

PROPOSTA DE MINICURSO

II Jornada Acadêmica da UFOPA

Data: 22 e 23 de Outubro de 2013

Horário: 18:00h às 22:00h

Carga Horária: 8h

Número de Participantes: 15 vagas

Local: laboratório de Microbiologia / IBEF-UFOPA

Tema: Minicurso Prático sobre Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à patógenos de interesse clínico.

Ministrante: Silvia Katrine Silva Escher – IBEF/UFOPA. Laboratório de Microbiologia.

Objetivo: Apresentar à comunidade acadêmica a metodologia de avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à patógenos de interesse clínico.

Ementa: Descrição dos métodos de avaliação de atividade antimicrobiana normatizados pela ANVISA. Preparação de suspensão de microrganismos para ensaio de atividade antimicrobiana (NCCLS, 2004). Parâmetros para avaliação da atividade antimicrobiana (NCCLS, 2004).

Metodologia:

Determinação da atividade antimicrobiana

Serão utilizados a cepas de bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e Gram negativas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e a levedura *Candida albicans*. Todas as cepas pertencem a Coleção de Cultura do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biodiversidade e Florestas da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Os patógenos serão previamente semeados em meios específicos nutricionais promovendo viabilidade de crescimento bacteriano. Para a semeadura dos patógenos serão preparadas

suspensões microbianas ajustadas a 0,5 da Escala de McFarland, que determina a concentração dos microrganismos de acordo com a absorvância que deve ser encontrada na espectrofotometria, correspondendo a 10^8 células/ml para bactérias e 10^4 células/ml para a levedura.

A metodologia utilizada no ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos será a difusão em disco em meio sólido (BAUER et al., 1966) e micro diluição (NCCLS, 2002). O ensaio de difusão em discos consistirá na semeadura de 100 µL das suspensões padronizadas dos microrganismos testes em placas de *petri* contendo ágar Mueller Hinton para bactérias e em meio Sabouraud Dextrose Agar para a levedura. Após o semeio das suspensões bacterianas, serão adicionados discos de papel de filtro estéreis em locais equidistantes de 20mm de distância no interior da placa, previamente embebidos com 10 µL do óleo essencial. Este sistema será incubado por 48 horas a 37°C, e posteriormente, serão realizadas as leituras para registro dos halos de inibição em intervalos de 24h 48h, obtendo-se assim a média dos valores dos halos nas repetições. O desempenho da atividade antimicrobiana será comparado à atividade de antibióticos de uso clínico para as infecções causadas pelos respectivos microrganismos, sendo denominados como controles positivos. São apresentados abaixo os controles positivos para o ensaio com os microrganismos teste.

Antibióticos usados no Controle positivo do ensaio

<i>Staphylococcus aureus</i>	Gentamicina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ciprofloxacina
<i>Escherichia coli</i>	Norfloxacina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina
<i>Enterococcus faecalis</i>	Clorafenicol
<i>Candida albicans</i>	Fluconazol

A avaliação da atividade antimicrobiana será realizada com base na classificação sugerida por Matsuura (2004). Segue a tabela com a interpretação da atividade antimicrobiana.

Tabela 2 – CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SUGERIDA POR MATSUURA (2004)

Tipo de inibição	Halo de Inibição	Intensidade da Inibição
Ausente	0	-
Baixa	7,0 – 10,0 mm	+
Moderada	11,0 – 14,0 mm	++
Alta	> 14,0 mm	+++

FONTE: BOMFIM, G.F. 2010.

Recursos necessários:

MATERIAL	
Especificação	Quantidade
Ágar Mueller Hinton 500g	2 unidades
Caldo Mueller Hinton 500g	2 unidades
Ágar Sabouraud Dextrose 500g	1 unidades
Ágar BHI (Brain Heart Infusion)	1 unidades
Kit para Coloração de Gram – 1000mL	1 unidades
Filme de PVC	2 unidades
Luvas de Procedimentos M	2 caixas
Luvas de Procedimentos P	2 caixas
Máscara descartável - Caixa com 100 unidades	2 caixas
Swab estéril - Caixa com 100 unidades	2 caixas
Microtubo 2ml – Pacote com 500 unidades	1 pacote
Membrana de Acetato de Celulose – Embalagem com 50 unidades	2 unidades
Ponteira 0,5 – 10 uL / Pacote com 500 unidades	1 unidade

Ponteira 1.000 uL/ Pacote com 500 unidades	1 unidade
Ponteira 200 uL/ Pacote com 500 unidades	1 unidade
Papel Alumínio	2 unidades
Disco de antibiograma - Gentamicina – Embalagem com 50 unidades	1 unidade
Disco de antibiograma - Ciprofloxacina– Embalagem com 50 unidades	1 unidade
Disco de antibiograma - Norfloxaciná– Embalagem com 50 unidades	1 unidade
Disco de antibiograma - Clorafenicó– Embalagem com 50 unidades	1 unidade
Disco de antibiograma - Fluconazol– Embalagem com 50 unidades	1 unidade
Solução fisiológica – 500mL	3 unidades