

Manual prático para teste de sensibilidade a antimicrobianos (Análise por absorvância e disco-difusão)

*Ronney Fernandes Chagas
Patrícia Thieme Onofri Saiki*

*Coordenação de Biologia
Departamento II
IFG – Câmpus Goiânia*

SUMÁRIO

1- Referencial teórico

1.1 – Antimicrobianos e suas aplicações	3
1.2 – Técnicas de análise de inibição por agentes antimicrobianos	4
1.2.1 – Concentração inibitória mínima	4
1.2.2 – Método de disco em difusão	5

2- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

2.1 - Avaliação da concentração inibitória mínima (CMI)	6
2.1.1 – Materiais	6
2.1.2 – Procedimentos	6
2.2 - Análise de sensibilidade por disco-difusão	7
2.2.1 – Materiais	7
2.2.2 – Procedimentos	7

3- Referências bibliográficas

8

1- REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 – Antimicrobianos e suas aplicações

Os antimicrobianos são uma classe de substâncias que inclui antibióticos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários. Seu principal mecanismo de ação é eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, sendo ferramentas cruciais na medicina, veterinária e agricultura, para o tratamento de diversas infecções (BRUNTON *et al.*, 2018).

A eficácia dos antimicrobianos reside em sua capacidade de atingir alvos específicos nos patógenos (como a parede celular, síntese proteica ou replicação do DNA), enquanto minimiza o dano às células do hospedeiro (BRUNTON *et al.*, 2018).

A identificação de novos antimicrobianos é de importância crítica e urgente para a saúde pública global. Com o rápido avanço da resistência antimicrobiana, que torna os medicamentos existentes ineficazes contra infecções que antes eram facilmente tratáveis, a taxa de descoberta de novos compostos tem sido insuficiente para acompanhar a evolução dos patógenos (WHO, 2020). Além disso, a exploração de novos compostos é essencial para a segurança farmacêutica. As novas moléculas antimicrobianas, ao serem desenvolvidas com mecanismos de ação mais seletivos e específicos, têm o potencial de apresentar menos efeitos colaterais. Os antibióticos tradicionais, em muitos casos, podem danificar células do hospedeiro ou desequilibrar a microbiota intestinal; a pesquisa moderna busca identificar e otimizar compostos que eliminam o patógeno de forma eficiente, porém, melhorando a tolerabilidade do tratamento e a qualidade de vida do paciente.

Além da importância médica, a descoberta de novas moléculas com ação antimicrobiana pode fornecer ferramentas eficazes para evitar grandes perdas econômicas na agricultura e na pecuária através do controle e combate de possíveis patógenos de plantas e animais.

A aplicação de estudos de desenvolvimento de novos antimicrobianos, vem ganhando cada vez mais destaque, também, na indústria alimentícia e de conservação de alimentos, pois visa combater os microrganismos deteriorantes e patogênicos que afetam a segurança e o prazo de validade dos produtos. Em contraste com os conservantes químicos tradicionais, a pesquisa moderna foca em compostos de origem natural, como

bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas e extratos de plantas, que demonstram alta eficácia contra patógenos de preocupação alimentar, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* Essa abordagem, conhecida como biopreservação, não só aumenta a segurança alimentar e reduz a deterioração, mas também atende à crescente demanda do consumidor por aditivos "rótulo limpo", minimizando a necessidade de processamento excessivo e ainda prolongando a qualidade dos alimentos (GUPTA *et al.*, 2019).

1.2 – Técnicas de análise de inibição por agentes antimicrobianos

A análise de inibição antimicrobiana por absorbância e teste de disco-difusão são duas técnicas amplamente empregadas para a verificação do potencial antimicrobiano de diferentes moléculas.

1.2.1 – Concentração inibitória mínima

A técnica verificada por absorbância é utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de um agente, sendo essencial para a triagem de novos compostos. Esta técnica baseia-se na medição do crescimento microbiano em meio líquido na presença de concentrações crescentes do antimicrobiano, utilizando um espectrofotômetro (geralmente a 600 nm) para avaliar as variações de turbidez da suspensão e consequentemente obter a absorbância para os diferentes tratamentos.

A menor concentração do composto onde não se observa aumento significativo da absorbância, quando comparada ao controle negativo (ausência de microrganismo), corresponde à CIM (CLSI, 2024) (Figura 1).

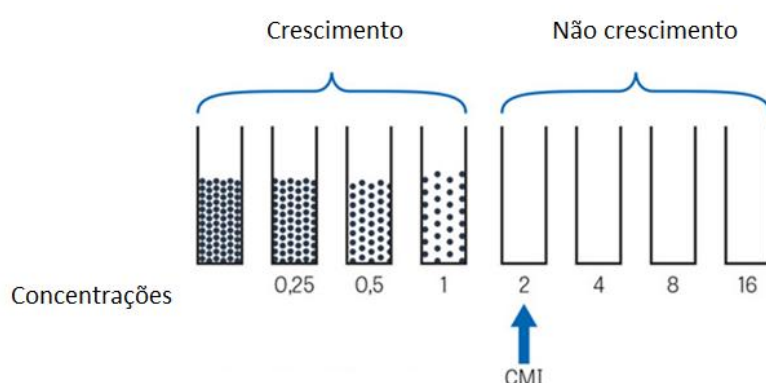


Figura 1: Princípio da determinação mínima inibitória. Adaptada de <https://www.hygies.net/publication-scientifique/lantibiogramme-objectifs-methodes-et-interpretation>.

1.2.2 – Método de difusão em disco

O método de disco-difusão, também conhecido como Teste de Kirby-Bauer, é uma técnica qualitativa que consiste em semear uniformemente o microrganismo testado sobre a superfície de uma placa contendo o meio ágar Mueller-Hinton e em seguida, adicionar pequenos discos de papel de filtro, impregnados com uma concentração conhecida do antimicrobiano, sobre a superfície do ágar. O antimicrobiano se difunde radialmente para o meio criando um gradiente de concentração (Figura 2). Se o microrganismo for sensível ao agente, seu crescimento será inibido em torno do disco, formando um halo de inibição. A medição do diâmetro desse halo é comparada com tabelas padronizadas, possibilitando a classificação do microrganismo como: sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) (CLSI, 2024).

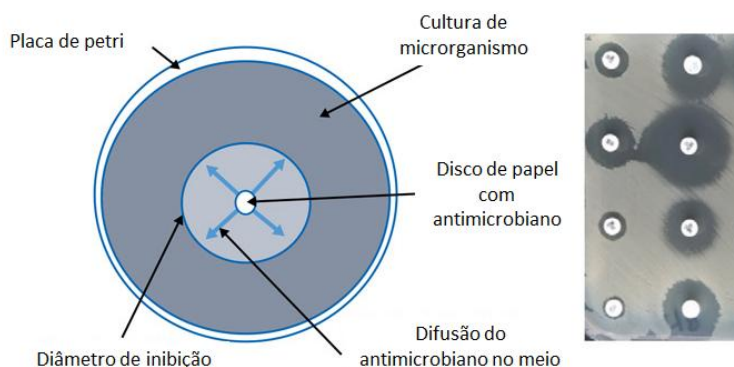


Figura 2: Princípio de inibição por disco-difusão. Adaptada de <https://www.hygienes.net/publication-scientifique/lantibiogramme-objectifs-methodes-et-interpretation>

Para garantir a precisão e a padronização das técnicas de disco-difusão e CIM, deve-se utilizar cepas de referência (geralmente da coleção ATCC - American Type Culture Collection) que possuem perfis de sensibilidade antimicrobiana estabelecidos e bem definidos por órgãos reguladores. Dentre os microrganismos mais comumente empregados para estes testes, destaca-se as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (CLSI, 2024).

A partir deste contexto, o objetivo do presente material é estabelecer um protocolo padronizado de avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes compostos, seja através de uma análise por turbidimetria ou através de teste de difusão em placa.

2- TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

2.1 – Avaliação da concentração inibitória mínima (CMI)

2.1.1 – Materiais

- ✓ Culturas de células padronizadas a 10^8 UFC.mL⁻¹ (*E. coli* e *S. aureus*);
- ✓ Meio de cultura Ágar Nutriente;
- ✓ Diluições seriadas do antimicrobiano testado;
- ✓ Tubos de ensaios estéreis;
- ✓ Solução estéril de Tetraciclina 1,0 µg/mL (para controle positivo de inibição);
- ✓ Espectrofotômetro.

2.1.2 – Procedimentos

- ✓ Realizar a diluição seriada do antimicrobiano testado (recomenda-se utilizar uma série de diluições até o intervalo de 10^5 ou até 10^8);
- ✓ Identifique os tubos para montagem do experimento;

Obs: para validação estatística proceder as análises em triplicata.

- ✓ Acrescente em cada tubo a quantidade de meio (Ágar Nutriente) para que o volume final da reação seja de 4 mL;
- ✓ Acrescentar o antimicrobiano na diluição analisada;
- ✓ Adicionar os microrganismos testados (em cada amostra utilizar 10^8 UFC.mL⁻¹);

Obs 1: utilizar como **controle negativo** o meio de cultura com a solução de microrganismos, porém sem adição do antimicrobiano;

Obs 2: utilizar como **controle positivo** o meio de cultura adicionado do inóculo de microrganismos e da solução de tetraciclina;

- ✓ Incubar por 24 h a 30°C;
- ✓ Analisar por turbidimetria através da leitura em espectrofotômetro DO₆₀₀.
- ✓ Identificar a menor concentração do antimicrobiano onde não se observa aumento significativo da absorbância, quando comparada ao controle negativo (CMI).

2.2 – Análise de sensibilidade por disco-difusão

2.2.1 – Materiais

- ✓ Culturas de células padronizadas a 10^8 UFC.mL⁻¹ (*E. coli* e *S. aureus*);
- ✓ Placas com meio de cultura Mueller-Hinton;
- ✓ Discos de papel filtro com antibióticos estéril;
- ✓ Antimicrobianos testados;
- ✓ Alça de Drigalski;
- ✓ Pinça estéril;
- ✓ Solução estéril de Tetraciclina 1,0 µg/mL (para controle positivo de inibição);
- ✓ Régua ou paquímetro.

2.2.2 – Procedimentos

- ✓ Preparar as placas adicionando o meio de cultura e aguardando a solidificação;
- ✓ Adicione 0,1 mL da cultura de células padronizadas e com a alça de Drigalski, espalhe a cultura por toda a superfície (semeadura por spread-plate);
- ✓ Em seguida, com auxílio de uma pinça estéril, umedeça os discos com a solução dos antimicrobianos e coloque-os sobre o meio com o microrganismo, de forma que os discos fiquem equidistantes na placa;

Obs 1: Para o **controle negativo**, umedeça o disco com água destilada estéril.

Obs 2: Para o **controle positivo**, utilize o disco umedecido com a solução de tetraciclina.

- ✓ Repita o procedimento para todos os antimicrobianos ou diluições testadas;

Obs: O teste pode ser realizado utilizando antimicrobianos cujas concentrações inibitórias já são estabelecidas por órgãos regulamentadores ou ainda pode ser realizado para testes de verificação de potencial antimicrobiano de substâncias ainda não conhecidas, neste caso é recomendado que sejam avaliadas diferentes diluições do produto.

- ✓ Incubar por 48 h a 30°C;
- ✓ Em seguida avaliar a inibição medindo o halo transparente gerado (em caso de resultado positivo para inibição) com um paquímetro ou régua.

Antimicrobiano	Concentração	Microrganismo	Zona do Halo (mm)

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNTON, Laurence L. *et al.* **Goodman & Gilman: A base farmacológica da terapêutica**. 13. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Education, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024. (Documento M100).

GUPTA, V. B.; JAISWAL, S.; ARORA, S. **Natural Antimicrobial Agents for Food Preservation: A Review**. *Trends in Food Science & Technology*, [S. l.], v. 88, p. 151-165, jun. 2019.

ROMANO-BERTRAND, Sara; POZZETTO, Bruno; DECOUSSER, Jean-Winoc. **L'antibiogramme : objectifs, méthodes et interprétation**. *Hygiènes*, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 253-258, jun. 2023. Disponível em: <https://www.hygienes.net/publication-scientifique/lantibiogramme-objectifs-methodes-et-interpretation>. Acesso em: 13 dez. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections**. Report to the UN Secretary-General. Geneva: WHO, 2020.

ANOTAÇÕES