (100 ml da cultura em 900 ml de salina = 10X);

5. Introduza a alça de platina na suspensão de *E. coli*. Esgote-a na parede do tubo e semeie o primeiro quadrante da placa (0). Faça o mesmo para*B. subtilis*;

6. A seguir, coloque ambos os tubos no banho-Maria a 80 ºC. Aguarde 10 minutos, retire uma amostra de ambos os tubos e inocule no 2º quadrante;

7. Volte os tubos novamente ao banho-Maria. Aguarde 10 minutos e inocule no 3º quadrante;

8. Volte os tubos ao banho-Maria e aguarde 10 minutos. Inocule no 4º quadrante;

9. Incube as placas em estufa a 37 ºC, por 16-24 horas;

10. Após o cultivo, faça a leitura das placas, registrando a quantidade das colônias crescidas em cada quadrante. Faca uma análise semi-quantitativa da quantidade das colônias crescidas, marcando de zero a quatro cruzes ( - / + / ++ / +++ / ++++ ), de acordo com o número de colônias observadas.

|  |  |
| --- | --- |
| ***E. coli***  **10**  **20**  **0**  **30** | *Bacillus*  **10**  **0**  **30**  **20** |
| **Fig. 1A**: Ação do calor de Banho-Maria a 80 ºC. Semeadura de *E. coli* | **Fig. 1B**: Ação do calor de Banho-Maria a 80 ºC. Semeadura de *Bacillus* *subtilis*. |

#### Método 2: Atividade descontaminante do calor produzido por uma panela de pressão

Considere que, sob pressão de 1 Atmosfera, semelhante àquela que se alcança numa autoclave, a temperatura alcança 121 ºC. Assim, numa panela de pressão, certamente a temperatura alcançada é superior a 100 ºC. (Obs.: A esterilização em autoclave é feita incubando-se a 121 o C, por 20 min).

#### 1. Divida o fundo das placas de Petri em 2 partes iguais. Anote 0 no primeiro quadrante e 30 no segundo quadrante (Fig. 2);

2. Identifique o microrganismo nas duas placas;

3. Faça uma diluição de cada cultura em estudo em solução salina (100 ml da cultura em 900 ml de salina = 10X);

4. Introduza a alça de platina na suspensão de *E. coli*. Esgote-a na parede do tubo e semeie o primeiro quadrante da placa (0). Faça o mesmo para*B. subtilis*;

5. Encha com água a panela de pressão até ¼ do volume, coloque dentro da panela um suporte para os tubos das diluições das culturas, de modo que o material a ser descontaminado (*E. coli* e *B. subtilis*) fique fora da água. Acondicione os tubos. Acenda o fogo, feche a panela e espere a emissão de vapores. Aguarde 30 min.;

6. Inocule uma amostra de cada cultura tratada e inocule no 2º quadrante correspondente;

6. Incube as placas em estufa a 37 ºC, por 16-24 horas.

7. Após o cultivo, faça a leitura das placas, registrando a quantidade das colônias crescidas em cada quadrante. Faca uma análise semi-quantitativa da quantidade das colônias crescidas, marcando de zero a quatro cruzes ( - / + / ++ / +++ / ++++ ), de acordo com o número de colônias observadas.

|  |  |
| --- | --- |
| ***E. coli***  **30**  **0** | *Bacillus*  **0**  **30** |
| **Fig. 2A**: Ação do calor de panela de pressão. Semeadura antes (0) e depois da incubação (30). Semeadura de *E. coli* | **Fig. 2B**: Ação do calor de panela de pressão. Semeadura antes (0) e depois da incubação (30). Semeadura de *Bacillus* *subtilis*. |

**C) Resultados**

**Quadro 1:** Sensibilidade de culturas bacterianas frente a diferentes tratamentos térmicos, por diferentes intervalos de tempo.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Método de tratamento | | Número de colônias crescidas após incubação a 37 ºC, por 16 hs. | | | |
| 0 min | 10 min | 20 min | 30 min |
| ***E. coli*** | Banho-Maria  a 80 ºC |  |  |  |  |
| ***B. subtilis*** |  |  |  |  |
| ***E. coli*** | Panela de pressão |  | NR | NR |  |
| ***B. subtilis*** |  | NR | NR |  |

Obs.: NR, não foi realizado.

**D) Discussão:**

**QUESTÕES PARA ESTUDO e Fixação de conceitos**

1. Compare os resultados obtidos com as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis.* Por que algumas bactérias não são destruídas pelo calor, mesmo quando incubadas a temperatura de até 80 oC por 30 minutos?

2. Qual é a relação entre tempo e temperatura no processo de eliminação de microrganismos?

3. Podemos dizer que a incubação a temperatura em banho-Maria a temperatura de a 80 ºC promove a esterilização de uma cultura bacteriana?

4. Podemos afirmar que a incubação em panela de pressão, por 30 minutos, promove a esterilização de uma cultura bacteriana?

,

**PRÁTICA 2: AÇãO DE antissépticos**

###### O que são antissépticos? São produtos usados para fazer a assepsia da pele e da mucosa.

###### Neste experimento vamos analisar a ação de diversos antissépticos como, tintura de iodo, mertiolate ou sabão, na desinfecção da pele.

##### Dia 1: Execução da Prática:

##### A) Material

1. Tubos contendo 1ml de antisséptico (solução salina estéril, sabonete líquido, antisséptico bucal, mertiolate,

2. Placas de Petri contendo ágar nutriente,

3. Alça de platina,

4. Tubos contendo 1ml de antissépticos variados empregados pelos diversos grupos: dois são os fornecidos, demais são propostos pelos alunos (**Fig. 5**):

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Como Fazer Sabonete Líquido: 3 Receitas que Você Precisa Ver** | Antisséptico Bucal Listerine Zero 250ml - Drogarias Pacheco |  |  |  | SWAB HASTE PLÁSTICA ESTÉRIL C/100 LABOR IMPORT - PRIME CIRURGICA - CNPJ  27.376.022/0001-07 |
| A) Solução salina | B) Sabonete líquido | C)  Antisséptico bucal | D) Antisséptico para olhos – collirio | E) Antisséptico para mãos Álcool em gel | F) **Chlorohex** -Antisséptico para pele |

**Fig. 5**: Antissépticos empregados no experimento

7. Zaragatoas (também chamadas de suabe).

**B) Método**

1. Dividir o fundo externo da placa de Petri em duas partes iguais **(Fig. 6);**

2. Coleta antes do tratamento: Umedecer um zaragatoa em solução salina e esfregar vigorosamente a pele da palma de uma das mãos numa área circular com aproximadamente 4 cm de diâmetro. Passar então o zaragatoa (semear) na superfície de uma das metades da placa de Petri;

3. Tratamento: Umedecer uma zaragatoa com antisséptico (sabonete líquido, tintura de iodo, mertiolate ou outro antisséptico e esfregar a pele da palma da outra mão, numa área circular com mesmo diâmetro que a primeira. Esperar 4 min para que haja a ação do antisséptico;

4. Coleta após o tratamento: Repetir os procedimentos do item 2, mas agora coletar amostra da área da palma da mão tratada com antisséptico, tomando o cuidado para não atingir a área circundante não tratada. Semear então a segunda metade da placa com esta zaragatoa,

5. Marcar na placa a indicação do antisséptico empregado,

6. Incubar a placa em estufa a 37 oC, por 16-24 horas;

7. Anotar os resultados na forma de cruzes no Quadro seguinte (**Quadro 2**).

**C) Resultados**

|  |  |
| --- | --- |
| **30**  **0** | **0**  **30** |
| **Fig. 6**: Ação do calor de antissépticos – Semeadura antes (0) e depois da incubação (30). | **Desenhe aqui os resultados obtidos.** |

**D) Análise-Discussão**

1. Faça a leitura das placas, registrando no **Quadro** **1** a quantidade de crescimento em cada um dos quadrantes. Faça uma **Análise qualitativa,** anote de zero a quatro cruzes dependendo da quantidade de colônias que cresceram;

2. Discuta diferença de sensibilidade/resistência de cada uma das bactérias frente ao tratamento

**Quadro 2:** Sensibilidade de culturas bacterianas frente a diferentes tratamentos térmicos, por diferentes intervalos de tempo.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Antisséptico usado no tratamento** | Antes do tratamento | Após o tratamento |
| A) Solução salina |  |  |
| B) Sabonete líquido |  |  |
| C) Antisséptico bucal |  |  |
| D) Antisséptico para olhos - colírio |  |  |
| E1) Antisséptico para mãos – Experimento 1 |  |  |
| E2) Antisséptico para mãos - Experimento 2 (duplicata) |  |  |
| F) Chlorohex – Antisséptico para pele |  |  |

***QUESTÕES PARA ESTUDO e Fixação de conceitos***

**1.** Qual foi o antisséptico utilizado pelo seu grupo e quais foram os resultados obtidos?

2. Compare os resultados obtidos com as diversas bactérias (*E. coli* e *Bacillus subtilis*) e as técnicas utilizadas.

3. Para agirem como antimicrobianos, os antissépticos sofrem interferência da presença de substâncias orgânicas como sujeira? Ou seja, em ambientes hospitalares é sempre necessário lavar as mãos com água e sabão antes de utilizar um antisséptico, ou quando se usa um antisséptico nem é necessário antes lavar as mãos?

**PRÁTICA 3: AÇÃO DE DESINFETANTES**

###### O que são desinfetantes? São produtos usados para fazer a assepsia de superfícies inanimadas.

Você já tem bem claro qual é a diferença entre desinfetante e antisséptico? Aproveite para revisar este assunto.

Neste experimento, vamos analisar o efeito de alguns desinfetantes domésticos sobre culturas bacterianas.

##### Dia 1: Execução da Prática:

##### A) Material

1. Tubo com 1,0 ml de cultura líquida de cultura bacteriana (usaremos *E. coli*)
2. Desinfetante a ser analisado:

|  |  |
| --- | --- |
| **A plastic water bottle on the counter  Description automatically generated** | Neste experimento, vamos usar desinfetantes domésticos.  Vocês estão convidados a escolherem um deles pelas fotos.  Vamos ver depois os resultados, OK? |

1. Pipeta estéril de 5 ml,
2. Tubo com volume conhecido de água esterilizada (para diluição 10 X do desinfetante, quando solicitado),
3. Placa de Petri contendo meio sólido (NA ou TSA)
4. Alça de Platina.

**B) Procedimento:**

**B1) Análise do Desinfetante Concentrado**

1 - Divida o fundo da placa de Petri em 3 partes (**Fig. 8-A**). Anote em cada uma delas:

**Antes**, **1** minuto, e **5** minutos. Anote o número do grupo.

Antes

Antes

**1**

**1**

**5**

**5**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| **Figura 8-A**: Desinfetante Concentrado | **Figura 8-B**: Desinfetante diluído 10 X |

2. Inocule uma alçada da suspensão bacteriana no espaço **Antes**,

3. Adicione 1,0 ml de desinfetante. Misture bem a cultura com o desinfetante e incube por **1 minuto**, à temperatura ambiente. Inocule uma alçada da mistura no espaço 1 minuto,

4. Incube a mistura bactéria-desinfetante por mais 4 minutos, à temperatura ambiente. Inocule uma alçada da mistura no espaço 5 minutos.

**B2) Análise do Desinfetante Diluído**

5. REPITA o Procedimento com o desinfetante diluído 10X (**Fig 8-B**).

6. Incube as placas em estufa a 37 ºC, por 16 a 24 horas.

**C) Resultados**

Complete com os desenhos das culturas crescidas nas

A drawing of a cartoon character

Description automatically generated

**4**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **]**  **1** | **2** | **3** |
|  | **5** | **6** |
| Fig. 8: Ação de desinfetantes**.** | | |

**D) Análise:**

1. Faça a leitura das placas, registrando no **Quadro** **3** a quantidade de crescimento em cada um dos quadrantes. Faça uma **Análise qualitativa,** anote de zero a quatro cruzes dependendo da quantidade de colônias que cresceram;

**Quadro 3:** Sensibilidade de culturas bacterianas frente a diferentes desinfetantes, por 1 e 5 minutos de intervalos de tempo (siga o exemplo em letras coloridas).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Desinfetante** | Antes do tratamento | Após o tratamento por 1 minuto | Após o tratamento por 5 minutos |
| 1 |  |  |  |
| 2 |  |  |  |
| 3 |  |  |  |
| 4. Ajax Rosa (acima) | **++++** | **++++** | **++++** |
| 5 |  |  |  |
| 6 |  |  |  |

**E) Discussão:**

1. Discuta diferença de sensibilidade/resistência de cada uma das bactérias frente ao tratamento**.**

***QUESTÕES PARA ESTUDO e Fixação de conceitos***

1. O que são desinfetantes?

2. Os Desinfetantes são capazes de promover a esterilização das bactérias?

3. Qual é a relação entre tempo e temperatura de incubação durante a descontaminação usando desinfetantes? O tempo é um fator que deve ser considerado?

4. Em termos de fórmulas químicas, qual a diferença dos a=desinfetantes e dos antissépticos? quando utilizar um e outro?

5. Defina, especificando a diferença:

- Antibiótico, Desinfetante; Antisséptico;

- Esterilização; Desinfecção.

**PRÁTICA 4: Sensibilidade aos Agentes físicos tóxicos - Radiação Ultravioleta (RUV)**

**DIA 1: A) Execução do Experimento**

##### A) Material

1. Cultura de *Escherichia coli* (bactéria não esporulada).

2. Cultura de *Bacillus subtilis* (bactéria esporulada).

4. Placas de Petri contendo Ágar nutriente.

6. Zaragatoa ((sinônimos: suabe ou “swab” de coleta).

#### SWAB HASTE PLÁSTICA ESTÉRIL C/100 LABOR IMPORT - PRIME CIRURGICA - CNPJ 27.376.022/0001-07

**B) Procedimento**:

1. Espalhar a cultura bacteriana sobre a superfície do meio sólido ágar nutriente com auxílio da zaragatoa;
2. Com auxílio de um anteparo (folha papel rígido), submeter a cultura a radiação ultravioleta por tempos diferentes entre 0 e 60 segundos.

|  |
| --- |
| Radiação UV |
| page17image7167376 |
|  |
| 0 60 seg |

Fig. 10: Esquema da irradiação das culturas bacterianas

1. Após irradiação, manter sempre as placas no escuro para evitar a fotorestauração das lesões. Incubar as placas a 37 oC, por 16-24 horas e, em seguida, armazenar em geladeira até a leitura.
2. Registrar os resultados obtidos com desenhos na **Fig. 11**.

**C) Resultados**

Complete com os desenhos das culturas crescidas nas

A drawing of a cartoon character

Description automatically generated

Desenho dos os resultados obtidos:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Radiação UV 254 nm | **Interpretação:** |  |
| page17image7167376 | page17image7167376 | page17image7167376 |
|  | *E. coli* | *Bacillus subtilis* |
| 0 60 seg |  |  |

Fig. 11: Resultados obtidos após as culturas *E. coli* e *Bacillus subtilis* terem sido submetidas a RUV.

**D) Análise**

1. Discuta diferença de sensibilidade/resistência de cada uma das bactérias frente ao tratamento com Radiação UV (RUV) de 254 nm.

***QUESTÕES PARA ESTUDO e Fixação de conceitos***

1. A radiação UV é esterilizante?

2. Os efeitos antimicrobianos promovidos pela radiação UV são dependentes de tempo de incubação?

3. Qual é o comprimento de onda da radiação UV que exerce seu máximo efeito antimicrobiano?

4. Quando uma célula microbiana é atingida pela radiação UV, várias macromoléculas são atingidas incluindo proteínas, RNA e DNA. Qual é o principal alvo que quando atingido promove lesões e a morte da célula microbiana?