UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos (MMRs)
para avaliação da potência de agentes antimicrobianos e suas
incertezas de medição

Alessandro Moraes Saviano

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos (MMRs)
para avaliação da potência de agentes antimicrobianos e suas
incertezas de medição

Alessandro Morais Saviano

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S263d Saviano, Alessandro Moraes
Desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para avaliação da potência de agentes antimicrobianos e suas incertezas de medição / Alessandro Moraes Saviano. - São Paulo, 2019. 133 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Lourenço, Felipe Rebello

1. Método Microbiológico Rápido. 2. Difusão em Ágar. 3. Incerteza de Medição. 4. Agentes Antimicrobianos. I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello, orientador.

Alessandro Moraes Saviano

Desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos (MMRs)
para avaliação da potência de agentes antimicrobianos e suas
incertezas de medição

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

- Código de Financiamento 001.

Processo nº 2016/04100-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e toda proteção, iluminação e orientação no meu caminho que possibilitou desenvolver meu aprendizado e capacidades na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais Nelson (em memória) e Núbia por todo amor, fé, paciência, confiança, compreensão e humildade e por todas as coisas boas e gratificantes que me ensinaram na minha vida.

Ao meu irmão Nelson e minha cunhada Cristina, pelo incentivo, apoio e força para atingir mais esse objetivo na minha vida profissional.

Ao professor Felipe Rebello Lourenço que acreditou em mim, oferecendo novamente a oportunidade da sua orientação, sempre ensinando e esclarecendo minhas dúvidas de forma simples, paciente e principalmente humilde.

A professora Irene Satiko Kikuchi, por seus conselhos sábios e ensinamentos valiosos, que incentivaram meu crescimento pessoal e profissional na área acadêmica.

As professoras Terezinha de Jesus Andreoli Pinto e Telma Mary Kaneko, pelo exemplo na área da docência farmacêutica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e também através do processo nº 2016/04100-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos funcionários do Confar, Cleide, Diane, Daniela, Elisabete e Rogério, que foram muito prestativos no auxílio dos ensaios que precisei realizar.

A todos professores, funcionários, colegas do laboratório e da pós-graduação da USP, pela amizade, apoio e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SAVIANO, A.M. Desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para avaliação da potência de agentes antimicrobianos e suas incertezas de medição. 2019. 133 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O método de difusão em ágar tem sido utilizado na avaliação da atividade antimicrobiana desde a descoberta da penicilina. Apesar disso, pouco avanço ocorreu no sentido de reduzir o tempo necessário para a determinação dos halos de inibição de crescimento. O objetivo deste projeto foi desenvolver, otimizar e validar métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para a avaliação da potência de agentes antimicrobianos, além de identificar, quantificar e avaliar as principais fontes de incerteza associadas à determinação da potência. O projeto foi dividido em quatro etapas: 1) influência da composição do meio de cultura na formação dos halos de inibição; 2) estudo da incerteza de medição associada à determinação da potência de agentes antimicrobianos; 3) desenvolvimento, otimização e validação de métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para determinação da potência de agentes antimicrobianos e 4) determinação dos parâmetros envolvidos na formação dos halos de inibição de crescimento e estudo dos mecanismos de difusão e crescimento microbiano. Os resultados deste projeto possibilitaram a redução do tempo necessário para a determinação do tamanho dos halos de inibição. Adicionalmente, contribuiu com a elucidação dos mecanismos de difusão e crescimento microbiano, possibilitando identificar e quantificar as principais fontes de incerteza de medição associadas à formação dos halos de inibição.

Palavras-chave:

Método microbiológico rápido, difusão em ágar, incerteza de medição, agentes antimicrobianos

ABSTRACT

SAVIANO, A.M. Development of rapid microbiological methods (RMMs) for evaluation of potency of antimicrobial agents and their measurement uncertainties. 2019. 133 p. Doctoral Thesis – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Agar diffusion method has been used in the evaluation of antimicrobial activity since the discovery of penicillin. Nevertheless, little progress has occurred in order to reduce the time required for the determination of growth inhibition zones. The goal of this project was to develop, optimize and validate rapid microbiological methods (RMMs) for evaluation of potency of antimicrobials, as well as to identify, quantify and assess the main sources of uncertainty associated with potency. The project was divided into four steps: 1) influence of culture medium composition on inhibition zones; 2) study of measurement uncertainty associated with antimicrobials potencies; 3) development, optimization and validation of rapid microbiological methods (RMMs) for the determination of antimicrobials potencies and 4) determination of the parameters involved in the formation of inhibition zones and study of mechanisms of diffusion and microbial growth. The results of this project allowed the reduction of the time required for the determination of inhibition zone sizes. Additionally, it contributed to the elucidation of the mechanisms of diffusion and microbial growth, making it possible to identify and quantify the main sources of measurement uncertainty associated with formation of inhibition zone sizes.

Keywords:

Rapid microbiological method, agar diffusion, measurement uncertainty, antimicrobial agents

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura básica das cefalosporinas. _____ 5
- Figura 2.** Esquema de distribuição das soluções padrão dos antimicrobianos beta-lactâmicos sobre a camada superficial inoculada no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar, onde P1 = 100µg/mL, P2 = 50µg/mL, P3 = 25µg/mL e P4 = 12,5µg/mL. _____ 16
- Figura 3.** Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de cefazolina (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2\text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$. _____ 21
- Figura 4.** Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de cefuroxima (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2\text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$. _____ 22
- Figura 5.** Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de ceftriaxona (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2\text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$. _____ 23
- Figura 6.** Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de cefepima (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2\text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$. _____ 24
- Figura 7.** Gráficos do tamanho médio dos halos de inibição dos antimicrobianos beta-lactâmicos nos ensaios microbiológico por difusão em ágar. _____ 27
- Figura 8.** Gráficos das principais fontes de incerteza dos antimicrobianos beta-lactâmicos nos ensaios microbiológico por difusão em ágar. _____ 29
- Figura 9.** Diagrama de causa e efeito dos principais fatores que influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento, no método de doseamento por difusão em ágar. _____ 32

Figura 10. Esquema da reação de redução do TTC pelas enzimas desidrogenases de células metabolicamente ativas e a consequente formação do TPF. _____ 33

Figura 11. Gráficos de superfície dos halos de inibição de crescimento em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co) e do tempo de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 42

Figura 12. Gráficos de superfície da intensidade dos halos de inibição de crescimento (I) em função da porcentagem de TTC e do período de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 45

Figura 13. Curvas resposta do padrão e da amostra simulada que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento, no doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos beta-lactâmicos, utilizando a solução TTC 0,3% em ágar a 1%. _____ 49

Figura 14. Halos de inibição de crescimento (mm) obtidos pelos métodos rápidos e pelos métodos tradicionais para os antimicrobianos beta-lactâmicos. Two-way ANOVA teste mostrou significantes diferenças entre doses (p-valor = 0,0391) e não significantes diferenças entre os métodos (p-valor = 0,7459). _____ 52

Figura 15. Halos de inibição de crescimento obtidos nos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% (vermelho) e pelos métodos tradicionais (amarelo) para os antimicrobianos beta-lactâmicos. _____ 53

Figura 16. Esquema de distribuição das soluções padrão dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina sobre a camada superficial inoculada nos ensaios de desenvolvimento e otimização dos MMRs com emprego de TTC. _____ 67

Figura 17. Esquema de distribuição das soluções padrão dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina sobre a camada superficial inoculada em um delineamento balanceado 3 x 3. _____ 68

Figura 18. Gráficos de superfície dos halos de inibição de crescimento em função da concentrações dos antimicrobianos (Co) e do período de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 74

Figura 19. Gráficos de superfície dos halos de inibição de crescimento em função da concentrações dos antimicrobianos (Co) e do inóculo (No) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 75

Figura 20. Gráficos de superfície da intensidade dos halos de inibição de crescimento (I) em função da porcentagem de TTC e do período de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar. _____ 78

Figura 21. Curvas resposta do padrão e da amostra simulada que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento, no doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina utilizando a solução TTC 0,3% em ágar a 1%. _____ 82

Figura 22. Halos de inibição de crescimento obtidos nos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% (vermelho) e pelos métodos tradicionais (amarelo) para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina. _____ 86

Figura 23. Esquema das diluições para o preparo das suspensões microbianas utilizadas nos ensaios para determinação UFC/mL na suspensão de 1% do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) no meio MHA. _____ 94

Figura 24. Esquema das diluições para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios para determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos. _____ 97

Figura 25. Esquema das diluições para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios para determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico da ceftriaxona e cefepima. _____ 98

Figura 26. Esquema de distribuição das concentrações das soluções padrão dos antimicrobianos sobre a camada superficial inoculada nos ensaios para a determinação da concentração crítica (C'). _____ 99

Figura 27. O esquema das diluições para o preparo das suspensões do inóculo utilizadas nos ensaios para determinação da população crítica (N') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos. _____ 101

Figura 28. Esquema de distribuição das concentrações fixas das soluções padrão dos antimicrobianos sobre a camada superficial inoculada nos ensaios para a determinação da população crítica (N') e do tempo crítico (T'). _____ 102

Figura 29. O esquema dos ensaios com diferentes tempos de pré-incubação utilizados para determinação do tempo crítico (T') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos. _____ 104

Figura 30. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento em função do logaritmo natural das concentrações iniciais dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) ($\ln Co$). _____ 106

Figura 31. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento em função do logaritmo natural das concentrações iniciais dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina ($\ln Co$). _____ 106

Figura 32. Média dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos, obtidos com uma concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, suspensão do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 1% e o tempo de pré-incubação em 0 hora. _____ 108

Figura 33. Gráfico das concentrações críticas (C') dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln Co$). _____ 109

Figura 34. Gráfico das concentrações críticas (C') dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln Co$). _____ 109

Figura 35. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), em função do logaritmo dos inóculos iniciais das suspensões do micro-organismo ($\log_2(N_0)$). _____ 111

Figura 36. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, em função do logaritmo dos inóculos iniciais das suspensões do micro-organismo ($\log_2(N_0)$)._____112

Figura 37. Gráfico das populações críticas (N') dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos dos inóculos iniciais dos antimicrobianos ($\log_2(N_0)$)._____114

Figura 38. Gráfico das populações críticas (N') dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos dos inóculos iniciais dos antimicrobianos ($\log_2(N_0)$)._____115

Figura 39. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), em função dos tempos de pré-incubação (h)._____117

Figura 40. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, em função dos tempos de pré-incubação (h)._____117

Figura 41. Gráfico dos tempos críticos (T') dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com seus respectivos tempos de pré-incubação (h)._____120

Figura 42. Gráfico dos tempos críticos (T') dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com seus respectivos tempos de pré-incubação (h)._____120

Figura 43. Gráfico dos principais parâmetros que mais influenciaram no tamanho dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos._____124

Figura 44. Gráfico de superfície do halos de inibição de crescimento em função do coeficiente de difusão (D) e da concentração crítica dos antimicrobiano (C')._____125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características estruturais e químicas das 4 gerações de cefalosporinas utilizadas no presente trabalho.	<u>12</u>
Tabela 2. Variação dos componentes do meio Mueller Hinton Ágar (MHA) utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.	<u>15</u>
Tabela 3. Equações de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co), da composição do meio de cultura MHA (casaminoácidos, extrato de carne e ágar), do inóculo do micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) (No) e do tempo de pré-incubação (h).	<u>17</u>
Tabela 4. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co), da composição do meio de cultura MHA, do inóculo do micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) (No) e do tempo de pré-incubação (h).	<u>18</u>
Tabela 5. Planejamento fatorial para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos.	<u>36</u>
Tabela 6. Equações de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h) e das concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co).	<u>41</u>
Tabela 7. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h) e das concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co).	<u>42</u>
Tabela 8. Equações de regressão da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos beta-lactâmicos.	<u>44</u>
Tabela 9. Análise de variância da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos beta-lactâmicos.	<u>44</u>

Tabela 10. Análise de variância dos dados obtidos nos ensaios rápidos dos antimicrobianos beta-lactâmicos no doseamento por difusão em ágar, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%)._____48

Tabela 11. Resumo dos resultados de validação dos ensaios rápidos dos antimicrobianos beta-lactâmicos no doseamento microbiológico por difusão em ágar._____49

Tabela 12. Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento (cm) dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% e dos métodos tradicionais para os antimicrobianos beta-lactâmicos._____52

Tabela 13. Características estruturais e químicas dos antimicrobianos utilizadas no desenvolvimento de MMRs utilizando TTC._____62

Tabela 14. Planejamento fatorial para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos aminoglicosídeo (gentamicina) e glicopeptídeo (vancomicina)._____65

Tabela 15. Planejamento fatorial para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico do antimicrobiano oxazolidinona (linezolida)._____66

Tabela 16. Condições otimizadas dos MMRs com emprego de TTC, para os antimicrobianos, gentamicina, linezolida e vancomicina._____70

Tabela 17. Equações de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e das concentrações dos antimicrobianos (Co)._____73

Tabela 18. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e das concentrações dos antimicrobianos (Co)._____73

Tabela 19. Equações de regressão da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos._____
_____76

Tabela 20. Análise de variância da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos._____
_____77

Tabela 21. Análise de variância dos dados obtidos nos ensaios rápidos dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina no doseamento por difusão em ágar, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%)._____81

Tabela 22. Resumo dos resultados de validação dos ensaios rápidos dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina no doseamento microbiológico por difusão em ágar.____83

Tabela 23. Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento (cm) dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% e dos métodos tradicionais para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina.____85

Tabela 24. Planejamento dos ensaios para determinação dos parâmetros críticos dos antimicrobianos nos métodos microbiológicos de difusão em ágar._____95

Tabela 25. Variação do tamanho dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos, obtidos, entre suspensão de 0,25 % e 2, 0% do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) com tempo de pré-incubação em 0 hora._____113

Tabela 26. Variação do tamanho dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos, obtidos, entre os tempo de pré-incubação de 0 e 3 horas e suspensão de 1,0% do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)._____118

Tabela 27. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração crítica (C'), população crítica (N'), tempo crítico (T') e coeficiente de difusão (D)._____124

LISTA DE ABREVIATURAS

7- ACA	Ácido 7-aminocefalosporânico
ANOVA	Análise de variância (<i>Analysis Of Variance</i>)
ATCC	Coleção de micro-organismos dos Estados Unidos (<i>American Type Culture Collection</i>)
DPR	Desvio Padrão Relativo
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido (<i>Extended spectrum beta-lactamases</i>)
FDA	Agência federal dos Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
IC	Intervalo de Confiança
IM	Intramuscular
ISO	Organização Internacional para Padronização (<i>International Organization for Standardization</i>)
IV	Intravenoso
MHA	Mueller Hinton Agar
MIC	Concentração Inibitória Mínima (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MMR	Métodos Microbiológicos Rápidos
MRA	Análise de Regressão Múltipla (<i>Multiple Regression Analysis</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina (<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>)
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAT	Tecnologia Analítica de Processos (<i>Process Analytical Technology</i>)
QbD	Qualidade por Design (<i>Quality by Design</i>)
SQT	Substância Química de Trabalho
TPF	Trifenilformazan (<i>Triphenylformazan</i>)

TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio (<i>Triphenyl Tetrazolium Chloride</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Vancomicina (<i>Vancomycin Resistent Staphylococcus aureus</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
------------	----

PARTE 1: Estimativa da incerteza de medição baseado em análise de regressão múltipla (MRA) e simulações de Monte Carlo

1. REVISÃO DE LITERATURA	05
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 Equipamentos	13
2.2 Reagentes	14
2.3 Desenvolvimento do método	14
2.4 Doseamento microbiológico	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4. CONCLUSÕES	30

PARTE 2: Métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para avaliação da atividade de beta-lactâmicos empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

1. REVISÃO DE LITERATURA	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Equipamentos	34
2.2 Reagentes	35
2.3 Desenvolvimento e otimização	36
2.4 Doseamento microbiológico com adição de solução de TTC	37
2.5 Validação dos métodos	38
2.6 Métodos tradicionais e com adição de TTC	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1 Ensaios de otimização	40
3.2 Ensaios de validação dos métodos	46
3.3 Comparação entre os métodos tradicionais e com adição de TTC	51
4. CONCLUSÕES	54

PARTE 3: Desenvolvimento e aplicação de métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para avaliação da atividade de outras classes de antimicrobianos empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

1. REVISÃO DE LITERATURA	56
2. MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.1 Equipamentos	63
2.2 Reagentes	64
2.3 Desenvolvimento e otimização dos MMRs	65
2.4 Doseamento microbiológico com adição de solução de TTC	68
2.5 Validação dos MMRs	70

2.6 Métodos tradicionais e com adição de TTC	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Ensaios de otimização dos MMRs	72
3.2 Ensaios de validação dos MMRs	80
3.3 Comparação entre os métodos tradicionais e com adição de TTC	84
4. CONCLUSÕES	87

PARTE 4: Determinação dos parâmetros críticos envolvidos na formação dos halos de inibição de crescimento no método microbiológico de difusão em ágar.

1. REVISÃO DE LITERATURA	89
2. MATERIAIS E MÉTODOS	91
2.1 Equipamentos	91
2.2 Reagentes	93
2.3 Determinação das UFC/mL no meio MHA	93
2.4 Determinação dos parâmetros críticos	95
2.5 Determinação da concentração crítica (C')	95
2.6 Determinação da população crítica (N')	99
2.7 Determinação do tempo crítico (T')	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
3.1 Ensaios de determinação UFC/mL	104
3.2 Ensaios de determinação da concentração crítica (C')	105
3.3 Ensaios de determinação da população crítica (N')	110
3.4 Ensaios de determinação do tempo crítico (T')	116
3.5 Ensaios de determinação do coeficiente de difusão (D)	122
3.6 Comparação entre os parâmetros C', N', T' e D dos antimicrobianos	123
4. CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

ANEXOS

Informações para os Membros da Banca julgadora de Doutorado

Currículo Lattes

Ficha do Aluno

INTRODUÇÃO

O uso crescente, e algumas vezes irracional, dos agentes antimicrobianos é um problema mundial, resultando no surgimento de cepas resistentes e na necessidade da descoberta de agentes antimicrobianos mais potentes (BRUNTON et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010; BUTTLER e COOPER, 2011). Como consequência desta situação, a determinação da potência de agentes antimicrobianos é uma etapa fundamental na avaliação da qualidade, eficácia terapêutica e segurança dos medicamentos contendo estas substâncias. Um tratamento efetivo é obtido quando a dose do agente antimicrobiano encontrado no órgão ou tecido infectado é superior à concentração mínima inibitória (MIC), o que está relacionado com os conceitos de sensibilidade e resistência microbiana (HEWITT, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, PINTO et al., 2014; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015).

O ensaio microbiológico para análise de agentes microbianos difere em relação a outros métodos pelo fato de que o primeiro permite avaliar a potência ou atividade antimicrobiana da substância ou produto, o que em muitos casos não pode ser determinado pelos métodos químicos. A determinação da potência de um agente antimicrobiano pode ser demonstrada, em condições apropriadas, por meio de seu efeito inibitório no crescimento microbiano. A variabilidade inerente aos métodos microbiológicos leva a necessidade de comparação da substância teste a substância química de referência com atividade antimicrobiana bem estabelecida, além da necessidade de emprego de planejamento experimental adequado (HEWITT, 2004; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, PINTO et al., 2014; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015). Os ensaios microbiológicos podem ser realizados empregando-se meios de cultura líquidos em tubos ou microplacas (ensaio turbidimétrico ou colorimétrico) ou meios de cultura sólidos em placas (difusão em ágar).

No método de difusão em ágar, dois fenômenos ocorrem simultaneamente: a) difusão do agente antimicrobiano; e b) crescimento microbiano. De acordo com a lei de difusão de Fick, a concentração do antimicrobiano (C) pode ser estimada como uma função da sua concentração inicial (C_0) no reservatório (cilindro, poço ou disco de papel), sua constante de difusão (D), tempo de difusão (T) e o quadrado da distância de difusão (x^2) (COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014). Simultaneamente, o crescimento microbiano ocorre como uma função da carga microbiana inicial (N_0), tempo de fase *lag* (L), velocidade de geração ou crescimento (G) e tempo de incubação (T). O

halo de inibição forma-se após um determinado tempo crítico (T'), em que o agente antimicrobiano atinge sua concentração crítica (C') e o crescimento microbiano resulta em carga microbiana crítica (N'). Desta forma, podemos relacionar o tamanho do halo de inibição em função da difusão e do crescimento microbiano (COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014).

Diversos autores estudaram os aspectos matemáticos envolvidos na formação dos halos de inibição de crescimento e obtiveram diferentes fórmulas que diferem devido as suas abordagens metodológicas. Cooper e Woodman descreveram a fórmula mais conhecida que considera a quantidade constante do agente antimicrobiano no reservatório ao longo do tempo, resultando em difusão linear. Vesterdal estudou a difusão radial obtida quando a quantidade de agente antimicrobiano no reservatório é bem definida e gradualmente reduzida ao longo do tempo. As duas fórmulas diferem apenas no que diz respeito à variação da concentração de agente antimicrobiano no reservatório. (LINTON, 1958; DRUGEON et al., 1987; CANNELL et al., 1988; LALPURIA et al., 2012)

Estudos demonstraram que os halos de inibição são definidos em tempo significativamente menor que aquele necessário para obter crescimento microbiano suficiente para determinação de seus tamanhos (YAMAMOTO e PINTO, 1996). Este fato por ser explicado em função das características de difusão do agente antimicrobiano (D) e de velocidade do crescimento microbiano (L e G). Diversos fatores, tais como composição e pH do meio de cultura, temperatura de incubação, tipo de diluente empregado, dentre outros, podem que afetar as características de difusão e/ou crescimento, e consequentemente o tempo crítico (T') necessário para a formação do halo de inibição (COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014). A otimização das condições analíticas descritas anteriormente pode resultar em redução significativa do tempo crítico. Este fato, aliado ao emprego de reagente de viabilidade celular, tais como os sais de tetrazólio, permitirá a determinação do tamanho dos halos de inibição em tempo reduzido (OHARA e SAITO, 1993; OHARA e SAITO, 1995; YAMAMOTO E PINTO, 1996; FRANCISCO et al., 2014; SAVIANO et al., 2015, FRANCISCO et al., 2016, GALVÃO et al., 2016).

Atualmente, a *Food and Drug Administration* (FDA) tem incentivado o uso das ferramentas como a Qualidade por *Design* (QbD – *Quality by Design*) e a Tecnologia Analítica de Processo (PAT – *Process Analytical Technology*) para introduzir inovações e benefícios aos produtos e processos farmacêuticos. A QbD é baseada no conceito de que a qualidade é assegurada pelo conhecimento do produto e/ou processo. PAT é um

sistema que visa o planejamento, análise e controle do processo por meio de medições rápidas dos parâmetros críticos de qualidade e desempenho (YU, 2008; LIONBERGER et al., 2008; HUANG et al., 2009; RATHORE, 2009; WU et al., 2011). O emprego dos conceitos de QbD e PAT no desenvolvimento de ensaios microbiológicos é interessante no contexto da avaliação dos parâmetros críticos de qualidade e desempenho dos agentes antimicrobianos. Adicionalmente, ao uso de análise estatística multivariada, análise de superfície resposta, dentre outras análises estatísticas, possibilitam entendimento profundo e abrangente dos parâmetros que afetam o ensaio microbiológico, permitindo otimização racional das condições experimentais (SAVIANO et al., 2014; FRANCISCO et al., 2014, SAVIANO et al., 2015).

A incerteza de medição é um parâmetro que, quando associado a uma medição, caracteriza a dispersão de valores que podem ser atribuídos ao resultado. É uma medida útil da avaliação da confiança dos resultados, uma vez que fornece informação que permite a tomada de decisão quanto à conformidade ou não dos produtos farmacêuticos (MUELLER, 2002; ISO/IEC 17025, 2005; DESIMONI e BRUNETTI, 2011; EURACHEM/CITAC, 2012). A incerteza de medição de um resultado pode surgir de muitas fontes, incluindo fatores como amostragem, efeitos da matriz e interferentes, condições ambientais, incerteza proveniente de balanças e equipamentos volumétricos, incerteza proveniente de equipamentos espectrofotométricos e cromatográficos, incertezas provenientes da resposta biológica e microbiológica, pureza de reagentes e substâncias químicas de referência, validação de métodos e erros aleatórios (NIEMI e NIEMELÄ, 2001; BRÜGGEMANN e WENNRICH, 2002; CHUI et al., 2002; LEITO et al., 2002; ANGLOV et al., 2003; WUNDERLI, 2003; LOURENÇO et al., 2004, LOURENÇO et al., 2005, SOOVÄLI et al., 2006; LOURENÇO et al., 2007, HSU e CHEN, 2010; LOURENÇO, 2012; LOURENÇO et al., 2012, WEITZEL, 2012; LOURENÇO, 2013; SAVIANO e LOURENÇO, 2013; GHISLENI et al., 2014; SAVIANO et al., 2015; OSTRONOFF e LOURENÇO, 2015).

Este projeto visou contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de difusão e crescimento microbiano envolvidos na definição do tamanho dos halos de inibição. Consequentemente, as condições experimentais, como a composição do meio de cultura, tempo de incubação, proporção do inóculo, dentre outras, foram otimizadas de forma racional, empregando os conceitos de QbD e ferramentas estatísticas adequadas. A otimização, aliada ao uso de sais de tetrazólio, resultou na redução do tempo necessário para a determinação do tamanho dos halos de inibição. Adicionalmente, foram

identificadas, quantificadas e aprimoradas as fontes de incerteza de medição associadas à formação dos halos de inibição.

O objetivo deste projeto foi desenvolver, otimizar e validar métodos microbiológicos rápidos para a avaliação da potência de agentes antimicrobianos de diferentes classes (beta-lactâmico/cefalosporínicos, aminoglicosídeos, macrolídeos e oxazolidinonas). Além disso, este trabalho buscou identificar, quantificar e avaliar as principais fontes de incerteza que contribuem com a incerteza final associada à determinação da potência de agentes antimicrobianos.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

PARTE 1: Estimativa da incerteza de medição baseado em análise de regressão múltipla (MRA) e simulações de Monte Carlo

1. REVISÃO DE LITERATURA

As cefalosporinas pertencem a classe dos antimicrobianos beta-lactâmicos, que se diferenciam das penicilinas devido a ligação do anel beta-lactâmico a um anel dihidrothiazina, com formação do núcleo, o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), que torna as cefalosporinas mais estáveis para muitas enzimas beta-lactamases bacterianas, conferindo maior espectro de atividade do que as penicilinas (MASOUD et al., 2014; KATZUNG et al., 2012, TAVARES, 2014).

A era das cefalosporinas, iniciou-se em 1945, quando o pesquisador italiano Giuseppe Brotzu isolou o fungo *Cephalosporium acremonium* e verificou que o mesmo produzia substâncias com propriedades antimicrobianas. Com uma amostra da cultura do fungo, o pesquisador britânico Sir Howard Florey, descobriu que dentre as várias substâncias antimicrobianas produzidas, a cefalosporina C, tinha um espectro de ação amplo e não era afetado pelas enzimas penicilinases, podendo ser um novo antimicrobiano. Pesquisas posteriores permitiram a descoberta do núcleo central 7-ACA, no qual possibilitou fazer as modificações nas cadeias laterais da cefalosporina C, gerando muitos derivados cefalosporínicos semissintéticos, dos quais alguns foram selecionados para o combate das infecções microbianas (TAVARES, 2014). Conforme a **Figura 1** a relação estrutura atividade das cefalosporinas, as diferenças dos substituintes em R1 alteram o espectro de atividade e o grau de estabilidade contra as betalactamases, enquanto que mudanças em R2 afetam a disposição farmacocinética e podem produzir toxicidade (KALMAN et al., 1990).

Figura 1. Estrutura básica das cefalosporinas.

A atividade natural intrínseca antimicrobiana das cefalosporinas é baixa, porém devido aos diferentes substituintes em suas estruturas, possibilitaram o desenvolvimento de novas gerações desse grupo de beta-lactâmico, que são compostos mais potentes e com mais baixa toxicidade (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008; KATZUNG et al., 2012, TAVARES, 2014).

As cefalosporinas são antimicrobianos bactericidas, utilizadas no combate das infecções bacterianas, e o seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio das enzimas transpeptidases responsáveis pela síntese da parede celular dos micro-organismos sensíveis e causando sua lise osmótica. Por isso apresenta uma baixa toxicidade direta devido atuar sobre a parede celular que não está presente nas células eucariotas (KALMAN et al., 1990; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008; SUÁREZ et al., 2009; KATZUNG et al., 2012; TAVARES, 2014; MASOUD et al., 2014).

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, é a produção de beta-lactamases, no qual essas enzimas hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, transformando o antimicrobiano em uma substância inativa, como no caso do anel beta-lactâmico das cefalosporinas, que ao sofrer hidrólise pelas betalactamases dão origem ao ácido cefalosporóico, que não tem atividade antibacteriana. A produção de beta-lactamases não só confere resistência ao micro-organismo produtor, como também interfere na sobrevivência de outros micro-organismos sensíveis ao beta-lactâmico, que se encontram presentes, em uma microbiota mista (KALMAN et al., 1990; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008; SUÁREZ et al., 2009, TAVARES, 2014).

As cefalosporinas de 1º geração têm atividade bactericida sobre bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, são resistentes às beta-lactamases estafilocócicas, porém são sensíveis as beta-lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas. A primeira geração das cefalosporinas inclui cefalotina e cefazolina (uso parenteral), cefalexina e cefadroxila (uso oral) e a cefradina (uso parenteral e oral) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, TAVARES, 2014).

A cefazolina, mostrada na **Tabela 1**, é a mais ativa contra bactérias Gram-positivas aeróbicas e são usadas para o tratamento de infecções de pele provocadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus*, todavia nas sucessivas gerações das cefalosporinas se perdeu parte dessa atividade, em benefício de uma maior ação contra as bactérias Gram-negativas. Apesar de sua ação contra *E. coli*, e alguma atividade contra *H. influenzae* e *Klebsiella*, esta primeira geração de cefalosporinas têm limitada ação

contra bactérias Gram-negativas, devido à resistência desenvolvida por esses micro-organismos, portanto não são indicadas como primeira linha de defesa para o tratamento de infecções graves provocadas por essas bactérias e foram substituídas pelas cefalosporinas de terceira e quarta geração (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, SUÁREZ et al., 2009, TAVARES, 2014, MASOUD et al., 2014).

No tratamento de infecções por estafilococos produtores de penicilinas, a cefazolina pode substituir a oxacilina (antimicrobiano pertencente ao grupo das penicilinas também resistentes a penicilinas), assim sendo pode ser utilizada no combate de infecções estafilocócicas graves adquiridas na comunidade, como a broncopneumonia, endocardite bacteriana, osteomielite aguda e sepse. Porém estafilococos resistentes à oxacilina (MRSA), também são resistentes as cefalosporinas de primeira geração, sendo necessário a utilização de outro antimicrobiano para o combate da infecção. A cefazolina é recomendada para uso profilático em vários tipos de cirurgia, como em vasculares, ortopédicas com implantação de próteses, cardíaca, cirurgias de estômago, duodeno e biliar de risco, urinária, entre outras (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, TAVARES, 2014).

A cefazolina sódica, pode ser administrada por via intramuscular (IM) porém é bastante dolorosa, sendo necessário a utilização da lidocaína (anestésico local), portanto é preferível utilizar a via intravenosa (IV), com isso difunde-se rapidamente no organismo, porém não consegue atravessar regularmente a barreira hematoencefálica. A cefazolina consegue atravessar a barreira placentária, atingindo altas concentrações, no sangue fetal e no líquido amniótico, porém pode ser utilizada com segurança na gravidez, não se conhece efeitos nocivos para o feto, além disso como apenas uma pequena quantidade passa para o leite materno, pode ser utilizada durante a amamentação, não causando mal para o lactente (TAVARES, 2014).

Como efeitos adversos, a cefazolina pode causar efeitos irritativos, pois no caso da administração via IM, causa dor e por administração via IV pode provocar flebites, devido a ação irritante no local da injeção. São possíveis os problemas de hipersensibilidade, como *rash* cutâneo (erupções cutâneas avermelhadas), eosinofilia (aumento da concentração de eosinófilos no sangue), febre, prurido e diarreia. Há a possibilidade de ocorrer reação alérgica cruzada, a pacientes alérgicos a penicilina. Devido as alterações na flora microbiana intestinal e respiratória, podem ocorrer o surgimento de superinfecções com o uso das cefalosporinas. A cefazolina é eliminada por

via renal, e sofre acúmulo nos pacientes com insuficiência renal de acordo com o seu grau de insuficiência renal (TAVARES, 2014; MASOUD et al., 2014).

A lista de medicamentos essenciais à saúde da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualizada a cada 2 anos, apresenta uma lista de necessidades mínimas dos medicamentos para o sistema básico de saúde, listando os mais eficazes, seguros e de baixo custo para condições prioritárias. A cefazolina faz parte do grupo de acesso de antimicrobianos da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS, que incluem os antimicrobianos, que tem atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos suscetíveis comumente encontrados, e também apresenta menor potencial de resistência do que antimicrobianos de outros grupos. O grupo de acesso são antimicrobianos recomendados empiricamente como 1ª ou 2ª escolha para o tratamento das infecções. (WHO, 2019).

A segunda geração de cefalosporinas apresentam um espectro de ação mais amplo do que a primeira geração das cefalosporinas, pois além da ação contra bactérias Gram-positivas, também são mais ativas contra bactérias Gram-negativas, como *Moraxella*, *Neisseria*, *Salmonella* e *Shigella*, devido a sua maior resistência às betalactameses produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Esses cefalosporínicos são usados para o tratamento de infecções no trato respiratório, por que são melhores contra cepas de betalactamases produzidas *H. influenzae*. Porém, essas cefalosporinas não são ativas contra a *Pseudomonas aeruginosa*. A segunda geração das cefalosporinas inclui o cefamandol e cefoxitina (uso parenteral), cefprozila, e cefaclor (oral) e cefuroxima (uso parenteral e oral) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, TAVARES, 2014, MASOUD et al., 2014).

A cefuroxima mostrada na **Tabela 1**, como apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, é indicada clinicamente para o tratamento de infecções provocadas por estreptococos, pneumococo, estafilococos sensíveis e resistentes à penicilina G, hemófilo e enterobactérias, porém essas últimas podem desenvolver resistência ao antimicrobiano. A cefuroxima é ativa contra a maioria das bactérias anaeróbias, mas não tem ação contra o *B. fragilis*. A administração parenteral da cefuroxima é utilizada para o tratamento de pneumonias, broncopneumonias, sepses, infecções urinárias por bacilos gram-negativos entéricos, colecistites, peritonites e osteomielites (TAVARES, 2014).

A cefuroxima sódica é utilizada para administração por via IM e IV, porém foi desenvolvido um pró-fármaco, o éster axetil cefuroxima, que é administrado por via oral,

sofrendo hidrólise pelas estearases presentes na parede intestinal e no fígado liberando a cefuroxima na corrente circulatória. A cefuroxima difunde-se no organismo, atingindo concentrações terapêuticas em vários órgãos e tecidos, porém não atinge a concentração terapêutica no liquor em pessoas com meninges normais. A cefuroxima consegue atravessar parcialmente a barreira placentária, e também é mínima sua presença no leite materno, podendo ser utilizada durante a amamentação (TAVARES, 2014).

A cefuroxima, administrada por via IM, provoca dor local de pequena intensidade, e quando administrada por via IV, pode causar flebite (inflamação na parede da veia), além disso pode ocorrer febre, erupções, eosinofilia e prurido de origem alérgica, e como também no caso de outros antimicrobianos existe o risco de superinfecção (TAVARES, 2014; MASOUD et al., 2014).

A cefuroxima faz parte do grupo de observação de antimicrobianos da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS, com maior potencial de resistência e inclui a maioria dos antimicrobianos de maior prioridade e importância crítica na medicina humana, e apresentam risco relativamente alto na seleção de resistência microbiana. Os antimicrobianos do grupo de observação são recomendados empiricamente como 1ª ou 2ª escolha para o tratamento de um número limitado de infecções específicas, e devem ser priorizados nos programas de administração e monitoramento dos antimicrobianos. (WHO, 2019).

A terceira geração de cefalosporinas inclui ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona, e ceftazidima (parenterais) e cefixima, cefpodoxima, cefdinir, cefditoreno e ceftibuteno (orais). A terceira geração de cefalosporinas são mais ativas contra bactérias Gram-negativas, como *Neisseria*, *M. catarrhalis* e *Klebsiella*, pois apresentam estabilidade contra as beta-lactamases não sendo inativas por essas enzimas produzidas pelas bactérias Gram-negativas, algumas cefalosporinas desse grupo, como a cefoperazona, e ceftazidima são ativas contra *Pseudomonas aeruginosa* constituindo as cefalosporinas antipseudomonas. Porém a terceira geração de cefalosporinas têm menor ação para Gram-positivas cocci, principalmente contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina do que as cefalosporinas da 1ª e 2ª geração. Essas cefalosporinas são mais usadas no tratamento de severas infecções adquiridas do trato respiratório, infecções resistentes e infecções nosocomiais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, TAVARES, 2014, MASOUD et al., 2014).

A ceftriaxona mostrada na **Tabela 1**, apresenta atividade contra pneumococos sensíveis e os com resistência intermediária à penicilina, e ativa contra o *Treponema*

pallidum e os gonococos, inclusive os produtores de penicilinase. A ceftriaxona se distribui pelos líquidos e tecidos orgânicos, e apresenta boa penetração no humor vítreo e na barreira placentária, atingindo a concentração terapêutica no feto e no líquido amniótico, passa em pequena quantidade no leite materno, porém pode ser utilizada com segurança durante o período de aleitamento materno. A ceftriaxona atravessa a barreira hematoencefálica atingindo concentrações líquóricas adequadas para o tratamento de meningites por meningococo, hemófilo, pneumococo e enterobactérias, porém a mesma não é suficiente para agir contra estafilococos e pneumococos que apresentam elevada resistência à penicilina (TAVARES, 2014).

A ceftriaxona sódica é indicada para o tratamento das meningoencefalites provocadas por bacilos Gram-negativos, como a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, em recém nascidos e latentes, e o *Haemophilus influenzae* em crianças na idade pré-escolar e idosos. A ceftriaxona também é indicada no tratamento de meningites causadas por meningococo e pneumococo que apresenta resistência intermediária à penicilina. A ceftriaxona é utilizada no tratamento nas infecções sistêmicas graves provocadas por bactérias Gram-negativas entéricas produtoras de beta-lactamases, como infecções urinárias, respiratórias (pneumonias), intra-abdominais comunitárias, além disso é indicada para o tratamento da gonorreia, febre tifoide, e em pacientes com sífilis que são alérgicos a penicilina (TAVARES, 2014).

Como reações adversas, a ceftriaxona, como as outras cefalosporinas, pode causar reação de hipersensibilidade, como rash (erupções cutâneas avermelhadas) e também superinfecção. A ceftriaxona administrada por via IM causa dor no local da injeção, portanto é administrada com um anestésico local a lindocaína, e administrada por via IV pode causar flebites (inflamação da parede dos vasos). Casos de diarreia pode ocorrer, mas de curta duração e pouca intensa. A metabolização da ceftriaxona ocorre nos tecidos, sendo eliminada como droga ativa nos rins (dois terços da dose) e na bile (um terço da dose), em razão disso a ceftriaxona pode sofrer precipitação, formando o sal ceftriaxonato de cálcio, na vesícula biliar, originando a formação de uma lama biliar ou pequenos cálculos. Em geral essas alterações são assintomáticas, porém pode ocorrer queixas de cólica biliar, náuseas e vômitos biliosos. Essa deposição na vesícula biliar é transitória e desaparece após a suspensão do medicamento. Para evitar a deposição biliar, em crianças recém-nascidas e lactentes é preferível utilizar a cefotaxima, que tem eliminação total por via renal (TAVARES, 2014; MASOUD et al., 2014).

A ceftriaxona também faz parte do grupo de observação de antimicrobianos da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS (WHO, 2019).

A quarta geração das cefalosporinas tem boa atividade tanto para infecções provocadas por bactérias Gram-positivas como também bastante ativas contra Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*. Devido ao grande espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e anaeróbicas essas cefalosporinas são usadas no tratamento de infecções intra-abdominais, infecções no trato respiratório e também infecções de pele. A quarta geração das cefalosporinas inclui a cefepima e cefpiroma (uso parenteral) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, MASOUD et al., 2014, TAVARES, 2014).

A cefepima mostrada na **Tabela 1**, é ativa contra bactérias Gram-positivas e também Gram-negativas, como *Neisseria meningitidis* e a *N. gonorrhoeae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém não tem ação sobre enterococos e estafilococos resistentes a meticilina e bactérias anaeróbicas do grupo do *B. fragilis*. (TAVARES, 2014).

A cefepima administrada por via IV, é indicada no tratamento de pacientes hospitalizados que apresentam infecções respiratórias, urinárias, ginecológicas e da pele e tecido subcutâneo provocadas por enterobactérias e *P. aeruginosa*. É utilizada também para o tratamento de processos infecciosos de alta gravidade, como endocardites (infecção do endocárdio) e sepses. A cefepima é recomendada para o tratamento de meningites, pois consegue atingir a concentração terapêutica no liquor em pacientes com a infecção, sendo ativa contra hemófilos, pneumococos, meningococos e *E. coli*. A eficácia terapêutica da cefepima depende do grau de resistência desenvolvido pelos micro-organismos Gram-negativos isolados no ambiente hospitalar (TAVARES, 2014).

Como efeitos adversos a cefepima administrada por via IV pode causar flebites (inflamação da parede dos vasos), além disso o uso da cefepima pode provocar desconforto gastrointestinal, diarreia, náuseas, tonteira, cefaleia e reações de hipersensibilidade. A cefepima pode causar neurotoxicidade em pacientes que tem insuficiência renal, pois é eliminada por via renal, sofrendo pouca metabolização, idosos e em pacientes com distúrbios neurológicos anteriores (TAVARES, 2014; MASOUD et al., 2014).

A cefepima é ativa sobre micro-organismos produtores de beta-lactamases, porém tem se observado que algumas bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella*, *Pseudomonas*,

Escherichia coli, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia*, podem apresentar resistência a esse antimicrobiano, através da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas da 3ª e 4ª geração, e acabam inativando a ação do antimicrobiano (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, TAVARES, 2014). A cefepima não faz parte da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS.

Tabela 1. Características estruturais e químicas das 4 gerações de cefalosporinas utilizadas no presente trabalho.

Substância (geração)	Estrutura química	Fórmula química e peso molecular	pKa	logP
Cefazolina (1ª geração)		$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$ 454,507 g/mol	3,03	- 0,58
Cefuroxima (2ª geração)		$C_{16}H_{16}N_4O_8S$ 424,385 g/mol	3,15	- 0,16
Ceftriaxona (3ª geração)		$C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$ 554,580 g/mol	3,19	- 1,7
Cefepima (4ª geração)		$C_{19}H_{24}N_6O_5S_2$ 480,561 g/mol	3,25	-0,37*

*Valor predito

Fonte: Adaptado de DrugBank 5.0. (WISHART et al., 2006).

Sabe-se que uma das limitações dos ensaios microbiológicos é em relação a baixa precisão, ou alta variabilidade quando comparados com os métodos físico-químicos (PINTO et al., 2014). Portanto, primeiramente o objetivo deste trabalho foi verificar como os componentes do meio de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA), a proporção do inóculo, as condições de pré-incubação e as concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos influenciam na formação dos halos de inibição de crescimento, com a finalidade de identificar e quantificar as principais fontes de incerteza do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

Uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) foi utilizada para pesar os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos, cefazolina sódica, cefuroxima sódica, ceftriaxona dissódica e o cloridrato de cefepima.

Pipetas volumétricas de 5 mL (Uniglas), balões volumétricos de 10 mL, (Plena-Lab, Vidrolabor e Laborglass) e micropipeta automática com faixa de trabalho de 100 a 1000 μ L, (Surepette) foram utilizados para fazer as soluções nas quatro concentrações (12,5, 25, 50 e 100 μ g/mL) de cada antimicrobiano beta-lactâmico utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Os componentes do meio de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) foram pesados em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H) para a formação das diferentes proporções do meio original, os quais foram esterilizados por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O medidor de pH (Gehaka PG1800) foi utilizado no preparo da solução tampão fosfato de pH 6,0 $\pm$ 0,1 (2,0 g de fosfato de potássio dibásico e 8,0 g de fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água ionizada, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), sendo que mesma foi esterilizada por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O espectrofotômetro (Unicam, Helios Epsilon) trabalhando no comprimento de onda de 580 nm, foi utilizado para medir a transmitância da suspensão microbiana em 25 $\pm$ 1%.

Tubos de ensaios graduados estéreis e apirogênicos de 14 mL (BD Falcon) foram utilizados para o preparo dos inóculos das suspensões microbiológicas. Pipetas graduadas estéreis e apirogênicas de 25 mL e 5 mL (BD Falcon) foram utilizadas para preparar as camadas basal e superficial, respectivamente, nos ensaios de doseamento microbiológicos.

Os meios de cultura MHA estéreis foram mantidos em equipamento de banho maria digital (SPLabor Modelo SP-12/100ED) em temperatura de 50 ± 1 °C até os mesmos serem inoculados com o micro-organismo para a formação da camada superficial inoculada em placa de Petri (90 X 15 mm esterilizada por raio gama).

Os discos brancos esterilizados por autoclavação (Laborclin) de diâmetro de 6 mm foram utilizados para impregnar as diferentes concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

As placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) durante os períodos de pré-incubação de cada ensaio e pelo período de incubação de 18 a 24 horas. Os halos de inibição formados foram medidos através do leitor de halos com uma exatidão de 0,1 mm (IUL, Haloes Caliper).

2.2. Reagentes

Os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos, cefazolina sódica (lote: 205040C), cefuroxima sódica (lote: 104966C), ceftriaxona dissódica (lote: 204881C) e o cloridrato de cefepima (lote: 105065C) foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Antibiótico do Brasil LTDA.

As cepas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizadas como reagentes biológico foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz.

Os componentes do meio de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) (casaminoácidos 17,5 g/L, extrato de carne 2,0 g/L, ágar 17,0 g/L e amido 1,5 g/L) utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico, foram adquiridos da BD/Difco.

2.3. Desenvolvimento do método

Para o desenvolvimento do método de doseamento microbiológico foi utilizada uma análise de regressão linear múltipla na qual trabalhou-se com 4 variáveis: a concentração de cada antimicrobiano beta-lactâmico (12,5, 25, 50 e 100 µg/mL), a

suspensão do inóculo (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 %), o tempo de pré-incubação (0, 2, 4 e 6 horas) e a variação dos componentes do meio Mueller Hinton Ágar (MHA) (casaminoácidos, extrato de carne e ágar).

2.4. Doseamento microbiológico

Foi pesado $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano beta-lactâmico, transferido para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com solução tampão estéril $\text{pH} = 6,0 \pm 0,1$ para se obter a solução química de trabalho (SQT) de concentração de $1.000 \mu\text{g/mL}$. Foram realizadas, a partir dessa solução, diluições sucessivas para se obter as soluções de concentração de 100, 50, 25 e $12,5 \mu\text{g/mL}$ utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico.

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Esta suspensão foi diluída até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA), tanto utilizados na camada basal como na camada superficial, foram preparados com diferentes proporções dos seguintes componentes: casaminoácidos, extrato de carne e ágar, sendo que a concentração de amido foi mantida constante. As proporções dos componentes do meio variaram em -50% (-1) e +50% (+1), conforme mostrado na **Tabela 2**. Todos os meios tiveram seus pH ajustados para 7,2 a 7,3 com solução de NaOH 0,1M ou HCl 0,1 M conforme o pH do meio padrão comercial.

Tabela 2. Variação dos componentes do meio Mueller Hinton Ágar (MHA) utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Meio de Cultura	Casaminoácidos (g/L)	Extrato de carne (g/L)	Ágar (g/L)	Amido (g/L)
MHA(m0)	17,50 (0)	2,0 (0)	17,0 (0)	1,5 (0)
MHA(m1)	8,75 (-1)	1,0 (-1)	8,5 (-1)	1,5 (0)
MHA(m2)	8,75 (-1)	1,0 (-1)	25,5 (+1)	1,5 (0)
MHA(m3)	8,75 (-1)	3,0 (+1)	8,5 (-1)	1,5 (0)
MHA(m4)	26,25 (+1)	1,0 (-1)	8,5 (-1)	1,5 (0)
MHA(m5)	26,25 (+1)	3,0 (+1)	25,5 (+1)	1,5 (0)

Uma porção de 100 mL de meio de cultura MHA estéril foi inoculada com alíquotas apropriadas da suspensão microbiana e homogeneizada para se obter os inóculos de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 %. Alíquotas de 5 mL do meio inoculado foram transferidas para as placas de Petri para a preparação da camada superficial.

Após a solidificação da camada superficial, colocaram-se os discos de papel estéreis com as soluções dos antimicrobianos correspondentes sobre a camada superficial para o tempo de 0 hora. Para os ensaios que houve um período de pré-incubação os discos com as soluções dos antimicrobianos foram colocadas após 2, 4 e 6 horas respectivamente, conforme esquema mostrado na **Figura 2**.

Figura 2. Esquema de distribuição das soluções padrão dos antimicrobianos beta-lactâmicos sobre a camada superficial inoculada no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar, onde P1 = 100µg/mL, P2 = 50µg/mL, P3 = 25µg/mL e P4 = 12,5µg/mL.

As placas foram colocadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de incubação das placas, procedeu-se à medição da zona de inibição de crescimento em cada uma das placas, utilizando o leitor de halos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios obtidos na análise de regressão linear múltipla foram analisados estatisticamente através do software Minitab® 17, tendo sido obtidas as equações de regressão (**Tabela 3**) e análise de variância (**Tabela 4**) dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co), da composição do meio de cultura Muller Hinton Agar (casaminoácidos, extrato de carne e ágar), do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (No) e do tempo de pré-incubação (h).

Tabela 3. Equações de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co), da composição do meio de cultura MHA (casaminoácidos, extrato de carne e ágar), do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (No) e do tempo de pré-incubação (h).

Substância	Equação de regressão	R ²	*R ² (aj.)	**R ² (pred.)
Cefazolina	Halos = 32,13 – 0,1724 casaminoácidos + 1,536 extrato de carne – 0,001 ágar + 1,281 ln(Co) – 1,032 log ₂ (No) – 3,368 h – 0,01125 ágar * ágar + 0,411 ln(Co) * ln(Co) + 0,0238 h*h + 0,0840 casaminoácidos * ln(Co) – 0,464 extrato de carne* ln(Co) + 0,0697 extrato de carne* h + 0,01373 ágar* log ₂ (No) + 0,1898 ln(Co) * h + 0,0768 log ₂ (No)*h	95,90%	95,69%	95,46%
Cefuroxima	Halos = 89,0 + 0,726 casaminoácidos + 1,82 extrato de carne + 1,337 ágar + 3,728 ln(Co) – 7,67 log ₂ (No) + 3,586 h + 0,1897 log ₂ (No) * log ₂ (No) – 0,1997 h*h + 0,3273 casaminoácidos * extrato de carne – 0,0481 casaminoácidos * log ₂ (No) – 0,190 extrato de carne * log ₂ (No) – 0,0658 ágar* log ₂ (No) – 0,4076 ln(Co) * h – 0,1489 log ₂ (No)*h	92,71%	92,31%	91,66%
Ceftriaxona	Halos = 94,6 + 1,147 casaminoácidos + 0,035 extrato de carne – 0,434 ágar + 6,75 ln(Co) – 8,21 log ₂ (No) – 0,579 h – 0,02642 casaminoácidos * casaminoácidos + 0,1781 log ₂ (No) * log ₂ (No) – 0,0434 h*h + 0,00391 casaminoácidos * ágar – 0,01065 casaminoácidos* log ₂ (No) + 0,01259 ágar* log ₂ (No) + 0,01683 ágar * h – 0,1427 ln (Co) * log ₂ (No) – 0,2085 ln(Co) * h	91,20%	90,83%	90,42%
Cefepima	Halos = 28,20 – 0,202 casaminoácidos – 0,154 extrato de carne – 0,310 ágar + 2,309 ln(Co) – 1,049 log ₂ (No) – 1,238 h + 0,269 ln(Co) * ln(Co) – 0,0223 h*h + 0,01032 casaminoácidos * log ₂ (No) + 0,0903 extrato de carne* h – 0,02340 ágar* ln (Co) + 0,01125 ágar* log ₂ (No) + 0,00921 ágar*h – 0,2581 ln(Co) * h + 0,0478 log ₂ (No)*h	94,35%	94,05%	93,70%

*R²(aj.) = R² ajustado, **R²(pred.) = R² predito

Tabela 4. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co), da composição do meio de cultura MHA, do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (No) e do tempo de pré-incubação (h).

Fontes	Cefazolina			Cefuroxima			Ceftriaxona			Cefepima		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Casaminoácidos	1	17,77	0,000	1	14,10	0,010	1	60,12	0,000	1	1,81	0,097
Extrato de carne	1	13,51	0,000	1	1,16	0,459	1	0,14	0,754	1	0,88	0,245
Ágar	1	0,00	0,997	1	45,24	0,000	1	9,74	0,010	1	3,80	0,016
ln(Co)	1	2,24	0,144	1	873,08	0,000	1	24,98	0,000	1	6,58	0,002
log ₂ (No)	1	54,65	0,000	1	7,78	0,056	1	12,44	0,004	1	31,01	0,000
h	1	41,70	0,000	1	30,11	0,000	1	15,91	0,001	1	4,74	0,007
Casaminoácidos * Casaminoácidos	-	-	-	-	-	-	1	207,94	0,000	-	-	-
Extrato de carne * Extrato de carne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ágar * Ágar	1	28,17	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ln(Co) * ln(Co)	1	12,48	0,001	-	-	-	-	-	-	1	4,69	0,008
log ₂ (No) * log ₂ (No)	-	-	-	1	9,56	0,035	1	11,76	0,005	-	-	-
h * h	1	-	-	1	118,74	0,000	1	10,99	0,006	1	2,23	0,065
Casaminoácidos * Extrato de carne	-	-	-	1	222,42	0,000	-	-	-	-	-	-
Casaminoácidos * Ágar	-	-	-	-	-	-	1	10,13	0,009	-	-	-
Casaminoácidos * ln(Co)	1	57,15	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casaminoácidos * log ₂ (No)	-	-	-	1	31,28	0,000	1	3,15	0,143	1	2,35	0,059
Casaminoácidos * h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato de carne * Ágar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato de carne * ln(Co)	1	18,20	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato de carne * log ₂ (No)	-	-	-	1	6,41	0,083	-	-	-	-	-	-
Extrato de carne * h	1	4,98	0,030	-	-	-	-	-	-	1	5,08	0,006
Ágar * ln(Co)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,07	0,006
Ágar * log ₂ (No)	1	4,36	0,042	1	54,47	0,000	1	4,17	0,092	1	2,62	0,046
Ágar * h	-	-	-	-	-	-	1	29,34	0,000	1	4,49	0,009
ln(Co) * log ₂ (No)	-	-	-	-	-	-	1	5,60	0,051	-	-	-
ln(Co) * h	1	34,61	0,000	1	91,32	0,000	1	44,35	0,000	1	46,04	0,000
log ₂ (No) * h	1	11,80	0,001	1	27,52	0,000	-	-	-	1	3,89	0,015

Com os resultados obtidos através dos modelos matemáticos da sua análise estatística foram construídos os gráficos de doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos beta-lactâmicos, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima (**Figuras 3, 4, 5 e 6**), que mostraram que os tamanhos dos halos de inibição apresentaram resposta linear em função do logaritmo natural ($\ln$) das concentrações dos antimicrobianos para a faixa estudada.

O aumento dos tempos de pré-incubação ($h = 0h, 2h, 4h$ ou $6h$) proporcionaram menores halos de inibição de crescimento, pois houve um período de crescimento microbiano sem que ocorresse difusão do antimicrobiano. Da mesma forma um aumento no inóculo do micro-organismo também proporcionou menor halo de inibição de crescimento.

Com o aumento da concentração do ágar no meio de cultura, foram obtidos menores halos de inibição de crescimento quando comparados aos obtidos utilizando meio padrão. Este fato pode ser explicado devido a quantidade de ágar ter dificultado o fenômeno de difusão do antimicrobiano, sem ter porém afetado o crescimento microbiano. Isso, conseqüentemente, reduz o tamanho do halo de inibição de crescimento formado.

No caso dos componentes casaminoácidos e extrato de carne, presentes na composição do meio de cultura MHA, que são importantes fontes de nutrientes para o crescimento microbiológico, verificamos que os mesmos têm pouca influência no tamanho do halo de inibição de crescimento para a cefazolina e a cefepima, porém os mesmos tiveram grande influência para cefuroxima. Nesse caso, verificou-se que o aumento da concentração desses componentes do meio, provoca aumento do halo de inibição de crescimento (**Figura 4**). Para ceftriaxona, o extrato de carne tem pouca influência no tamanho do halo de inibição de crescimento. Em contrapartida, o aumento da concentração de casaminoácidos de nível baixo para intermediário resultou em aumento do tamanho do halo de inibição. Entretanto, o aumento da concentração de casaminoácidos de nível intermediário para alto resultou em diminuição do halo de inibição. Este fenômeno pode ser verificado pela curvatura do gráfico (**Figura 5**).

O ensaio de doseamento microbiológico por difusão em ágar se baseia em dois fenômenos que acontecem simultaneamente: a) a difusão do antimicrobiano e b) o crescimento microbiano. Alterações nas condições do ensaio que influenciem a difusão e/ou o crescimento microbiano irão afetar os tamanhos dos halos. Vale ressaltar que o micro-organismo utilizado, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), é o mesmo em todos

os ensaios. Portanto, o crescimento foi, teoricamente, afetado da mesma forma para os quatro antimicrobianos, quando consideramos a variação das fontes de nutrientes (casaminoácidos e extrato de carne). Desta forma, as diferentes propriedades físico-químicas dos antimicrobianos e as alterações de composição do meio afetam a difusão dos quatro antimicrobianos de forma diferente. Isso nos permite fazer algumas observações a respeito dos resultados. No caso da cefazolina e da cefepima, com o aumento do casaminoácidos e do extrato de carne, tivemos ambos fenômenos (difusão e crescimento microbiano) sendo influenciados, de forma que os tamanhos dos halos não foram afetados. No caso da cefuroxima, podemos notar maior influência na difusão do antimicrobiano quando comparado ao crescimento microbiano, resultando, portanto, no aumento do tamanho do halo de inibição. Já no caso da ceftriaxona, a difusão foi inicialmente mais influenciada do que o crescimento, resultado em aumento do tamanho do halo de inibição. Num segundo momento, o crescimento sofreu maior influência, resultando na diminuição do tamanho do halo.

Figura 3. Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de cefazolina (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2 \text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$.

Figura 4. Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de cefuroxima (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2 \text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$.

Figura 5. Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de ceftriaxona (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2 \text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$.

Figura 6. Gráficos que relacionam o tamanho do halo de inibição de crescimento e a concentração das amostras de cefepima (Co) com a composição do meio de cultura, o inóculo (No) e o tempo de pré-incubação (h). Níveis fixos: casaminoácidos = 17,5%, extrato de carne = 2,0%, ágar = 17,0%, $\log_2\text{No} = 1\%$ e $h = 0\text{h}$.

Como foi visto anteriormente, a análise de regressão linear múltipla permitiu determinar quais parâmetros tem maior influência na formação do halo de inibição de crescimento. A partir disso foi obtido com a análise estatística dos resultados um modelo matemático (equações de regressão apresentados na **Tabela 3**) para cada antimicrobiano beta-lactâmico, no qual relaciona os fatores estudados (composição do meio, inóculo, concentração dos antimicrobianos e tempo de pré-incubação) com sua maior ou menor influência no tamanho do halo de inibição de crescimento no método de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Os modelos matemáticos foram utilizados para as simulações de Monte Carlo, um dos métodos adotados tanto pela ISO 17025 como pela Eurochem para a determinação da incerteza (EUROCHEM, 2012; ISO/IEC 17025, 2005). As simulações de Monte Carlo trabalham como uma poderosa ferramenta estatística que serve para simular problemas que podem ser representados por processos estocásticos, isto é, que são indeterminados pois dependem ou resultam de eventos aleatórios. Devido as suas simulações estarem baseadas em eventos aleatórios, análogo ao que ocorre em um lançamento de dados, levou os criadores desse método, Ulam e Von Neumann o chamarem de Monte Carlo, que é famosa por seus cassinos e jogos de azar. Atualmente a simulação de Monte Carlo é aplicada nos mais diversos campos da ciência pois possibilita o estudo de um determinado fenômeno que é difícil de se quantificar, gerando um grande número de dados e portanto pode ser tratado como uma distribuição aleatória de números. (BARAT et al., 2006; YORIYAZ, 2009).

A simulação de Monte Carlo pode ser considerada como um método estatístico pois se baseia na geração de dados aleatórios que serão usados em um procedimento de amostragem. O princípio da simulação de Monte Carlo utiliza um gerador de números aleatórios para a amostragem dos vários fenômenos que ocorrem nos processos em estudo. Essas amostragens são feitas através das distribuições de probabilidades conhecidas, com isso obtêm valores médios que gerarão os resultados obtidos pelo método. A medida que o número de amostras aleatórias aumenta, melhora-se a qualidade média do sistema, pela diminuição das incertezas estatísticas das grandezas de interesse (BARAT et al., 2006; YORIYAZ, 2009).

Com o uso do software estatístico Minitab 17, foi realizada a simulação de Monte Carlo, com a geração de 10.000 valores aleatórios dos fatores de entrada (concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co), composição do meio de cultura Muller Hinton Agar (casaminoácidos, extrato de carne e ágar), da quantidade de micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (No) e o tempo de pré-incubação (h)), pelos quais foram calculados os tamanho dos halos de inibição de crescimento com base nos modelos de regressão anteriormente estabelecidos. Os tamanhos dos halos de inibição obtidos pelas simulações de Monte Carlo foram: para cefazolina, o valor médio dos halos de inibição de crescimento foi de 21,0 mm, com um desvio padrão de 0,85 e incerteza expandida (U) de 1,69; para a cefuroxima, o valor médio dos halos de inibição de crescimento foi de 20,0 mm, com um desvio padrão de 1,73 e incerteza expandida (U) de 3,46; para a ceftriaxona, o valor médio dos halos de inibição de crescimento foi de 18,0

mm, com um desvio padrão de 0,72 e incerteza expandida (U) de 1,44; e para a cefepima, o valor médio dos halos de inibição de crescimento foi de 19,2 mm, com um desvio padrão de 0,77 e incerteza expandida (U) de 1,54; conforme mostrado na **Figura 7**.

Os resultados dos tamanhos dos halos obtidos nas simulações de Monte Carlo podem ser justificados em função do espectro de ação das cefalosporinas. Cefazolina e cefuroxima são cefalosporinas de 1^a e 2^a geração, respectivamente, tem maior espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, e são clinicamente usadas como tratamento de primeira linha para infecções de pele, principalmente causadas por *Staphylococcus aureus*. Já no caso da ceftriaxona, cefalosporina de 3^a geração, essa tem uma cobertura menor para as Gram-positivas, quando comparadas com as cefalosporinas de 1^a e a 2^a geração, e uma maior cobertura para as bactérias Gram-negativas. A cefepima, cefalosporina de 4^a geração, tem boa atividade contra Gram-positivas e Gram-negativas (MASOUD et al., 2014; KATZUNG et al., 2012).

Figura 7. Gráficos do tamanho médio dos halos de inibição dos antimicrobianos beta-lactâmicos nos ensaios microbiológico por difusão em ágar.

Recentemente, estudos identificaram as principais fontes de incerteza de medição associadas à determinação da potência de agentes antimicrobianos empregando métodos de difusão em ágar (LOURENÇO et al., 2007; LOURENÇO, 2013; GHISLENI et al., 2014; SAVIANO et al., 2014; SAVIANO et al., 2015). Diversas fontes de incerteza foram identificadas e quantificadas, tais como aquelas relacionadas à potência/pureza da substância química de referência, incerteza associada aos aparatos de volume (balões e pipetas volumétricas) e massa (balança), além da própria variabilidade do tamanho dos halos de inibição (entre e dentre as placas). A variabilidade do tamanho dos halos de inibição foi a mais significativa para diferentes agentes antimicrobianos, contribuindo com aproximadamente 95% da incerteza total (LOURENÇO et al., 2007; LOURENÇO, 2013; GHISLENI et al., 2014; SAVIANO et al., 2014; SAVIANO et al., 2015).

As fontes de incertezas relacionadas com o tamanho do halo de inibição de crescimento estudadas neste trabalho foram os componentes do meio de cultura MHA (extrato de carne, casaminoácidos e ágar), as porcentagens do inóculo do micro-organismo ($\log_2 N_0$) e os tempos de pré-incubação (h) para diferentes concentrações dos antimicrobianos ($\ln(C_0)$).

De acordo com a **Figura 8**, para os antimicrobianos beta-lactâmicos, a porcentagem do inóculo do micro-organismo ($\log_2 N_0$) foi a fonte que mais colaborou com a incerteza (de 67,5% a 87,6%). No caso da cefuroxima, as concentrações de extrato de carne e de casaminoácidos foram as fontes que colaboraram com 28,7% da incerteza total, sendo que observou-se grande influência dessas fontes de nutrientes no tamanho do halo de inibição, conforme mostrado na **Figura 4**.

Como a incerteza atesta a qualidade do resultado de um medicamento estar dentro das suas especificações, é importante que a mesma seja baixa, conferindo portanto um resultado confiável ao produto farmacêutico. Como foi determinado pelo estudo, a maior parte da incerteza advém do inóculo, é extremamente importante tentar controlar essa fonte de variação, seja através do ajuste mais preciso da sua suspensão, como por exemplo uma menor variação da sua transmitância, que no caso adotado foi de $25 \pm 1 \%$, para uma variação de até $\pm 0,5\%$, como também em todas as etapas críticas desde a semeadura no inóculo em *stent* até a inoculação da suspensão microbiana no meio de cultura estéril responsável pela formação da camada superior inoculada.

Figura 8. Gráficos das principais fontes de incerteza dos antimicrobianos beta-lactâmicos nos ensaios microbiológico por difusão em ágar.

4. CONCLUSÕES

Através de uma regressão linear múltipla e análise estatística dos resultados obtidos foi possível obter um modelo matemático para cada antimicrobiano beta-lactâmico utilizado nesse estudo. Os tamanhos dos halos de inibição apresentaram resposta linear em função do logaritmo natural ($\ln$) das concentrações dos antimicrobianos para a faixa estudada. Os parâmetros inóculo, tempo de pré-incubação e concentração de ágar no meio de cultura tiveram relação inversamente proporcional ao tamanho do halo de inibição de crescimento. A variação das fontes de nutrientes do meio MHA tiveram ora influenciando tanto no crescimento microbiano como na difusão dos antimicrobianos, ora tendo uma maior influência da difusão do antimicrobiano beta-lactâmico sobre o crescimento microbiano.

Conforme estudos anteriores observou-se que a maior parte da incerteza nos ensaios microbiológicos por difusão em ágar advém do tamanho dos halos de inibição de crescimento. A partir do modelo matemático foi realizada a simulação de Monte Carlo, um dos métodos contemplados pela ISO e EUROCHEM para determinação da incerteza, no qual foi verificado que a suspensão do inóculo do micro-organismo ($\log_2 N_0$) foi a fonte que mais colaborou com a incerteza (de 67,5% a 87,6%). Portanto, é de grande importância fazer um controle maior em todas as etapas críticas desse parâmetro, para possibilitar que a incerteza assuma valores baixos, e com isso garanta a qualidade, a segurança e eficácia dos medicamentos.

PARTE 2: Métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para avaliação da atividade de beta-lactâmicos empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

1. REVISÃO DE LITERATURA

Quando Alexander Fleming estava trabalhando no Hospital de St. Mary (Londres) em 1928, observou a inibição de crescimento de uma cepa de *Staphylococcus* que fora contaminada acidentalmente por fungos do gênero *Penicillium*, então o mesmo foi isolado e cultivado em um caldo nutritivo, e posteriormente verificou-se a presença de uma substância antimicrobiana produzida pelos fungos. Esta descoberta foi a base para o desenvolvimento do primeiro antimicrobiano beta-lactâmico, a penicilina, que foi introduzida como agente terapêutico a partir dos anos 1940, dando início a era dos antimicrobianos (SATO, 2002, JUNIOR, 2006, RANG et. al, 2012). Desde então, houve um grande avanço científico para a saúde humana, pois possibilitou o tratamento de graves infecções bacterianas, além de incentivar pesquisas para a busca de novos antimicrobianos nas décadas seguintes (GUIMARÃES et al., 2010, BUTTER e COOPER, 2011).

A avaliação da eficácia terapêutica dos medicamentos antimicrobianos é feita através da determinação da sua potência que é obtida pelos métodos microbiológicos, em meio de cultura líquido (ensaios turbidimétricos) ou em meio sólido (ensaios de difusão em ágar). O método de doseamento microbiológico por difusão em ágar baseia-se em dois fenômenos que ocorrem simultaneamente: 1) o crescimento microbiano no meio de cultura; e 2) a difusão do antimicrobiano, que inibi esse crescimento. Com o passar do tempo de incubação, irá formar-se o halo de inibição de crescimento, no momento em que o crescimento microbiano atingi a população crítica, delimitada pela difusão do antimicrobiano (GAVIN, 1956, GAVIN, 1957, COOPER, 1963, HEWITT, 1977, PINTO et. al., 2014, BALOUIRI, 2016).

Conforme o diagrama de causa e efeito mostrado na **Figura 9**, muitos fatores podem influenciar na difusão do antimicrobiano e no crescimento microbiano e portanto no tamanho do halo de inibição de crescimento, como o antimicrobiano utilizado e suas concentrações, a sensibilidade do micro-organismo e sua porcentagem da suspensão do inóculo, a composição, pH e volume do meio de cultura utilizado no ensaio, as condições experimentais como o período de pré-incubação, o período de pré-difusão, o tempo e a

temperatura de incubação (GAVIN, 1956, GAVIN, 1957, COOPER, 1963, HEWITT, 1977, PINTO et. al., 2014, SAVIANO et al., 2014, BALOUIRI, 2016, SAVIANO e LOURENCO, 2018). Portanto qualquer mudança em um desses fatores, pode ser decisivo para determinar se o ensaio experimental atendeu as expectativas esperadas durante o seu planejamento e com isso comprovar a eficácia terapêutica de um antimicrobiano no método microbiológico de doseamento por difusão em ágar.

Figura 9. Diagrama de causa e efeito dos principais fatores que influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento, no método de doseamento por difusão em ágar.

Apesar do método microbiológico de difusão em ágar ser bastante consolidado, ele apresenta como limitação o seu tempo de incubação, usualmente de 18 a 24 horas, para que os halos de inibição possam ser lidos e, assim, determinar a eficácia e potência do antimicrobiano. Uma das alternativas para diminuir o tempo de incubação, sem comprometer os resultados finais desse método pode ser a utilização de indicadores de viabilidade celular, como por exemplo os sais de tetrazólio.

O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) ($C_{19}H_{15}ClN_4$), peso molecular de 334,80 g/mol, é um pó branco cristalino solúvel em água que sofre uma reação irreversível de redução através das enzimas desidrogenases presentes em células metabolicamente ativas (procariontes e eucariontes), formando o precipitado 1,3,5 – trifeniltetrazólio formazan, (TPF) ($C_{19}H_{16}N_4$), peso molecular de 300,36 g/mol, de

coloração intensa avermelhada (BELOTI et al., 1999, KUMAR e TARAFDAR, 2003, AL-ARAJI et al., 2015, SHAWALI e SAMY, 2015, KIM et al., 2016). A **Figura 10** mostra a redução do TTC, no qual há a abertura do anel heterocíclico e a formação da cadeia característica (N=N-C=N-NH) do TPF (BELOTI et al., 1999, KUMAR e TARAFDAR, 2003, AL-ARAJI et al., 2015, SHAWALI e SAMY, 2015).

O sistema tetrazólio-formazan é classificado como marcador de vitalidade, no qual atualmente são estudados em diversos campos da ciência como por exemplo para a triagem de novos anticancerígenos, determinação de tumores em células, análise microbiológica de alimentos, verificação da inibição do crescimento microbiano em solos contaminados com metais, entre outros (BELOTI et al., 1999, KUMAR e TARAFDAR, 2003, AL-ARAJI et al., 2015, SHAWALI e SAMY, 2015).

Figura 10. Esquema da reação de redução do TTC pelas enzimas desidrogenases de células metabolicamente ativas e a consequente formação do TPF.

Alguns trabalhos publicados também mostraram o emprego da redução dos sais de tetrazólio para os precipitados formazan para medir o crescimento microbiano em meio de cultura líquidos e sólidos (BARTLETT et al., 1976, BARTLETT e MAZENS 1979, JOHNSON et al., 1985, OHARA e SAITO, 1993; OHARA e SAITO, 1995; YAMAMOTO e PINTO, 1996; FRANCISCO et al., 2014; SAVIANO et al., 2015, FRANCISCO et al., 2016, GALVÃO et al., 2016).

O objetivo do nosso trabalho, foi desenvolver, otimizar e validar métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para cada um dos representantes das quatro gerações

de antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), de modo a reduzir o tempo de incubação desses ensaios, e com isso ser uma alternativa mais rápida e prática para a determinação de suas potências em rotinas de laboratórios de controle microbiológico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

Uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) foi utilizada para pesar os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina sódica, cefuroxima sódica, ceftriaxona dissódica e o cloridrato de cefepima) e o reagente cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

Pipetas volumétricas de 5 mL (Uniglas), balões volumétricos de 10 mL (Plena-Lab, Vidrolabor e Laborglass) e micropipeta automática com faixa de trabalho de 100 a 1000 μ L (Surepette) foram utilizados para fazer as soluções das concentrações (60, 30 e 15 μ g/mL) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar para a cefazolina e a cefuroxima e as soluções das concentrações (80, 40 e 20 μ g/mL) para os ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar para a ceftriaxona e cefepima.

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) foram pesados em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H), e após o seu preparo foram esterilizados por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O medidor de pH (Gehaka PG1800) foi utilizado no preparo da solução tampão fosfato de pH $6,0 \pm 0,1$ (2,0 g de fosfato de potássio dibásico e 8,0 g de fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água ionizada, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), sendo que mesma foi esterilizada por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O espectrofotômetro (Unicam, Helios Epsilon) trabalhando no comprimento de onda de 580 nm, foi utilizado para medir e ajustar a transmitância da suspensão microbiana em $25 \pm 1\%$.

Pipetas graduadas estéreis e apirogênicas de 25 mL e 5 mL (BD Falcon) foram utilizadas para preparar as camadas basal, superficial e da solução de TTC 0,3% em ágar a 1% respectivamente, nos ensaios de doseamento microbiológicos.

Os meios de cultura MHA estéreis foram mantidos em equipamento de banho maria digital (SPLabor Modelo SP-12/100ED) em temperatura de 50 ± 1 °C até os mesmos serem adicionados para a formação da camada basal ou serem inoculados com o micro-organismo para a formação da camada superficial inoculada em placa de Petri (90x15 mm esterilizada por raio gama).

Os discos brancos esterilizados por autoclavação (Laborclin) de diâmetro de 6 mm foram utilizados para impregnar as diferentes concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

As placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) durante o período de incubação de 5 horas e 30 minutos. Os halos de inibição formados após o tempo de adição da solução de TTC 0,3% em ágar 1% foram medidos através do leitor de halos com uma exatidão de 0,1 mm (IUL, Haloes Caliper).

2.2. Reagentes

Os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos, cefazolina sódica (lote: 205040C), cefuroxima sódica (lote: 104966C), ceftriaxona dissódica (lote: 204881C) e o cloridrato de cefepima (lote: 105065C) foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Antibiótico do Brasil LTDA.

As cepas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizadas como reagentes biológico foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz.

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) (casaminoácidos 17,5 g/L, extrato de carne 2,0 g/L, ágar 17,0 g/L e amido 1,5 g/L) utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico, foram adquiridos da BD/Difco.

O reagente cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) foi adquirido pela Vetec Química Fina.

O fosfato de potássio monobásico e o fosfato de potássio dibásico utilizados para preparar a solução tampão fosfato pH 6,0, o cloreto de sódio para preparar a solução fisiológica 0,9 % e a dextrose utilizada para fazer a solução placebo, foram adquiridos da Inlab.

2.3. Desenvolvimento e otimização

Para a otimização e desenvolvimento do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxina, ceftriaxona e cefepima) com emprego do TTC foi utilizado um planejamento fatorial no qual foram variados o período de incubação, a suspensão do inóculo e a porcentagem de TTC, conforme mostrado na **Tabela 5**. O TTC foi empregado como reagente de viabilidade celular pois é o mais usado devido ser menos tóxico do que os outros sais de tetrazólio (BARTLETT et al., 1976).

Tabela 5. Planejamento fatorial para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Suspensão do inóculo (%)	Proporção de TTC (%)	Concentração do antimicrobiano (µg/mL)
1	4	1,0	0,1	12,5, 25, 50, 100
2	4	1,0	0,5	12,5, 25, 50, 100
3	4	2,0	0,1	12,5, 25, 50, 100
4	4	2,0	0,5	12,5, 25, 50, 100
5, 6, 7, 8	5	1,5	0,3	12,5, 25, 50, 100
9	6	1,0	0,1	12,5, 25, 50, 100
10	6	1,0	0,5	12,5, 25, 50, 100
11	6	2,0	0,1	12,5, 25, 50, 100
12	6	2,0	0,5	12,5, 25, 50, 100

Nos ensaios de otimização utilizou-se o sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL, no qual foram utilizadas quatro concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmico (12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

Foi pesado $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano beta-lactâmico, transferido para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com solução tampão estéril pH = $6,0 \pm 0,1$ para se obter a solução química de trabalho (SQT) de concentração de 1.000 µg/mL. Foram realizadas, a partir dessa solução, diluições sucessivas para se obter as soluções de concentração de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico.

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Esta suspensão foi diluída até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Uma porção de 100 mL de meio de cultura MHA estéril foi inoculada com 1mL, 1,5 mL ou 2 mL da suspensão microbiana para se obter o inóculo de 1,0, 1,5 ou 2,0 % respectivamente. Após a homogeneização do meio de cultura inoculado, alíquotas de 5 mL foram transferidas para as placas de Petri para a preparação da camada superficial.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, colocaram-se os discos de papel estéreis impregnados com as suas correspondentes soluções dos antimicrobianos beta-lactâmicos. As placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de incubação de 4, 5 ou 6 horas.

Aproximadamente cerca de 15 minutos antes do término do período de incubação foram preparadas as soluções de TTC 0,1, 0,3 e 0,5% em ágar a 1%. Primeiramente adicionando 0,25 g de ágar em um tubo contendo 25 mL de água previamente esterilizada, no qual a mesma foi fundida em micro-ondas, até a completa dissolução do ágar na água, então foram adicionados 0,025g de TTC para preparar a solução de TTC 0,1%, 0,075g de TTC para preparar a solução de TTC 0,3% e 0,125g de TTC para preparar a solução de TTC 0,5%.

As soluções foram homogeneizadas e após o período de incubação, de 4, 5 ou 6 horas, foram adicionados 5 mL da correspondente solução de TTC em ágar a 1% nas placas de Petri e depois de um período de 30 minutos foram medidos os halos de inibição de crescimento através do leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

2.4. Doseamento microbiológico com adição de solução de TTC

Nos ensaios de validação foram realizados com um delineamento experimental 3 x 3 com seis placas, em três dias diferentes, no sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL. Foram utilizadas três concentrações dos padrões e amostras simuladas, representando os níveis baixos, médios e altos dos antimicrobianos beta-lactâmico.

Foi pesado $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano beta-lactâmico, transferido para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com solução tampão estéril $\text{pH} = 6,0 \pm 0,1$ para

se obter a solução química de trabalho (SQT) de concentração de 1.000 µg/mL. Foram realizadas, a partir dessa solução, diluições sucessivas para se obter as soluções de concentração de 60, 30 e 15 µg/mL utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico da cefazolina e cefuroxina e as soluções de concentração de 80, 40 e 20 µg/mL utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico da ceftriaxona e cefepima.

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Esta suspensão foi diluída até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Uma porção de 100 mL de meio de cultura MHA estéril foi inoculada com 2 mL da suspensão microbiana e homogeneizada para se obter o inóculo de 2,0 %. Alíquotas de 5 mL do meio inoculado foram transferidas para as placas de Petri para a preparação da camada superficial.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, colocaram-se os discos de papel estéreis impregnados com as suas correspondentes soluções dos antimicrobianos beta-lactâmicos. As placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de incubação de 5 horas e 30 minutos.

Aproximadamente cerca de 15 minutos antes do término do período de incubação foi preparada a solução de TTC 0,3% em ágar a 1%, primeiramente adicionando 0,5g de ágar em um tubo contendo 50 mL de água previamente esterilizada, no qual a mesma foi fundida em micro-ondas, até a completa dissolução do ágar na água, então foram adicionados cerca de 0,15g de TTC, que foi homogeneizado na solução.

Após o tempo de incubação, foram adicionados 5 mL da solução de TTC 0,3% em ágar a 1% nas placas de Petri e depois de um período de 30 minutos foram medidos os halos de inibição de crescimento através do leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

2.5. Validação dos métodos

Um método analítico que possa ser utilizado durante a rotina de um laboratório deve através da validação mostrar que o mesmo produza resultados confiáveis e são adequados para a finalidade para o qual foi proposto (BRASIL, 2017). Os métodos microbiológicos rápidos com adição de solução de TTC foram validados quanto a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade é a capacidade do método analítico em identificar ou quantificar o analito em estudo, na presença de outros componentes que possam estar juntos na amostra, como as impurezas, diluentes e componentes da matriz. Portanto a seletividade do método deve mostrar um resultado positivo para a amostra que contém o analito e um resultado negativo para outros componentes presentes na amostra. (BRASIL, 2017).

A linearidade de um método analítico deve demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado estabelecido para o método (BRASIL, 2017). A linearidade foi avaliada pela análise de três curvas padrão, obtidas em dias diferentes. Avaliaram-se os coeficientes de correlação, significância da regressão, ajuste ao modelo linear e paralelismo entre as curvas de padrão e amostra simulada.

A precisão pode ser definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos nos ensaios com amostras preparadas de modo independente, conforme o método analítico a ser validado. A precisão dos ensaios de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% dos antimicrobianos beta-lactâmicos foram determinados pela dispersão dos resultados, calculados através do desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2017).

A exatidão de um método analítico é definida como a concordância dos resultados individuais obtidos pelo método em estudo em relação a um valor verdadeiro (BRASIL, 2017). A exatidão foi avaliada pela análise de amostras simuladas, que foram preparadas de maneira independente, nas quais quantidades conhecidas do fármaco foram adicionados a uma mistura de componentes do medicamento (placebo contaminado). A exatidão foi expressa pela relação percentual de recuperação do fármaco de concentração conhecida adicionado à amostra simulada (BRASIL, 2017).

A robustez é um parâmetro realizado durante o desenvolvimento do método analítico que mostra a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações em suas condições analíticas (BRASIL, 2017).

2.6. Métodos tradicionais e com adição de TTC

Os ensaios de comparação entre os métodos tradicionais e com adição de TTC foram realizados com um delineamento experimental 3 x 3 com seis placas, no sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL. A suspensão do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

utilizada na camada superficial inoculada foi de 2%. Foram utilizadas três concentrações dos padrões e amostras simuladas, representando os níveis baixos, médios e altos dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

Foi pesado $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano beta-lactâmico, transferido para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com solução tampão estéril $\text{pH} = 6,0 \pm 0,1$ para se obter a solução química de trabalho (SQT) de concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Foram realizadas, a partir dessa solução, diluições sucessivas para se obter as soluções de concentração de 60, 30 e 15 $\mu\text{g/mL}$ utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico da cefazolina e cefuroxina e as soluções de concentração de 80, 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$ utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico da ceftriaxona e cefepima.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, colocaram-se os discos de papel estéreis impregnados com as suas correspondentes soluções dos antimicrobianos beta-lactâmicos. As placas usadas no método de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante período de incubação de 5 horas e 30 minutos, e depois foram adicionados 5 mL da solução de TTC 0,3% em ágar a 1% nas placas de Petri, enquanto que as placas usadas no método tradicional de doseamento microbiológico permaneceram incubadas por 22 horas. Ambos os halos de inibição de crescimento dos dois ensaios foram medidos através do leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaios de otimização

Através das enzimas desidrogenases presentes nas células dos micro-organismos viáveis dos *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), houve redução irreversível da solução incolor do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$) 0,3% em ágar 1% e formação do precipitado 1,3,5 – trifeniltetrazólio formazan, (TPF) ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4$) de intensa coloração avermelhada. Após o período de incubação de 5 horas e 30 minutos foi possível fazer a leitura dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxina, ceftriaxona e cefepima), pois o grau de redução do TTC e sua consequente formação para formazan é proporcional ao número de células viáveis em

divisão, portanto é maior a partir do início da fase log do ciclo de crescimento microbiano (JOHNSON et al., 1985).

Embora o uso do TTC possa inibir o crescimento microbiano, devido a sua toxicidade em altas concentrações, o mesmo foi adicionado ao final do período de incubação do ensaio, portanto não influenciou no tamanho do halo de inibição de crescimento, pois é utilizado apenas para torná-lo mais nítido e delimitado com sua coloração avermelhada, facilitando assim a sua medição (BARTLETT et al., 1976, JOHNSON et al., 1985, OHARA et al., 1993, OHARA et al., 1995, GALVÃO et al., 2016).

Os resultados dos ensaios obtidos para a otimização e desenvolvimento do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxina, ceftriaxona e cefepima) com emprego do TTC foram analisados estatisticamente pela análise de regressão múltipla utilizando o software Minitab® 17, tendo sido obtidas as equações de regressão (**Tabela 6**) e análise de variância (**Tabela 7**) dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co) e do tempo de incubação (h).

Tabela 6. Equações de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h) e das concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co).

Substância	Equações de regressão	R ²	*R ² (aj.)	**R ² (pred.)
Cefazolina	Halos = 8,00 + 0,414 h + 2,049 ln(Co) + 0,204 h*ln(Co)	94,78%	94,48%	93,69%
Cefuroxima	Halos = 5,92 - 0,741 h + 2,342 ln(Co) + 0,159 h*ln(Co)	97,06%	96,87%	96,54%
Ceftriaxona	Halos = 1,847 - 0,347 h + 2,943 ln(Co)	93,88%	93,55%	92,92%
Cefepima	Halos = -11,95 + 2,028 h + 5,993 ln(Co) - 0,592 h*ln(Co)	94,53%	94,00%	91,92%

*R²(aj.) = R² ajustado, **R²(pred.) = R² predito

Tabela 7. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h) e das concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co).

Fontes	Cefazolina			Cefuroxima			Ceftriaxona			Cefepima		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Regressão	3	358,781	0,000	3	308,320	0,000	2	209,816	0,000	3	111,994	0,000
h	1	0,261	0,411	1	0,743	0,057	1	1,736	0,037	1	1,812	0,006
ln(Co)	1	3,415	0,004	1	3,862	0,000	1	208,080	0,000	1	9,153	0,000
h*ln(Co)	1	0,844	0,142	1	0,454	0,133	-	-	-	1	2,423	0,002
Erro	52	19,750	-	48	9,349	-	37	13,684	-	31	6,478	-
Total	55	378,531	-	51	317,668	-	39	223,500	-	34	118,471	-

Com os resultados obtidos através da sua análise estatística foram construídos os gráficos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com emprego do TTC que relacionam o tamanho dos halos de inibição de crescimento em função da concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co) e do tempo de incubação (h), conforme mostrado na **Figura 11**.

Figura 11. Gráficos de superfície dos halos de inibição de crescimento em função da concentração dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Co) e do tempo de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Foi verificado que quanto maior concentração dos antimicrobianos maior será o seu efeito inibitório sobre a população microbiana, portanto teremos um maior tamanho nos halos de inibição de crescimento, no qual os mesmos apresentaram resposta linear em função do logaritmo natural ($\ln$) das concentrações estudadas. Um maior tempo de incubação também colaborou também com uma maior difusão do antimicrobiano, como também um maior crescimento microbiano, fatores responsáveis pelo tamanho do halo de inibição de crescimento. Interessante observar que devido a cefazolina ser o antimicrobiano beta-lactâmico, mais efetivo contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), (BRUNTON et al., 2006, KALMAN et al., 1990, SUÁREZ et al., 2009, KATZUNG, et al., 2012, MASOUD et al., 2014) o mesmo apresentou maiores halos de inibição, e nesse caso podemos observar uma maior influência do período de incubação do que os outros antimicrobianos, conforme **Figura 11**.

Sabemos que quanto maior a suspensão do inóculo, maior será a população microbiana, e logo menor será o halo de inibição de crescimento (GAVIN, 1956, COOPER, 1963, HEWITT, 1977, PINTO et. al., 2014), porém este fator apresentou coeficiente não significativo para a equação de regressão obtida pela análise estatística. No caso da concentração do TTC o mesmo não tem influência no tamanho do halo de inibição de crescimento, apenas melhora a visualização dos mesmos.

Através da análise de regressão múltipla também foram obtidas as equações de regressão (**Tabela 8**) e análise de variância (**Tabela 9**) da intensidade dos halos de inibição em função do tempo de incubação, da suspensão do inóculo e da porcentagem da solução de TTC.

Tabela 8. Equações de regressão da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

Substância	Equações de regressão	R ²	*R ² (aj.)	R ² (pred.)
Cefazolina	Intensidade = -0,068 + 0,3199 h - 5,00 TTC + 1,250 h*TTC	88,73%	88,08%	87,39%
Cefuroxima	Intensidade = 1,171 + 0,007 h - 1,184 No + 0,92 TTC + 0,2632 h*No + 0,592 h*TTC - 1,316 No*TTC	91,45%	90,31%	88,43%
Ceftriaxona	Intensidade = 0,139 + 0,2639 h + 0,4167 h*TTC	96,53%	96,34%	96,12%
Cefepima	Intensidade = 4,062 - 0,598 h - 3,469 No + 5,052 TTC + 0,7835 h*No - 2,526 No*TTC	97,33%	96,87%	96,75%

*R²(aj.) = R² ajustado, **R²(pred.) = R² predito

Tabela 9. Análise de variância da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

Fontes	Cefazolina			Cefuroxima			Ceftriaxona			Cefepima		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Regressão	3	20,2809	0,000	6	18,0081	0,000	2	6,17778	0,000	5	13,5146	0,000
h	1	1,0237	0,000	1	0,0001	0,962	1	0,94938	0,000	1	0,2571	0,000
No	-	-	-	1	0,2748	0,009	-	-	-	1	0,8491	0,000
TTC	1	1,2308	0,000	1	0,0127	0,563	-	-	-	1	1,4944	0,000
h*No	-	-	-	1	0,3418	0,004	-	-	-	1	1,4301	0,000
h*TTC	1	2,0000	0,000	1	0,2768	0,009	1	4,00000	0,000	-	-	-
No*TTC	-	-	-	1	0,3418	0,004	-	-	-	1	1,0383	0,000
Erro	52	2,5763	-	45	1,6842	-	37	0,22222	-	29	0,3711	-
Total	55	22,8571	-	51	19,6923	-	39	6,40000	-	34	13,8857	-

Com os resultados obtidos através da sua análise estatística foram construídos os gráficos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com emprego do TTC que relacionam a intensidade dos halos de inibição de crescimento em função do período de incubação, da suspensão do inóculo e da porcentagem da solução de TTC, conforme mostrado na **Figura 12**.

Figura 12. Gráficos de superfície da intensidade dos halos de inibição de crescimento (I) em função da porcentagem de TTC e do período de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

A avaliação da intensidade do halo de inibição foi feita visualmente, onde os mesmos foram classificados em fracos (1), médios (2) e fortes (3) de acordo com a intensidade da coloração avermelhada que possibilitava um melhor delineamento do halo de inibição de crescimento. Foi observado que antes de se adicionar a solução de TTC, podia se observar um halo de crescimento pouco delimitado, que foi bastante realçado após a adição do TTC de coloração incolor e sua consequente redução para formazan de coloração avermelhada. Foi verificado que quanto maior a porcentagem de TTC empregada, maior foi a intensidade do halo de inibição de crescimento. Em relação ao período de incubação, os ensaios necessitam de um tempo mínimo para que haja uma população microbiana suficiente para que a mesma possa crescer e ao mesmo tempo sofrer a ação da difusão do antimicrobiano e finalmente ser revelada com o emprego da solução de TTC através do seu halo de inibição de crescimento. No caso das concentrações dos beta-lactâmicos as mesmas não têm relevância em relação a intensidade de coloração dos halos.

Portanto através dos ensaios para a otimização e desenvolvimento do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos foram definidas as condições para a

validação dos métodos. A suspensão do inóculo do micro-organismo em 2%, devido o mesmo contribuir com uma forte intensidade do halo de inibição de crescimento, quando foi adicionada a solução de TTC, em relação a um inóculo de 1% ou mesmo 1,5%, o tempo de incubação de 5 horas e 30 minutos, pois foi considerado o tempo médio necessário para se obter uma melhor relação entre o crescimento microbiano e a difusão dos antimicrobianos e portanto a definição bem delimitada dos halos de inibição de crescimento e pôr fim a porcentagem de TTC de 0,3% em ágar 1%, pois foi verificada uma forte intensidade avermelhada a partir desse valor.

Após o desenvolvimento e otimização dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos beta-lactâmicos, foram validados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. (BRASIL, 2017).

3.2. Ensaio de validação do método

Os métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) com a adição da solução de TTC 0,3% em ágar a 1%, com tempos de incubação reduzidos de 18 a 24 horas para 5 horas e 30 minutos, foram validados nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade dos métodos de doseamento microbiológicos foram avaliadas através dos ensaios utilizando-se 3 concentrações diferentes dos padrões dos antimicrobianos beta-lactâmicos, na faixa de 15 a 60 µg/mL (cefazolina e cefuroxima) e na faixa de 20 a 80 µg/mL (ceftriaxona e cefuroxima) e uma amostra placebo. Foram observadas a formação dos halos de inibição de crescimento (resultado positivo) nas soluções dos padrões, e a não formação dos halos de inibição de crescimento (resultado negativo) nas amostras placebos.

Para se determinar a linearidade foram utilizadas três concentrações diferentes do padrão e da amostra simulada, em diluições de progressão geométrica na razão 2:1, que estavam nas concentrações baixa (15 µg/mL), média (30 µg/mL) e alta (60 µg/mL) para a cefazolina e cefuroxima, e nas concentrações baixa (20 µg/mL), média (40 µg/mL) e alta (80 µg/mL) para a ceftriaxona e cefepima em um delineamento experimental 3 x 3, utilizando 6 placas de Petri em 3 réplicas preparadas de maneira independente.

Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos foram de 0,996, 0,991, 0,990 e 0,998 para cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima, respectivamente. Para a cefazolina, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,667 e 0,785 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,979). Para a cefuroxima, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,515 e 0,484 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,549). Para a ceftriaxona, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,100 e 0,609 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,513). Para a cefepima, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,111 e 0,342 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,700). O resumo destes resultados estão apresentados na **Tabela 10**.

Também foram construídas as curvas resposta do padrão e da amostra relacionando o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento. Ambas as curvas possuem a mesma inclinação, portanto há paralelismo entre elas, caracterizando a validade dos ensaios microbiológicos para a cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima conforme mostrados na **Figura 13**.

Tabela 10. Análise de variância dos dados obtidos nos ensaios rápidos dos antimicrobianos beta-lactâmicos no doseamento por difusão em ágar, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%).

Fontes	Cefazolina			Cefuroxima			Ceftriaxona			Cefepima		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Preparações	1	0,01	0,8116	1	0,03	0,2703	1	0,02	0,5425	1	0,01	0,7858
Regressão	1	29,45	0,0000	1	25,17	0,0000	1	26,51	0,0000	1	41,19	0,0000
Paralelismo	1	0,00	0,9794	1	0,01	0,5488	1	0,03	0,5125	1	0,01	0,7003
Quadrático	1	0,02	0,6668	1	0,01	0,5145	1	0,19	0,1003	1	0,23	0,1108
Diferença dos quadráticos	1	0,01	0,7852	1	0,01	0,4837	1	0,02	0,6087	1	0,07	0,3418
Tratamentos	5	58,97	0,0000	5	50,46	0,0000	5	53,53	0,0000	5	83,02	0,0000
Blocos	2	4,78	0,0000	2	1,84	0,0000	2	14,22	0,0000	2	2,26	0,0016
Erro	10	1,12		10	0,23		10	0,54		10	0,70	
Total	17	64,88		17	52,52		17	68,30		17	85,98	

Figura 13. Curvas resposta do padrão e da amostra simulada que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento, no doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos beta-lactâmicos, utilizando a solução TTC 0,3% em ágar a 1%.

A precisão nos ensaios de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1%, encontrada para a cefazolina foi 0,6%, para a cefuroxima foi 0,4% para a ceftriaxona foi 0,5% e para a cefepima foi 0,8%, conforme mostrado na **Tabela 11**. Portanto, todas estão abaixo do limite do DPR < 5,0% e os métodos podem ser considerados precisos.

Tabela 11. Resumo dos resultados de validação dos ensaios rápidos dos antimicrobianos beta-lactâmicos no doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Parâmetro	Critério	Cefazolina	Cefuroxima	Ceftriaxona	Cefepima
Linearidade	$R^2 \geq 0,95$	$R^2 = 0,9959$	$R^2 = 0,9907$	$R^2 = 0,9896$	$R^2 = 0,9978$
Seletividade	Seletivo	Seletivo	Seletivo	Seletivo	Seletivo
Precisão	$DPR \leq 5,0\%$	$DPR = 0,6\%$	$DPR = 0,4\%$	$DPR = 0,5\%$	$DPR = 0,8\%$
Exatidão	95 a 105%	98,3%	96,1%	96,8%	98,7%
Robustez	Robusto	Robusto	Robusto	Robusto	Robusto

As potências dos antimicrobianos beta-lactâmicos foram determinados através das seguintes equações abaixo (PINTO et al., 2014):

$$E = \frac{[(P3 + A3) - (P1 + A1)]}{4}$$

$$F = \frac{[(A3 + A2 + A1) - (P3 + P2 + P1)]}{3}$$

$$M = \frac{F}{E} \log R$$

$$Pot = 10^M \cdot 100\%$$

Onde, E é a diferença na resposta entre as doses altas e baixas do padrão e da amostra. F é a diferença na resposta entre as doses altas, médias e baixa do padrão e da amostra. A resposta é o tamanho do halo de inibição de crescimento. R é a razão entre as concentrações, no caso 2. A potência foi determinada pelo antilogaritmo de M.

A exatidão, que corresponde à média das potências calculadas nos ensaios de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1%, encontrada para a cefazolina foi 98,3%, para a cefuroxima foi 96,1%, para a ceftriaxona foi 96,8% e para a cefepima foi 98,7%, conforme mostrados na **Tabela 11**, portanto todos estão dentro do limite da exatidão, que é de 95 a 105%, e os métodos podem ser considerados exatos.

A robustez do método foi verificada durante a etapa de desenvolvimento e otimização do método de doseamento microbiológico com solução TTC. Foram estudados, a proporção de inóculo, o tempo de incubação, a concentração de TTC e as concentrações dos beta-lactâmicos utilizados nos ensaios.

Dessa forma, os métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1%, dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) foram validados experimentalmente quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

3.3. Comparação entre os métodos tradicionais e com adição de TTC

Os antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) foram analisados pelos métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% validados com tempo de incubação de 5 horas e 30 minutos e pelos métodos tradicionais de doseamento microbiológico com tempo de incubação de 22 horas.

O tamanho dos halos de inibição obtidos pelos métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% e pelos métodos tradicionais de doseamento microbiológico foram comparáveis (estatisticamente não significante, p -valor = 0,7459) como mostrado na **Figura 14**.

No método de doseamento microbiológico rápido empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), obtivemos potência de 98,6%, 96,5%, 97,4% e 98,8 para cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima, respectivamente. Estes resultados são estatisticamente semelhantes àqueles obtidos pelo método microbiológico tradicional, a saber, 99,9%, 99,7%, 98,7% e 97,0% para cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima, respectivamente. Como se pode confirmar os dois métodos estão dentro da especificação de 95 a 105%. Um resumo destes resultados estão apresentados na **Tabela 12**.

A **Figura 15**, mostra os halos de inibição obtidos pelos dois métodos de doseamento microbiológico para a determinação da cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima.

Portanto, os métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% podem ser utilizados como uma forma simples, prática e mais rápida, já que diminui o período de incubação de 18 a 24 horas para 5 horas e 30 minutos, na determinação da potência desses antimicrobianos beta-lactâmicos em uma rotina de um laboratório microbiológico.

Figura 14. Halos de inibição de crescimento (mm) obtidos pelos métodos rápidos e pelos métodos tradicionais para os antimicrobianos beta-lactâmicos. Two-way ANOVA teste mostrou significantes diferenças entre doses (p -valor = 0,0391) e não significantes diferenças entre os métodos (p -valor = 0,7459).

Tabela 12. Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento (cm) dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% e dos métodos tradicionais para os antimicrobianos beta-lactâmicos.

Dose	Cefazolina*		Cefuroxima*		Ceftriaxona**		Cefepima**	
	Rápido	Trad.	Rápido	Trad.	Rápido	Trad.	Rápido	Trad.
P1	18,0	19,2	10,3	9,4	7,6	7,9	8,7	8,3
P2	20,9	23,3	11,8	11,6	9,2	9,6	11,7	10,4
P3	23,2	26,7	14,1	14,4	11,5	12,3	13,8	13,4
A1	18,4	20,2	9,9	9,2	7,5	7,8	8,2	8,4
A2	20,9	23,1	12,1	11,5	9,1	9,4	12,1	10,5
A3	22,6	25,9	13,9	14,7	11,5	12,5	13,8	12,9
Pot %	98,6	99,9	96,5	99,7	97,4	98,7	98,8	97,0

*P1 e A1 = 15 µg/mL, P2 e A2 = 30 µg/mL e P3 e A3 = 60 µg/mL

**P1 e A1 = 20 µg/mL, P2 e A2 = 40 µg/mL e P3 e A3 = 80 µg/mL

Trad. = Tradicional

Pot. = Potência

Figura 15. Halos de inibição de crescimento obtidos nos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% (vermelho) e pelos métodos tradicionais (amarelo) para os antimicrobianos beta-lactâmicos.

4. CONCLUSÕES

A otimização e desenvolvimento dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com emprego de TTC para os antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) foram realizados empregando planejamentos fatoriais no qual foram variados os períodos de incubação (4, 5 ou 6 horas), as suspensões do inóculo (1,0, 1,5 ou 2,0 %) e as porcentagens das soluções de TTC (0,1, 0,3 ou 0,5% em ágar a 1%).

Através da análise de regressão múltipla dos resultados obtidos nesses ensaios pelo software Minitab® versão 17, foi verificado que as concentrações dos antimicrobianos beta-lactâmicos são os que mais influenciam no tamanho do halo de inibição de crescimento, enquanto para a avaliação da intensidade da coloração avermelhada que possibilitava uma melhor visualização dos halos foi verificado uma grande importância do tempo de incubação, da porcentagem da solução de TTC e da suspensão do inóculo.

Por conseguinte, foram definidas as condições para a validação do método de doseamento microbiológico por difusão em ágar com emprego de TTC no meio de cultura MHA em sistema de bicamada, a suspensão do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 2%, o período de incubação de 5 horas e 30 minutos, a porcentagem de TTC de 0,3% em ágar 1%, e as concentrações das soluções padrões e das amostras simuladas (15 a 60 µg/mL para a cefazolina e cefuroxima) e (20 a 80 µg/mL para a ceftriaxona e cefepima) em um delineamento experimental 3 x 3.

Os métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com adição de TTC 0,3% em ágar 1% para os antimicrobianos beta-lactâmicos foram desenvolvidos, otimizados e validados quanto aos parâmetros de seletividade, robustez, linearidade com os coeficientes de correlação (r^2) maiores de 0,990, precisão encontrada de 0,4 a 0,8 % e exatidão de 96,1 a 98,7%.

Os resultados das potências obtidas pelos métodos microbiológicos rápidos (MMRs) foram estatisticamente semelhantes àqueles obtidos pelos métodos microbiológicos tradicionais para todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima). Adicionalmente, os métodos microbiológicos rápidos (MMRs) apresentaram vantagens quanto a sua praticidade, sensibilidade, baixo custo e, principalmente, rapidez, uma vez que permitiu reduzir o período de incubação de 18 a 24 horas para 5 horas e 30 minutos. Portanto, os métodos microbiológicos

rápidos (MMR's) empregando cloreto de trifeniltetrazólio podem ser utilizados na rotina de avaliação desses antimicrobianos beta-lactâmicos, garantindo-lhes sua qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

PARTE 3: Desenvolvimento e aplicação de métodos microbiológicos rápidos (MMRs) para avaliação da atividade de outras classes de antimicrobianos empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

1. REVISÃO DE LITERATURA

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos constituídos por uma unidade aminociclitol unida por pontes osídicas a duas ou três unidade de aminoaçúcares. Devido possuir um grupo amino básico, os aminoglicosídeos apresentam melhor atividade em pH levemente alcalino, em torno de 7,4, onde ficam positivamente carregados e com isso facilita a penetração em bactérias Gram-negativas. A gentamicina, mostrada na **Tabela 13**, é um antimicrobiano aminoglicosídeo isolado do actinomiceto *Micromonospora purpurea* (bactéria Gram-positiva que tem sua organização filamentosa e ramificada). Além da gentamicina, também fazem parte do grupo de aminoglicosídeos, a estreptomicina, ampicilina, neomicina, sisomicina, netilmicina, kanamicina e a tobramicina (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, GUIMARÃES et. al., 2010, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012).

A gentamicina é efetiva contra principalmente bactérias Gram-negativas e também agem sobre algumas bactérias Gram-positivas, porém não tem atividade contra anaeróbios. O seu mecanismo de ação é a inibição da síntese de proteínas bacterianas, bloqueando na fase inicial do processo. Os antimicrobianos aminoglicosídeos ligam-se diretamente ao RNA ribossômico microbiano, causando a leitura errada do código genético e também inibindo a translocação do ribossomo. Seu efeito é bactericida e é reforçado por outros antimicrobianos que interferem na síntese da parede celular (YOSHIZAWA et. al., 1998, TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, GUIMARÃES et. al., 2010, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012).

Gentamicina é geralmente indicada no tratamento de infecções graves, como sepsis e pneumonia, causadas por bactérias Gram-negativas, que são resistentes a outros antimicrobianos, como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp*, *Serratia marcescens*, *Proteus sp*, *Acinetobacter sp*, e *Klebsiella sp*. Porém o tratamento de pneumonia deve ser feito juntamente com outro agente microbiano, devido à baixa absorção do aminoglicosídeo nos pulmões. Devido a sua polaridade, os antimicrobianos aminoglicosídeos devem ser administrados por via injetável (GUIMARÃES et. al.,

2010, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012). Sulfato de gentamicina na forma tópica de cremes, pomadas ou soluções (0,1 a 0,3%) são também usados no tratamento de queimaduras infectadas, feridas ou lesões da pele (KATZUNG et. al., 2012).

Um grande problema atual é devido à resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, através da inativação por enzimas microbianas. A resistência a gentamicina aumenta, quando usada como monoterapia em infecções provocadas por staphylococci. Estreptococos e enterococos são relativamente resistentes à gentamicina, porém quando administradas junto com vancomicina ou penicilina produz um potente efeito bactericida, devido ao aumento da absorção do antimicrobiano que ocorre com a inibição da síntese da parede celular. A gentamicina, administrada junto com outro antimicrobiano que atua sobre a parede celular bacteriana, é indicada para o tratamento de endocarditis causadas por bactéria Gram-positivas (streptococci, staphylococci, e enterococci) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012).

Como efeitos adversos, devido a dosagem e ao uso prolongado (mais de 5 dias) pode ocorrer reações de nefrotoxicidade (reversível) e a ototoxicidade (irreversível, podendo ocorrer perda da audição), portanto durante o uso da gentamicina ou outro aminoglicosídeo, as concentrações plasmáticas devem ser monitoradas e as doses então ajustadas, ou mesmo se necessário fazer a mudança para outro antimicrobiano menos tóxico (GUIMARÃES et. al., 2010, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012).

A gentamicina faz parte do grupo de acesso de antimicrobianos da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS, que incluem os antimicrobianos, que tem atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos suscetíveis comumente encontrados, e também apresenta menor potencial de resistência do que antimicrobianos de outros grupos. O grupo de acesso são antimicrobianos recomendados empiricamente como 1ª ou 2ª escolha para o tratamento das infecções. (WHO, 2019).

A linezolida, mostrada na **Tabela 13**, é um antimicrobiano sintético que pertence à classe das oxazolidinonas. As oxazolidinonas são compostos cíclicos de 5 membros constituídos por um átomo de nitrogênio, um átomo de oxigênio e um grupo carbonila em sua estrutura química. Esse antimicrobiano é relativamente novo, pois foi sintetizado em 1996 pela Pharmacia & Upjohn, Inc. e aprovada pelo FDA para o uso clínico em 2000 (KAISER et al., 2007, GUIMARÃES et al., 2010, KATZUNG et al., 2012, RANG et al., 2012).

A linezolida é ativa contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e principalmente utilizada contra *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina e enterococos resistentes à vancomicina, tem ação ativa contra *Mycobacterium tuberculosis*, além de ser eficaz sobre alguns anaeróbios como o *Clostridium difficile*. A linezolida é primeiramente um agente bacteriostático, apresentando um amplo espectro de ação e atividade frente a bactérias resistentes a outros antimicrobianos que inibem a síntese de proteínas, e também é considerada um agente bactericida contra streptococci (KAISER et al., 2007, GUIMARÃES et al., 2010, KATZUNG et al., 2012, RANG et al., 2012).

A linezolida apresenta cerca de 100% de biodisponibilidade após sua administração oral, e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas após 2 horas, por isso tanto as formulações intravenosas como as orais possuem a mesma concentração de 600 mg/dose. (KAISER et al., 2007, KATZUNG et al., 2012).

O mecanismo de ação da linezolida baseia-se na inibição da síntese de proteínas na sua fase inicial, portanto apresenta um mecanismo de ação diferente de outros antimicrobianos que atuam em fases mais avançadas da proliferação bacteriana. A linezolida liga-se à subunidade 50s ribossomal microbiano impedindo sua união com a subunidade 30s para a formação do ribossomo 70s, essencial para iniciar a síntese de proteínas, portanto a translação não pode ser iniciada. Seu único local de ligação no RNA ribossômico 23s da subunidade 50s, não resulta em resistência cruzada com outras classes de antimicrobianos. A resistência é causada principalmente pela mutação do sítio de ligação da linezolida no 23s RNA ribossomal (KAISER et al., 2007, GUIMARÃES et al., 2010, KATZUNG et al., 2012, RANG et al., 2012, GALVÃO et al., 2016).

Como indicação terapêutica, a linezolida é utilizada para o tratamento de infecções de *E. faecium* resistentes à vancomicina, para a pneumonia nosocomial e adquirida, para infecções complicadas na pele e tecidos moles causados bactérias Gram-positiva, e infecções de Nocardia. A linezolida é utilizada em combinação com outros medicamentos de segunda e terceira linha para tratar pacientes com tuberculose causada por cepas multirresistentes. De modo geral é recomendado o uso restrito da linezolida a infecções severas que outros antimicrobianos não conseguiram sucesso na cura, a fim de evitar o uso irracional desse medicamento e consequentemente a geração de cepas resistentes (KATZUNG et al., 2012, RANG et al., 2012, GALVÃO et al., 2016).

Os principais efeitos adversos do uso da linezolida são hematológicos, porém os efeitos são reversíveis e geralmente leves, como a trombocitopenia (administração por

mais de 2 semanas), a anemia e neutropenia. Podem ocorrer também diarreia, náusea, tonturas e erupções cutâneas (raras) (KATZUNG et al., 2012, RANG et al., 2012).

Uma grande limitação do uso da linezolida é o seu alto custo, que é elevado devido a sua produção industrial, que necessita uma síntese em várias etapas, como também dos reagentes caros utilizados e as condições especiais para as reações envolvidas no processo (KAISER et al., 2007).

A linezolida faz parte do grupo de reserva de antimicrobianos da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS, que devem ser reservados para o tratamento de infecções confirmadas ou suspeitas por micro-organismos multiresistentes a vários antimicrobianos, no qual devem ser tratados como opção de último recurso para o combate das infecções quando todas as outras alternativas falharam ou não foram adequadas. Esses antimicrobianos devem ser priorizados nos programas de administração envolvendo relatórios de monitoramento e utilização, para preservar sua eficácia. (WHO, 2019).

Os antimicrobianos glicopeptídeos (vancomicina e a teicoplanina) possuem grandes estruturas cíclicas complexas, e apresentam em sua molécula aminoácidos e açúcares, em razão de sua conformação molecular rígida, importante para a atividade, esses antimicrobianos são resistentes à ação das enzimas beta-lactamases (GUIMARÃES et. al., 2010, TAVARES, 2014).

A vancomicina, mostrada na **Tabela 13**, é um antimicrobiano glicopeptídeo que foi isolado de amostras de solo de *Streptomyces orientalis* (reclassificado como *Amycolatopsis orientalis*). A ação da vancomicina é bactericida para bactérias Gram-positivas, e a maioria dos staphylococci patogênicos, incluindo os produtores de beta-lactamase, e os resistentes a nafcilina e metilicina (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, GUIMARÃES et. al., 2010, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012, TAVARES, 2014).

O mecanismo de ação é inibir a síntese da parede celular das bactérias em multiplicação ativa, causando sua lise osmótica. A vancomicina atua como antagonistas competitivos da polimerização da cadeia peptidoglicana que forma a parede celular microbiana. Durante o processo reprodutivo, novas paredes celulares são formadas, e os glicopeptídeos se fixam às pontes de peptídeos que ligam as unidades N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico-peptídeo que formam o peptidoglicano da nova parede celular microbiana. Portanto o processo de formação da parede celular é interrompido, e a célula microbiana fica suscetível a lise, a membrana celular também é

danificada, o que contribui para o efeito antimicrobiano, semelhante ao alcançado pelos antimicrobianos beta-lactâmicos (GUIMARÃES et. al., 2010, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012, TAVARES, 2014).

O uso parental da vancomicina é indicado para infecções na corrente sanguínea e endocarditis causadas por staphylococci resistente a meticilina (MRSA). Vancomicina em combinação com gentamicina, pode ser utilizada no tratamento de endocardite enterococcal em pacientes com hipersensibilidade a penicilinas e cefalosporinas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012, TAVARES, 2014).

A vancomicina é fracamente absorvida no trato intestinal, e é administrada na forma oral na terapêutica da enterocolite pseudomembranosa causada pelo *Clostridium difficile*, porém devido ao surgimento de enterococci resistente à vancomicina, o metronidazol ainda é a primeira escolha para o tratamento dessa infecção. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008 KATZUNG et. al., 2012, TAVARES, 2014).

Atualmente, a importância da vancomicina está crescendo, pois é o antimicrobiano de primeira linha no tratamento de infecções por bactérias Gram-positiva com resistência a diversos antibióticos, como por exemplo para o tratamento de infecções graves, como a meningite, causadas por pneumococos que são resistentes às penicilinas (GUIMARÃES et. al., 2010, TAVARES, 2014).

Como reações adversas, podem ocorrer febres, calafrios, erupções cutâneas e flebite no local da injeção do antimicrobiano. A vancomicina é muito irritante quimicamente no local da injeção, o que inviabiliza o seu uso por via intramuscular, e por via intravenosa deve ser administrada diluída em grandes volumes de soluções e aplicada com gotejamento lento. Também podem ocorrer as reações raras de nefrotoxicidade e ototoxicidade, devido ao emprego de altas doses por um tempo prolongado. Recomenda-se fazer um ajuste na dose ou fracionamento por meio da monitorização das concentrações sanguíneas. Tanto a nefrotoxicidade e ototoxicidade podem aumentar a sua ocorrência quando associado a um aminoglicosídeo, como a gentamicina (KATZUNG et. al., 2012, RANG et. al., 2012, TAVARES, 2014).

A partir da década de 1990, começou a ser descrita a resistência à vancomicina presente nos enterococos e nas cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de material biológico retirado de pacientes hospitalizados. A resistência a vancomicina (VRSA) é devida a modificações do sítio de ligação da parede do peptidoglicano, com isso temos a perda da afinidade da vancomicina com seu alvo e consequentemente temos a perda

da sua atividade antimicrobiana. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008, GUIMARÃES et. al., 2010, KATZUNG et. al., 2012, TAVARES, 2014).

A vancomicina faz parte do grupo de observação de antimicrobianos da lista de medicamentos essenciais à saúde da OMS, com maior potencial de resistência e inclui a maioria dos antimicrobianos de maior prioridade e importância crítica na medicina humana, e apresentam risco relativamente alto na seleção de resistência microbiana. Os antimicrobianos do grupo de observação são recomendados empiricamente como 1ª ou 2ª escolha para o tratamento de um número limitado de infecções específicas, e devem ser priorizados nos programas de administração e monitoramento dos antimicrobianos. (WHO, 2019).

O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver e otimizar as condições analíticas, que permitam a determinação dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento em período de incubação reduzido, com a utilização do reagente de viabilidade celular, o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), para os antimicrobianos aminoglicosídeos (gentamicina), oxazolidinonas (linezolida) e glicopeptídeos (vancomicina) e com isso fazer a validação dos métodos microbiológicos rápidos (MMRs), avaliando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Tabela 13. Características estruturais e químicas dos antimicrobianos utilizadas no desenvolvimento de MMRs utilizando TTC.

Substância	Estrutura química	Fórmula química e peso molecular	pKa	logP
Gentamicina		$C_{21}H_{43}N_5O_7$ 477,595 g/mol	12,55	- 3,1
Linezolida		$C_{16}H_{20}FN_3O_4$ 337,346 g/mol	14,45	0,9
Vancomicina		$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ 1449,254 g/mol	2,99	- 3,1

Fonte: Adaptado de DrugBank 5.0 (WISHART et. al., 2006)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

Uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) foi utilizada para pesar os padrões de referência dos antimicrobianos aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) e o reagente de viabilidade celular (cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)) utilizado nos ensaios de desenvolvimento, otimização e validação dos métodos microbiológicos rápidos (MMRs).

Pipetas volumétricas de 5 mL e 6 mL (Uniglas), balões volumétricos de 10 mL e 100 mL (Plena-Lab, Vidrolabor e Laborglass) foram utilizados para preparar as soluções com diferentes concentrações (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) de gentamicina, linezolida e vancomicina, utilizadas durante o desenvolvimento e otimização dos métodos microbiológicos rápidos (MMRs), como também das concentrações (60, 30 e 15 µg/mL) utilizadas na validação dos MMRs e na sua respectiva comparação com os ensaios utilizando o método tradicional.

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) foram pesados em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H), e após o seu preparo foram esterilizados por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O medidor de pH (Gehaka PG1800) foi utilizado no preparo da solução tampão fosfato de pH 6,0 ± 0,1 (2,0 g de fosfato de potássio dibásico e 8,0 g de fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água ionizada, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), para a linezolida, e da solução tampão fosfato de pH 8,0 ± 0,1 (16,73 g de fosfato de potássio dibásico e 0,523 g de fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água ionizada, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), para a gentamicina e vancomicina, sendo que ambas foram esterilizadas por vapor úmido (121°C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O espectrofotômetro (Unicam, Helios Epsilon) trabalhando no comprimento de onda de 580 nm, foi utilizado para medir e ajustar a transmitância da suspensão microbiana em 25 ± 1%.

Pipetas graduadas estéreis e apirogênicas de 25 mL e 5 mL (BD Falcon) foram utilizadas para preparar as camadas basal, superficial e das soluções de TTC 0,2, 0,3 e 0,4% em ágar a 1%, nos ensaios de doseamento microbiológicos.

Os meios de cultura MHA estéreis foram mantidos em equipamento de banho maria digital (SPLabor Modelo SP-12/100ED) em temperatura de 50 ± 1 °C até os mesmos serem adicionados para a formação da camada basal ou serem inoculados com o micro-organismo para a formação da camada superficial inoculada em placa de Petri (90 x15 mm esterilizada por raio gama).

Os discos brancos esterilizados por autoclavação (Laborclin) de diâmetro de 6 mm foram utilizados para impregnar as diferentes concentrações dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina utilizadas nos ensaios microbiológicos.

As placas dos ensaios microbiológicos foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) e os halos de inibição formados após o tempo de adição das soluções de TTC em ágar 1% foram medidos através do leitor de halos com uma exatidão de 0,1 mm (IUL, Haloes Caliper).

2.2. Reagentes

Os padrões de referência dos antimicrobianos aminoglicosídeo (sulfato de gentamicina, lote: LRAB3514), oxazolidinona (linezolida, lote: 020M4707V) e glicopeptídeo (cloridrato de vancomicina, lote: LRAB3620) foram fornecidos pela Sigma Aldrich.

As cepas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizadas como reagentes biológico foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz.

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) (casaminoácidos 17,5 g/L, extrato de carne 2,0 g/L, ágar 17,0 g/L e amido 1,5 g/L) utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico, foram adquiridos da BD/Difco. O ágar foi adquirido pela BD/Difco e o reagente cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) foi adquirido pela Vetec Química Fina.

O fosfato de potássio monobásico e o fosfato de potássio dibásico utilizados para preparar as soluções de tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0, o cloreto de sódio para preparar a solução fisiológica 0,9 % e a dextrose utilizada para fazer a solução placebo, foram adquiridos da Inlab.

2.3. Desenvolvimento e otimização dos MMRs

Para a otimização e desenvolvimento do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) com emprego do TTC foi utilizado um planejamento fatorial no qual foram variados o período de incubação, a suspensão do inóculo e a porcentagem de TTC, conforme mostrado na **Tabela 14 e 15**.

Tabela 14. Planejamento fatorial para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos aminoglicosídeo (gentamicina) e glicopeptídeo (vancomicina).

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Suspensão do inóculo (%)	Proporção de TTC (%)	Concentração do antimicrobiano (µg/mL)
1	5	1,0	0,2	12,5, 25, 50, 100
2	5	1,0	0,4	12,5, 25, 50, 100
3	5	2,0	0,2	12,5, 25, 50, 100
4	5	2,0	0,4	12,5, 25, 50, 100
5, 6, 7, 8	5,5	1,5	0,3	12,5, 25, 50, 100
9	6	1,0	0,2	12,5, 25, 50, 100
10	6	1,0	0,4	12,5, 25, 50, 100
11	6	2,0	0,2	12,5, 25, 50, 100
12	6	2,0	0,4	12,5, 25, 50, 100

Nos ensaios de otimização utilizou-se o sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL, no qual foram utilizadas quatro concentrações dos antimicrobianos (12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

Para o preparo das soluções dos ensaios microbiológicos, foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg de linezolida e vancomicina. Devido ao fator de correção, no caso do sulfato de gentamicina foi pesado $16,0 \pm 1,0$ mg, que corresponde a $10,0 \pm 1,0$ mg de gentamicina. Após a pesagem, o antimicrobiano foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com solução tampão estéril pH = $6,0 \pm 0,1$ (linezolida) ou solução tampão estéril pH = $8,0 \pm 0,1$ (gentamicina e vancomicina), obtendo-se assim a concentração de 100 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 100 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva

solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 50 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 50 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 25 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 25 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 12,5 µg/mL.

Tabela 15. Planejamento fatorial para a otimização das condições do método de doseamento microbiológico do antimicrobiano oxazolidinona (linezolida).

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Suspensão do inóculo (%)	Proporção de TTC (%)	Concentração do antimicrobiano (µg/mL)
1	5	1	0,2	12,5, 25, 50, 100
2	5	1	0,4	12,5, 25, 50, 100
3	5	2	0,2	12,5, 25, 50, 100
4	5	2	0,4	12,5, 25, 50, 100
5, 6, 7, 8	5,5	1,5	0,3	12,5, 25, 50, 100
9	6	1	0,2	12,5, 25, 50, 100
10	6	1	0,4	12,5, 25, 50, 100
11	6	2	0,2	12,5, 25, 50, 100
12	6	2	0,4	12,5, 25, 50, 100
13	5,5	3	0,2	12,5, 25, 50, 100
14	5,5	3	0,4	12,5, 25, 50, 100
15	5,5	4	0,2	12,5, 25, 50, 100
16	5,5	4	0,4	12,5, 25, 50, 100

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Esta suspensão foi diluída até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Porções de 100 mL de meio de cultura MHA estéril fundido e mantido a cerca de 50 ± 1 °C foram inoculadas com 1mL, 1,5 mL, 2 mL, 3 mL ou 4 mL da suspensão microbiana para se obter o inóculo de 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 ou 4,0 % respectivamente. Após a homogeneização do meio de cultura inoculado, alíquotas de 5 mL foram transferidas para as placas de Petri para a preparação da camada superficial.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, colocaram-se os discos de papel estéreis impregnados com as suas correspondentes soluções dos antimicrobianos, conforme mostrado na **Figura 16**. As placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de incubação de 5, 5,5 ou 6 horas.

Figura 16. Esquema de distribuição das soluções padrão dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina sobre a camada superficial inoculada nos ensaios de desenvolvimento e otimização dos MMRs com emprego de TTC.

Foram preparadas as soluções de TTC 0,2, 0,3 e 0,4% em ágar a 1%, aproximadamente 10 minutos antes do fim do período de incubação. Tubos previamente esterilizados contendo solução de ágar 1% solidificada (0,30 g de ágar em 30 mL de água ionizada) foram fundidos em micro-ondas, no qual então foram adicionados 0,060g de TTC para preparar a solução de TTC 0,2%, 0,090g de TTC para preparar a solução de TTC 0,3% e 0,120g de TTC para preparar a solução de TTC 0,4%.

As soluções foram homogeneizadas e após o período de incubação, de 5, 5,5 ou 6 horas, foram adicionados 5 mL da correspondente solução de TTC em ágar a 1% nas placas de Petri e depois de um período de 30 minutos foram medidos os halos de inibição de crescimento através do leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

2.4. Doseamento microbiológico com adição de solução de TTC

Nos ensaios de validação foram realizados com um delineamento balanceado 3 x 3 com seis placas, em três dias diferentes, no sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL. Foram utilizadas três concentrações dos padrões (P) e amostras simuladas (A), representando os níveis baixos (15 µg/mL), médios (30 µg/mL) e altos (60 µg/mL) dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, conforme mostrado na **Figura 17**.

Figura 17. Esquema de distribuição das soluções padrão dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina sobre a camada superficial inoculada em um delineamento balanceado 3 x 3.

Para o preparo das soluções dos ensaios microbiológicos, foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg de linezolida e vancomicina. Devido ao fator de correção, no caso do sulfato de gentamicina foi pesado $16,0 \pm 1,0$ mg, que corresponde a $10,0 \pm 1,0$ mg de gentamicina. Após a pesagem, o antimicrobiano foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com solução tampão estéril pH = $6,0 \pm 0,1$ (linezolida) ou solução tampão estéril pH = $8,0 \pm 0,1$ (gentamicina e vancomicina), obtendo-se assim a concentração de 100 µg/mL. Foram retirados 6 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 100 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 60 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 60 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se

assim a concentração de 30 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 30 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 15 µg/mL.

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Esta suspensão foi diluída até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Para os antimicrobianos gentamicina e vancomicina, uma porção de 100 mL de meio de cultura MHA estéril foi inoculada com 1,5 mL da suspensão microbiana e homogeneizada para se obter o inóculo de 1,5 %. Para o antimicrobiano linezolida, uma porção de 100 mL de meio de cultura MHA estéril foi inoculada com 3,0 mL da suspensão microbiana e homogeneizada para se obter o inóculo de 3,0 %. Alíquotas de 5 mL do meio inoculado foram transferidas para as placas de Petri para a preparação da camada superficial.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, colocaram-se os discos de papel estéreis impregnados com as suas correspondentes soluções dos antimicrobianos, conforme mostrado na **Figura 17**. As placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o pelo período de incubação de 5 horas e 30 minutos.

Foram preparadas as soluções de TTC 0,3% em ágar a 1%, aproximadamente 10 minutos antes do fim do período de incubação. Tubos previamente esterilizados contendo solução de ágar 1% solidificada (0,30 g de ágar em 30 mL de água ionizada) foram fundidos em micro-ondas, no qual então foram adicionados 0,090g de TTC para preparar a solução de TTC 0,3%.

As soluções foram homogeneizadas e após o período de incubação, de 5,5 horas, foram adicionados 5 mL da correspondente solução de TTC em ágar a 1% nas placas de Petri e depois de um período de 30 minutos foram medidos os halos de inibição de crescimento através do leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

As condições desenvolvidas e otimizadas dos MMRs com emprego de TTC, para a gentamicina, linezolida e vancomicina, estão demonstrados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Condições otimizadas dos MMRs com emprego de TTC, para os antimicrobianos, gentamicina, linezolida e vancomicina.

Antimicrobiano	Tempo de incubação (h)	Suspensão do inóculo (%)	Proporção de TTC (%)	Concentração do antimicrobiano (µg/mL)
Gentamicina	5,5	1,5	0,3	15, 30, 60
Linezolida	5,5	3,0	0,3	15, 30, 60
Vancomicina	5,5	1,5	0,3	15, 30, 60

2.5. Validação dos MMRs

Um método analítico que possa ser utilizado durante a rotina de um laboratório deve através da validação mostrar que o mesmo produza resultados confiáveis e são adequados para a finalidade para o qual foi proposto (BRASIL, 2017). Os métodos microbiológicos rápidos para a gentamicina, linezolida e vancomicina com adição de solução de TTC foram validados quanto a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade é a capacidade do método analítico em identificar ou quantificar o analito em estudo, na presença de outros componentes que possam estar juntos na amostra, como as impurezas, diluentes e componentes da matriz. Portanto a seletividade do método deve mostrar um resultado positivo (presença de formação de halo) para a amostra que contém o analito e um resultado negativo (ausência de formação de halo) para outros componentes presentes na amostra. (BRASIL, 2017).

A linearidade de um método analítico deve demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado estabelecido para o método (BRASIL, 2017). A linearidade foi avaliada pela análise de três curvas padrão, obtidas em dias diferentes. Avaliaram-se os coeficientes de correlação, significância da regressão, ajuste ao modelo linear e paralelismo entre as curvas de padrão e amostra simulada.

A precisão pode ser definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos nos ensaios com amostras preparadas de modo independente, conforme o método analítico a ser validado. A precisão dos ensaios de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e

vancomicina foram determinados pela dispersão dos resultados, calculados através do desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2017).

A exatidão de um método analítico é definida como a concordância dos resultados individuais obtidos pelo método em estudo em relação a um valor verdadeiro (BRASIL, 2017). A exatidão foi avaliada pela análise de amostras simuladas, que foram preparadas de maneira independente, nas quais quantidades conhecidas do fármaco foram adicionados a uma mistura de componentes do medicamento (placebo contaminado). A exatidão foi expressa pela relação percentual de recuperação do fármaco de concentração conhecida adicionado à amostra simulada (BRASIL, 2017).

A robustez é um parâmetro realizado durante o desenvolvimento do método analítico que mostra a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações em suas condições analíticas (BRASIL, 2017).

2.6. Métodos tradicionais e com adição de TTC

Os ensaios de comparação entre os métodos tradicionais e com adição de TTC para a gentamicina, linezolida e vancomicina, foram realizados com um delineamento experimental 3 x 3 com seis placas, no sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL.

A suspensão do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizada na camada superficial inoculada foi de 1,5% para a gentamicina e vancomicina, e 3,0 % para a linezolida. Foram utilizadas três concentrações dos padrões e amostras simuladas, representando os níveis baixos (15 µg/mL), médios (30 µg/mL) e altos (60 µg/mL) dos antimicrobianos.

Para o preparo das soluções dos ensaios microbiológicos, foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg de linezolida e vancomicina. Devido ao fator de correção, no caso do sulfato de gentamicina foi pesado $16,0 \pm 1,0$ mg, que corresponde a $10,0 \pm 1,0$ mg de gentamicina. Após a pesagem, o antimicrobiano foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com solução tampão estéril pH = $6,0 \pm 0,1$ (linezolida) ou solução tampão estéril pH = $8,0 \pm 0,1$ (gentamicina e vancomicina), obtendo-se assim a concentração de 100 µg/mL. Foram realizadas, a partir dessa solução, diluições sucessivas para se obter as soluções de concentração de 60, 30 e 15 µg/mL utilizadas nos ensaios de doseamento microbiológico dos antimicrobianos.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, colocaram-se os discos de papel estéreis impregnados com as suas correspondentes soluções dos antimicrobianos. As placas usadas no método de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante período de incubação de 5 horas e 30 minutos, e depois foram adicionados 5 mL da solução de TTC 0,3% em ágar a 1% nas placas de Petri, enquanto que as placas usadas no método tradicional de doseamento microbiológico permaneceram incubadas por 22 horas. Ambos os halos de inibição de crescimento dos dois ensaios foram medidos através do leitor de halos (IUL, Haloes Caliper).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaios de otimização dos MMRs

As placas dos ensaios foram incubadas por 5 horas e 30 minutos a temperatura de $37 \pm 1^\circ \text{C}$, e após este período, foram retiradas e então foram adicionadas as soluções incolores de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,3% em ágar 1% e houve uma reação de redução irreversível e consequentemente a formação do precipitado 1,3,5 – trifeniltetrazólio formazan, (TPF) de intensa coloração avermelhada (BARTLETT et al., 1976, JOHNSON et al., 1985, OHARA et al., 1993, OHARA et al., 1995, YAMAMOTO e PINTO, 1996, BELOTI et al., 1999, KUMAR e TARAFDAR, 2003, AL-ARAJI et al., 2015, SHAWALI e SAMY, 2015, GALVÃO et al., 2016, SAVIANO e LOURENÇO, 2018). Assim após 30 minutos da adição da solução de TTC, os halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina tornaram mais definidos e delimitados possibilitando assim a sua leitura no leitor de halos.

Os resultados dos ensaios obtidos para a otimização e desenvolvimento do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina com emprego do TTC foram analisados estatisticamente pela análise de regressão múltipla utilizando o software Minitab® 18, tendo sido obtidas as equações de regressão (**Tabela 17**) e análise de variância (**Tabela 18**) dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e das concentrações dos antimicrobianos (Co).

Tabela 17. Equações de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e das concentrações dos antimicrobianos (Co).

Substância	Equações de regressão	R ²	*R ² (aj.)	**R ² (pred.)
Gentamicina	Halos = 9,53 + 0,985 ln(Co) - 0,706 h - 0,1742 No + 0,2349 ln(Co)*h	97,71%	97,58%	97,37%
Linezolida	Halos = -24,6 + 5,43 ln(Co) + 11,95 h - 5,03 No - 1,223 h*h - 0,348 ln(Co)*h + 0,856 h*No	96,25%	96,03%	95,73%
Vancomicina	Halos = 41,7 + 2,2236 ln(Co) - 13,76 h + 0,970 No + 1,255 h* h - 0,272 h*No	97,75%	97,58%	97,31%

*R²(aj.) = R² ajustado, **R²(pred.) = R² predito

Tabela 18. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e das concentrações dos antimicrobianos (Co).

Fontes	Gentamicina			Linezolida			Vancomicina		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Regressão	4	237,337	0,000	6	846,554	0,000	5	230,044	0,000
ln(Co)	1	0,305	0,054	1	9,319	0,000	1	223,695	0,000
h	1	0,359	0,037	1	0,98	0,086	1	0,978	0,001
No	1	0,477	0,017	1	3,341	0,002	1	0,118	0,227
h*h	-	-	-	1	1,259	0,052	1	0,987	0,001
ln(Co)*h	1	0,529	0,012	1	1,164	0,062	-	-	-
h*No	-	-	-	1	2,933	0,003	1	0,28	0,064
Erro	70	5,550	-	101	32,941	-	67	5,306	-
Total	74	242,887	-	107	879,494	-	72	235,35	-

Com os resultados obtidos através da sua análise estatística foram construídos os gráficos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com emprego do TTC que relacionam o tamanho dos halos de inibição de crescimento em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e das concentrações dos antimicrobianos (Co) conforme mostrado nas **Figuras 18 e 19**.

Figura 18. Gráficos de superfície dos halos de inibição de crescimento em função da concentrações dos antimicrobianos (Co) e do período de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Figura 19. Gráficos de superfície dos halos de inibição de crescimento em função da concentrações dos antimicrobianos (Co) e do inóculo (No) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Através das análises dos gráficos verificou-se que quanto maior concentração dos antimicrobianos maior será o seu efeito inibitório sobre a população microbiana, portanto teremos um maior tamanho nos halos de inibição de crescimento, os quais apresentaram resposta linear em função do logaritmo natural ($\ln$) das concentrações estudadas. Um maior tempo de incubação colaborou com uma maior difusão do antimicrobiano, como também um maior crescimento microbiano, fatores responsáveis pelo tamanho do halo de inibição de crescimento.

O aumento da suspensão do inóculo, provocou uma diminuição no halo de inibição dos antimicrobianos estudados, porém é interessante observar uma maior influência desse fator para a linezolida, já que foram utilizados para a validação do método, uma variação do inóculo de 1 a 4%, isso devido aos ensaios com os inóculos entre 1, 1,5 e 2%, apresentarem halos poucos delimitados após a adição da solução de TTC, sendo portanto necessário fazer um novo planejamento fatorial, adotando as

suspensões de inóculo entre 3 e 4%. A vancomicina também apresentou uma grande influência do inóculo, o que pode ser explicado devido a sua alta massa molecular ($MM = 1449,254 \text{ g/mol}$), pois temos uma difusão mais lenta em relação a um aumento no inóculo, diminuindo assim o halo de inibição de crescimento. Podemos verificar também que a vancomicina apresentou os menores halos de inibição de crescimento, pois conforme a literatura a vancomicina mata staphylococci lentamente e só se as células estiverem se dividindo ativamente, a taxa é menor que a das penicilinas tanto *in vitro* como *in vivo* (KATZUNG et. al., 2012). A gentamicina, embora também tenha-se evidenciando uma diminuição do halo de inibição, quando um aumento do inóculo, devido a sua massa molecular ($MM = 477,5954 \text{ g/mol}$), não teve sua difusão muito afetada, portanto gerando halos maiores do que os observados pela vancomicina.

No caso da concentração do TTC o mesmo não tem influência no tamanho do halo de inibição de crescimento, apenas melhora a visualização dos mesmos após a otimização entre as variáveis do ensaio, como a concentração, o inóculo e o tempo de incubação.

Utilizando uma análise de regressão múltipla também foram obtidas as equações de regressão (**Tabela 19**) e análise de variância (**Tabela 20**) da intensidade dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), da suspensão do inóculo (No) e da porcentagem da solução de TTC para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina

Tabela 19. Equações de regressão da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos.

Substância	Equações de regressão	R ²	*R ² (aj.)	**R ² (pred.)
Gentamicina	Intensidade = $-7,750 + 1,5000 \text{ h} + 0,5000 \text{ No} + 2,500 \text{ TTC}$	91,67%	91,32%	90,57%
Linezolida	Intensidade = $-1,94 + 0,500 \text{ h} - 2,362 \text{ No} + 2,500 \text{ TTC} + 0,500 \text{ h*No}$	86,04%	85,50%	84,65%
Vancomicina	Intensidade = $-14,88 + 3,000 \text{ h} + 30,00 \text{ TTC} - 5,000 \text{ h* TTC}$	88,56%	88,08%	88,06%

*R²(aj.) = R² ajustado, **R²(pred.) = R² predito

Tabela 20. Análise de variância da intensidade de coloração dos halos de inibição em função do tempo de incubação (h), do inóculo (No) e da concentração do TTC dos antimicrobianos.

Fontes	Gentamicina			Linezolida			Vancomicina		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Regressão	3	44,000	0,000	4	49,201	0,000	3	44,000	0,000
h	1	36,000	0,000	1	0,400	0,025	1	14,400	0,000
No	1	4,000	0,000	1	0,737	0,003	-	-	-
TTC	1	4,000	0,000	1	6,000	0,000	1	4,721	0,000
h*No	-	-	-	1	1,000	0,001	-	-	-
h* TTC	-	-	-	-	-	-	1	4,000	0,000
Erro	72	4,000		103	7,984		72	5,684	
Total	75	48,000		107	57,185		75	49,684	

Com os resultados obtidos através da sua análise estatística foram construídos os gráficos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com emprego do TTC que relacionam a intensidade dos halos de inibição de crescimento (I) em função do período de incubação, da suspensão do inóculo e da porcentagem da solução de TTC, conforme mostrado na **Figura 20**.

Figura 20. Gráficos de superfície da intensidade dos halos de inibição de crescimento (I) em função da porcentagem de TTC e do período de incubação (h) nos ensaios de doseamento microbiológico por difusão em ágar.

A intensidade dos halos de inibição foi avaliada visualmente, onde os mesmos foram classificados em fracos (1), médios (2) e fortes (3) de acordo com a intensidade da coloração avermelhada que possibilitava um melhor delineamento do halo de inibição de crescimento.

Da mesma forma que os ensaios dos métodos rápidos empregando TTC para os beta-lactâmicos (Parte 2), também foi verificado antes da adição do TTC, a formação de um halo de crescimento pouco delimitado, para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, no qual os mesmos foram bastante realçados após a adição do TTC de coloração incolor e sua consequente redução para formazan de coloração avermelhada (SAVIANO e LOURENÇO, 2018).

Através da análise da **Figura 20** verificou-se que quanto maior a porcentagem de TTC utilizada, maior foi a intensidade da coloração avermelhada do halo de inibição de crescimento.

Um maior período de incubação, também proporcionou uma maior intensidade da coloração avermelhada, pois da mesma forma que um aumento de inóculo, iremos ter nessas duas variáveis um aumento da população microbiana, que através das suas enzimas desidrogenases presentes em suas células viáveis, irão aumentar o grau de redução do cloreto de trifeniltetrazólio para o formazan, aumentando assim a intensidade da coloração avermelhada (BARTLETT et al., 1976, JOHNSON et al., 1985, OHARA et al., 1993, OHARA et al., 1995, YAMAMOTO e PINTO, 1996, GALVÃO et al., 2016, SAVIANO e LOURENÇO, 2018). As concentrações dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina não têm relevância em relação a intensidade de coloração dos halos.

Com os ensaios para a otimização e desenvolvimento do método de doseamento microbiológico dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina foram definidas as condições para a validação dos métodos. Para a gentamicina e vancomicina, foi definida a suspensão do inóculo em 1,5%, devido o mesmo contribuir com uma forte intensidade do halo de inibição de crescimento, e para a linezolida a suspensão do inóculo do micro-organismo foi definida em 3,0% em virtude de uma melhor visualização e delimitação dos halos de inibição de crescimento. O tempo de incubação ideal de 5 horas e 30 minutos, pois foi considerado o tempo médio necessário para se obter uma melhor relação entre o crescimento microbiano e a difusão dos antimicrobianos e portanto a definição bem delimitada dos halos de inibição de crescimento e pôr fim a porcentagem de TTC de 0,3% em ágar 1%, pois foi verificada uma forte intensidade avermelhada com esse valor.

Após o desenvolvimento e otimização dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, foram validados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. (BRASIL, 2017).

3.2. Ensaios de validação dos MMRs

Os métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina com a adição da solução de TTC 0,3% em ágar a 1%, com tempos de incubação reduzidos de 18 a 24 horas para 5 horas e 30 minutos, foram validados nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade dos métodos de doseamento microbiológicos foram avaliadas através dos ensaios utilizando-se 3 concentrações diferentes dos padrões dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina na faixa de 15 a 60 µg/mL e uma amostra placebo. Foram observadas a formação dos halos de inibição de crescimento (resultado positivo) nas soluções dos padrões, e a não formação dos halos de inibição de crescimento (resultado negativo) nas amostras placebos.

Para se determinar a linearidade foram utilizadas três concentrações diferentes do padrão e da amostra simulada, em diluições de progressão geométrica na razão 2:1, que estavam nas concentrações baixa (15 µg/mL), média (30 µg/mL) e alta (60 µg/mL) para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina em um delineamento experimental 3 x 3, utilizando 6 placas de Petri em 3 réplicas preparadas de maneira independente.

Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos para gentamicina ($r^2 = 0,987$), linezolida ($r^2 = 0,989$) e vancomicina ($r^2 = 0,997$) foram adequados, e permitiram demonstrar atendimento ao parâmetro linearidade.

Para a gentamicina, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,336 e 0,642 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,848). Para a linezolida, as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,294 e 0,170 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,266). Para a vancomicina as curvas do padrão e da amostra apresentaram regressão significativa (p-valor de 0,000), ajuste linear adequado (p-valores de 0,919 e 0,052 para quadrático e diferença do quadrático, respectivamente) e paralelismo (p-valor de 0,200). O resumo destes resultados estão apresentados na **Tabela 21**.

Também foram construídas as curvas resposta do padrão e da amostra relacionando o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento. Ambas as curvas possuem a mesma inclinação, portanto há paralelismo entre elas, caracterizando a validade dos ensaios microbiológicos para a gentamicina, linezolida e vancomicina conforme mostrados na **Figura 21**.

Tabela 21. Análise de variância dos dados obtidos nos ensaios rápidos dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina no doseamento por difusão em ágar, para $\alpha = 0,05$ (IC = 95%).

Fontes	Gentamicina			Linezolida			Vancomicina		
	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor	GL	SQ	p-valor
Preparações	1	0,08	0,2314	1	0,00	0,7747	1	0,00	0,6931
Regressão	1	47,08	0,0000	1	106,64	0,0000	1	30,53	0,0000
Paralelismo	1	0,00	0,8480	1	0,07	0,2664	1	0,04	0,1997
Quadrático	1	0,05	0,3355	1	0,06	0,2936	1	0,00	0,9190
Diferença quadráticos	1	0,01	0,6418	1	0,10	0,1703	1	0,10	0,0520
Tratamentos	5	56,67	0,0000	5	128,25	0,0000	5	36,81	0,0000
Blocos	4	0,29	0,2840	4	0,58	0,0590	4	2,88	0,0000
Erro	14	0,73		14	0,69		14	0,32	
Total	23	57,70		23	129,51		23	40,01	

Figura 21. Curvas resposta do padrão e da amostra simulada que relaciona o logaritmo da concentração destas soluções com o halo de inibição de crescimento, no doseamento microbiológico por difusão em ágar dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina utilizando a solução TTC 0,3% em ágar a 1%.

A precisão nos ensaios de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1%, encontrada para a gentamicina foi 3,1%, para a linezolida foi 1,7% e para a vancomicina foi 3,9%, conforme mostrado na **Tabela 22**. Portanto, todas estão abaixo do limite do DPR < 5,0% e os métodos podem ser considerados precisos.

A exatidão, que corresponde à média das potências calculadas nos ensaios de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1%, encontrada para a gentamicina foi 95,5%, para a linezolida foi 99,3% e para a vancomicina foi 98,7%, conforme mostrados na **Tabela 22**, portanto todos estão dentro do limite da exatidão, que é de 95 a 105%, e os métodos podem ser considerados exatos.

As potências dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina foram determinados através das seguintes equações abaixo (PINTO et al., 2014):

$$E = \frac{[(P3 + A3) - (P1 + A1)]}{4}$$

$$F = \frac{[(A3 + A2 + A1) - (P3 + P2 + P1)]}{3}$$

$$M = \frac{F}{E} \log R$$

$$Pot = 10^M \cdot 100\%$$

Onde, E é a diferença na resposta entre as doses altas e baixas do padrão e da amostra. F é a diferença na resposta entre as doses altas, médias e baixa do padrão e da amostra. A resposta é o tamanho do halo de inibição de crescimento. R é a razão entre as concentrações, no caso 2. A potência foi determinada pelo antilogaritmo de M.

A robustez do método foi verificada durante a etapa de desenvolvimento e otimização do método de doseamento microbiológico com solução TTC. Foram estudados, a proporção de inóculo, o tempo de incubação, a concentração de TTC e as concentrações dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina utilizados nos ensaios.

Dessa forma, os métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1%, dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina foram validados experimentalmente quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Tabela 22. Resumo dos resultados de validação dos ensaios rápidos dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina no doseamento microbiológico por difusão em ágar.

Parâmetro	Critério	Gentamicina	Linezolida	Vancomicina
Linearidade	$R^2 \geq 0,95$	$R^2 = 0,987$	$R^2 = 0,989$	$R^2 = 0,997$
Seletividade	Seletivo	Seletivo	Seletivo	Seletivo
Precisão	$DPR \leq 5,0\%$	$DPR = 3,1\%$	$DPR = 1,7\%$	$DPR = 3,9\%$
Exatidão	95 a 105%	95,50%	99,30%	98,70%
Robustez	Robusto	Robusto	Robusto	Robusto

3.3. Comparação entre os métodos tradicionais e com adição de TTC

Os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina foram analisados pelos métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% validados com tempo de incubação de 5 horas e 30 minutos e pelos métodos tradicionais de doseamento microbiológico com tempo de incubação de 22 horas.

No método de doseamento microbiológico rápido empregando cloreto de trifeniltetrazólio, obtivemos para a gentamicina a potência de 95,5%, para a linezolida a potência de 100,0% e para a vancomicina a potência de 96,9%. No método de doseamento microbiológico tradicional, obtivemos para a gentamicina a potência de 97,4%, para a linezolida a potência de 98,9% e para a vancomicina a potência de 98,1%. Portanto os resultados dos métodos rápidos foram estatisticamente semelhantes àqueles obtidos pelos métodos tradicionais. Como se pode confirmar os dois métodos estão dentro da especificação de 95 a 105%. Um resumo destes resultados estão apresentados na **Tabela 23**.

A **Figura 22**, mostra os halos de inibição obtidos pelos dois métodos de doseamento microbiológico para a determinação dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina.

Portanto, os métodos de doseamento microbiológico com solução TTC 0,3% em ágar a 1% podem ser utilizados como uma forma simples, prática e mais rápida, já que diminui o período de incubação de 18 a 24 horas para 5 horas e 30 minutos, na determinação da potência desses antimicrobianos em uma rotina de um laboratório microbiológico.

Tabela 23. Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento (cm) dos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% e dos métodos tradicionais para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina.

Dose	Gentamicina		Linezolida		Vancomicina	
	Rápido	Trad.	Rápido	Trad.	Rápido	Trad.
P1	11,6	11,0	12,3	11,5	9,8	9,3
P2	13,5	13,3	15,3	14,4	11,3	10,7
P3	14,8	14,8	17,5	16,5	12,5	12,1
A1	11,7	11,2	12,5	11,8	9,9	9,2
A2	13,2	13,0	15,1	14,1	11,1	10,6
A3	14,6	14,6	17,5	16,5	12,5	12,1
Pot %	95,5	97,4	100,0	98,9	96,9	98,1

*P1 e A1 = 15 µg/mL, P2 e A2 = 30 µg/mL e P3 e A3 = 60 µg/mL

Trad. = Tradicional

Pot. = Potência

Figura 22. Halos de inibição de crescimento obtidos nos métodos de doseamento microbiológico por difusão em ágar com solução TTC 0,3% em ágar a 1% (vermelho) e pelos métodos tradicionais (amarelo) para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina.

4. CONCLUSÕES

A otimização e desenvolvimento dos métodos microbiológico rápidos por difusão em ágar com emprego de TTC para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina foram realizados empregando planejamentos fatoriais, no qual devido aos resultados prévios encontrados para os ensaios com os beta-lactâmicos, foram variados os períodos de incubação (5, 5,5 e 6 horas), as suspensões do inóculo para a gentamicina e vancomicina (1,0, 1,5 e 2,0 %) e para a linezolida (1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 %) e as porcentagens das soluções de TTC (0,2, 0,3 e 0,4% em ágar a 1%).

Como verificado através das equações de regressão e dos gráficos de superfície gerados após a análise de regressão múltipla dos resultados dos ensaios pelo software Minitab® versão 18, os tamanhos dos halos de inibição de crescimento tiveram uma resposta proporcional às concentrações dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, enquanto que o inóculo influenciou de maneira inversamente proporcional aos halos de inibição de crescimento. Quanto a intensidade foi verificado uma combinação mínima entre o inóculo e o tempo de incubação, para que se possa atingir uma população microbiana suficiente para quando a adição da solução de TTC seja formado um halo bastante visível e delimitado.

A partir desses resultados foram definidas as condições para a validação dos métodos microbiológicos rápidos por difusão em ágar com emprego de TTC para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina. O meio de cultura Muller Hinton Ágar (MHA) em sistema de bicamada (20 mL de camada basal e 5 mL de camada inoculada), a suspensão do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 1,5% (gentamicina e vancomicina) e 3,0% para a linezolida, o período de incubação de 5 horas e 30 minutos, a porcentagem de TTC de 0,3% em ágar 1% e leitura após 30 minutos, as concentrações das soluções padrões e das amostras simuladas (15, 30 a 60 µg/mL representando os níveis baixos, médios e altos dos antimicrobianos) em um delineamento experimental 3 x 3.

Os métodos microbiológicos rápidos por difusão em ágar com emprego de TTC para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina foram desenvolvidos, otimizados e validados quanto aos parâmetros de seletividade, robustez, linearidade com os coeficientes de correlação (r^2) maiores de 0,987, precisão encontrada de 1,7 a 3,9 % e exatidão de 95,5 a 99,3%, portanto todos os métodos estão dentro dos limites das especificações.

Após a validação, os métodos microbiológicos rápidos por difusão em ágar com emprego de TTC para os antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, com tempo de incubação de 5 horas e 30 minutos, foram comparados com os métodos tradicionais com período de incubação de 22 horas. Os resultados das potências encontrados entre os métodos foram estatisticamente semelhantes.

Foi possível determinar através desses ensaios, que métodos microbiológicos rápidos por difusão em ágar com emprego de TTC são uma alternativa mais rápida, prática, confiável e simples para a determinação e quantificação das potências dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina e que podem ser utilizada na rotina de um laboratório de controle microbiológico.

PARTE 4: Determinação dos parâmetros críticos envolvidos na formação dos halos de inibição de crescimento no método microbiológico de difusão em ágar.

1. REVISÃO DE LITERATURA

O método microbiológico de difusão em ágar, utilizado para a determinação da potência de um agente antimicrobiano, é baseado no crescimento microbiano no meio de cultura e na difusão do agente antimicrobiano, no qual após um determinado tempo de incubação, onde houver a difusão do antimicrobiano, haverá a formação do halo de inibição de crescimento que será proporcional a concentração do agente antimicrobiano (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014).

A difusão do agente microbiano sobre o meio de cultura, está baseada na lei de difusão de Fick, no qual Cooper e Woodman propuseram um modelo de difusão linear, considerando a concentração constante do antimicrobiano ao longo do tempo. Através da equação de Cooper que determina que quadrado da distância de difusão (X^2) é cerca de quatro vezes o coeficiente de difusão (D), multiplicado pelo logaritmo natural do quociente da concentração inicial (C_0) do antimicrobiano pela sua concentração crítica (C'), multiplicada pelo tempo crítico (T') (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016), conforme equação abaixo:

$$X^2 = 4D \ln \left(\frac{C_0}{C'} \right) T'$$

Onde a concentração crítica (C') indica a sensibilidade do micro-organismo pelo antimicrobiano, de acordo com as condições específicas estabelecidas no ensaio microbiológico. Portanto a concentração crítica (C') é definida como a concentração do antimicrobiano na posição de limite entre o crescimento microbiano e sua inibição, que ocorre num mesmo tempo crítico (T'). O tempo crítico (T') é definido como o período de crescimento do micro-organismo, em que o inóculo ou população inicial (N_0) aumenta e atinge sua população crítica (N'), e portanto temos a partir desse momento a definição do halo de inibição de crescimento (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016).

Outro termo da equação de Cooper, relaciona o tempo crítico (T') como a soma do período de fase lag do micro-organismo (L) com o produto do tempo de geração do micro-organismo (G) pelo logaritmo entre o quociente da população crítica (N') pela população inicial do micro-organismo (No) (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016), conforme equação abaixo:

$$T' = L + G \cdot \log_2 \left(\frac{N'}{N_0} \right)$$

Onde L é o período de fase lag, ou fase de adaptação ao meio de cultura, no qual as células microbianas estão crescendo em tamanho e aumentando sua massa, porém não ocorre a divisão celular. Bactérias são organismo procariontes, que se replicam por divisão binária, no qual o tempo de geração (G) é o tempo que leva uma população microbiana dobrar de tamanho. A população crítica (N') é a população microbiana inibida pela concentração crítica (C') do antimicrobiano em um tempo crítico (T'), após esse tempo, ainda ocorrerá a difusão do antimicrobiano, porém devido à grande população microbiana, o mesmo será totalmente absorvido, ou seja não irá mais aumentar o tamanho do halo de inibição de crescimento (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; MOAT e FOSTER, 1995; HEWITT, 2004; TRABULSI, 2008; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016). Portanto, através das equações de Cooper podemos relacionar o tamanho do halo de inibição em função da difusão e do crescimento microbiano.

Nos ensaios microbiológicos por difusão em ágar, alguns fatores podem afetar o tamanho do halo de inibição de crescimento como a composição e pH do meio de cultura, pois além do coeficiente de difusão (D) ser dependente da temperatura e viscosidade do meio, um aumento na acidez do meio de cultura, diminui a atividade de antimicrobianos básicos, enquanto favorece a atividade de antimicrobianos ácidos. As condições de incubação, como a pré-incubação, onde as placas inoculadas são colocadas para incubação, e após determinado período de tempo irá se colocar os discos impregnados com os antimicrobianos, com isso temos um favorecimento do crescimento microbiano ante a difusão do antimicrobiano, e a formação de menores halos de inibição, e por outro lado na pré-difusão, onde as placas inoculadas e contendo os discos impregnados com os antimicrobianos, serão colocadas sob refrigeração, no qual a baixa temperatura, irá inibir o crescimento microbiano e favorecer a difusão do antimicrobiano, contribuindo assim

por um aumento no tamanho do halo de inibição de crescimento. O diâmetro e espessura do disco de papel, a uniformidade e espessura da camada inoculada, pois quanto maior o volume da camada inoculada, menos o antimicrobiano irá difundir, e com isso menor será o halo de inibição formado (GAVIN, 1957, PINTO et al., 2014).

Desse modo, se faz necessário, entender como os parâmetros da concentração crítica (C'), população crítica (N'), tempo crítico (T') e coeficiente de difusão (D) influenciam a formação e tamanho dos halos de inibição de crescimento, comparando diferentes antimicrobianos da mesma classe (intraclasse) como também antimicrobianos de classes diferentes (interclasse). O objetivo desse trabalho foi determinar e comparar esses parâmetros nos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) para entender sua influência na formação e tamanho dos halos de inibição de crescimento no método microbiológico de difusão em ágar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

Uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) foi utilizada para pesar os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) utilizados nos ensaios para a determinação da concentração crítica (C'), da população crítica (N') e do tempo crítico (T') responsáveis pela formação dos halos de inibição de crescimento nos métodos microbiológicos por difusão em ágar.

Pipetas volumétricas de 2 mL, 5 mL e 8 mL (Uniglas), balões volumétricos de 10 mL e 20 mL (Plena-Lab) foram utilizados para preparar as soluções com diferentes concentrações (160, 80, 40, 20, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$) dos antimicrobianos estudados, durante os ensaios para a determinação dos parâmetros críticos dos métodos microbiológicos por difusão em ágar.

O medidor de pH (Gehaka PG1800) foi utilizado no preparo da solução tampão fosfato de pH $6,0 \pm 0,1$ (2,0 g de fosfato de potássio dibásico e 8,0 g de fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água ionizada, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), para os antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) e para a linezolida, e da solução tampão fosfato de pH $8,0 \pm 0,1$ (16,73 g de

fosfato de potássio dibásico e 0,523g de fosfato de potássio monobásico diluídos em 1000 mL de água ionizada, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), para a gentamicina e a vancomicina. Todas as soluções foram esterilizadas por vapor úmido (121°C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) foram pesados em balança semi-analítica (Shimadzu BL 320H), e após o seu preparo foram esterilizados por vapor úmido (121 °C, 1,1kgf/cm² por 15 minutos) em equipamento tipo autoclave (Luferco, 39211).

O espectrofotômetro (Unicam, Helios Epsilon) trabalhando no comprimento de onda de 580 nm, foi utilizado para medir e ajustar a transmitância da suspensão microbiana em $25 \pm 1\%$.

Pipetas graduadas estéreis e apirogênicas de 25 mL e 5 mL (BD Falcon) foram utilizadas para preparar as camadas basal e superficial, respectivamente, nos ensaios microbiológicos de difusão em ágar.

As micropipetas automáticas (20 a 200 µL) e (100 a 1000 µL) (Surepette) foram utilizadas para a determinação de UFC/mL nos ensaios microbiológicos.

Tubos de ensaios graduados estéreis e apirogênicos de 14 mL (BD Falcon) foram utilizados para fazer os inóculos de 0,25 e 0,5 % das suspensões microbianas utilizados nos ensaios para a determinação da população crítica (N').

Os meios de cultura MHA estéreis foram mantidos em equipamento de banho maria digital (SPLabor Modelo SP-12/100ED) em temperatura de 50 ± 1 °C até os mesmos serem adicionados para a formação da camada basal ou serem inoculados com o micro-organismo para a formação da camada superficial inoculada em placa de Petri (90 x15 mm esterilizada por raio gama).

Os discos brancos esterilizados por autoclavação (Laborclin) de diâmetro de 6 mm foram utilizados para impregnar as diferentes concentrações dos antimicrobianos utilizados nos ensaios microbiológicos.

As placas dos ensaios microbiológicos foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica (SPLabor Modelo SP-101/27) durante os períodos de pré-incubação nos ensaios para a determinação do tempo crítico (T') e também no período de incubação de 18 a 24 horas. O contador de colônias (Phoenix CP 600) foi utilizado para medir o número de UFC por placa, nos ensaios microbiológicos. Os halos de inibição formados foram medidos através do leitor de halos com uma exatidão de 0,1 mm (IUL, Haloes Caliper).

2.2. Reagentes

Os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos, cefazolina sódica (lote: 205040C) e cefuroxima sódica (lote: 104966C), foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Antibiótico do Brasil LTDA. Os padrões de referência dos antimicrobianos beta-lactâmicos, ceftriaxona dissódica (lote: LRAA9170) e o cloridrato de cefepima (lote: LRAA9570), aminoglicosídeo (sulfato de gentamicina, lote: LRAB3514), oxazolidinona (linezolida, lote: 020M4707V) e glicopeptídeo (cloridrato de vancomicina, lote: LRAB3620) foram adquiridos pela Sigma Aldrich.

As cepas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) utilizadas como reagentes biológico foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz.

Os meios de cultura Mueller Hinton Ágar (MHA) (casaminoácidos 17,5 g/L, extrato de carne 2,0 g/L, ágar 17,0 g/L e amido 1,5 g/L) utilizados nos ensaios de doseamento microbiológico, foram adquiridos da BD/Difco.

O fosfato de potássio monobásico e o fosfato de potássio dibásico utilizados para preparar as soluções de tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0, o cloreto de sódio para preparar a solução fisiológica 0,9 %, foram adquiridos da Inlab.

2.3. Determinação das UFC/mL no meio MHA

Nos ensaios de doseamento microbiológicos dos antimicrobianos utilizados para determinação dos parâmetros críticos (C', N' e T') foi necessário calcular o número de UFC/mL na suspensão de 1% do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) no meio de cultura MHA.

Primeiramente, a suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), no qual a mesma foi diluída e ajustada no espectrofotômetro até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Foram retirados com micropipeta cerca de 30 μ L da solução microbiana previamente ajustada, adicionado em um tubo de ensaio estéril e apirogênico contendo cerca de 3000 μ L de solução fisiológica estéril 0,9%, homogeneizado para formar a suspensão microbiana de 1%. Depois foram retirados com micropipeta cerca de 100 μ L da suspensão microbiana de 1% e adicionada e diluída em um tubo de ensaio estéril e apirogênico contendo cerca de 900 μ L de solução fisiológica estéril 0,9%,

homogeneizado para formar a suspensão microbiana de 10^{-1} . Foram retirados com micropipeta cerca de 100 μL da suspensão microbiana de 10^{-1} e adicionada e diluída em um tubo de ensaio estéril e apirogênico contendo cerca de 900 μL de solução fisiológica estéril 0,9%, homogeneizado para formar suspensão microbiana de 10^{-2} , e assim foram feitas sucessivamente as suspensões microbianas de 10^{-3} a 10^{-6} , conforme a **Figura 23**.

Após fazer as suspensões microbianas diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} foram colocados com auxílio da micropipeta, cerca de 100 μL de cada suspensão no centro de uma placa de Petri estéril e vertidos 20 mL do meio de cultura MHA estéril, fundido e mantido a cerca de $50 \pm 1^\circ \text{C}$ em banho-maria, e homogeneizado em movimentos em circulares.

As placas foram imediatamente incubadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de incubação de 48 horas e depois contados o número de UFC's formados através de um contador de colônias. As placas foram feitas em triplicata para cada uma das suspensões microbianas diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} em dois dias diferentes. O esquema geral das suspensões microbianas de 10^{-1} a 10^{-6} utilizadas nos ensaios para determinar o número de UFC/mL na suspensão de 1% do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) no meio MHA, é mostrado na **Figura 23**.

Figura 23. Esquema das diluições para o preparo das suspensões microbianas utilizadas nos ensaios para determinação UFC/mL na suspensão de 1% do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) no meio MHA.

2.4. Determinação dos parâmetros críticos

Para a determinação dos parâmetros críticos (concentração (C'), população (N') e tempo (T')) dos métodos microbiológicos de difusão em ágar dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) foram variados (ou mantidos fixos) a concentração, a suspensão do inóculo e o período de pré-incubação, dependendo do parâmetro ao qual se desejava determinar, conforme mostrado na **Tabela 24**.

Tabela 24. Planejamento dos ensaios para determinação dos parâmetros críticos dos antimicrobianos nos métodos microbiológicos de difusão em ágar.

Parâmetros	Concentração (µg/mL)	Inóculo (UFC/mL)	Tempo de pré-incubação (Horas)
Concentração crítica (C')	Varia	Fixo	Fixo
População crítica (N')	Fixo	Varia	Fixo
Tempo crítico (T')	Fixo	Fixo	Varia

2.5. Determinação da concentração crítica (C')

Para a determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) foram variados as concentrações e fixados a suspensão do inóculo e o período de pré-incubação.

Nesses ensaios utilizou-se o sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL, no qual foram utilizadas cinco concentrações dos antimicrobianos (5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL) para a cefazolina, cefuroxima, gentamicina, linezolida e vancomicina, e seis concentrações dos antimicrobianos (5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL) para a ceftriaxona e cefepima.

Para o preparo das soluções dos ensaios microbiológicos, foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano, porém, devido ao fator de correção, no caso do sulfato de gentamicina foi pesado $16,0 \pm 1,0$ mg, que corresponde a $10,0 \pm 1,0$ mg de gentamicina. Após a pesagem, o antimicrobiano foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com solução tampão estéril pH = $6,0 \pm 0,1$ (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima e linezolida) ou solução tampão estéril pH = $8,0 \pm 0,1$ (gentamicina e vancomicina), obtendo-se assim a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Foram retirados 2 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, e transferidos para um balão de 20 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Foram retirados 8 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. O esquema geral das diluições para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios para determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos é mostrado na **Figura 24**.

Figura 24. Esquema das diluições para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios para determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos.

Adicionalmente, foram realizados ensaios na faixa de 20 a 160 µg/mL para a ceftriaxona e cefepima, no qual após a diluição e obtenção da solução de 1000 µg/mL, foram retirados 2 mL com pipeta volumétrica e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com solução tampão estéril pH = 6,0 ± 0,1, obtendo-se assim a concentração de 200 µg/mL. Foram retirados 8 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 200 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 160 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 160 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 80 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 80 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 40 µg/mL. Foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica da solução de concentração de 40 µg/mL, e transferidos para um balão de 10 mL, diluído com sua respectiva solução tampão estéril, obtendo-se assim a concentração de 20 µg/mL. O esquema geral das diluições para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios para determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico da ceftriaxona e cefepima é mostrado na **Figura 25**.

Figura 25. Esquema das diluições para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios para determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico da ceftriaxona e cefepima.

Nos ensaios para a determinação da concentração crítica, embora utilizou-se várias concentrações dos antimicrobianos, foram fixados a suspensão do inóculo do micro-organismo em 1% e o tempo de pré-incubação em 0 hora.

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), no qual a mesma foi diluída e ajustada no espectrofotômetro até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Os meios de cultura MHA de 100 mL estéreis, fundidos e mantidos a cerca de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho-maria, foram inoculados e homogenizados com 1 mL da suspensão microbiana previamente ajustada, para se obter o inóculo de 1,0 %. Para o preparo da camada superficial inoculada, alíquotas de 5 mL do meio inoculado, foram adicionadas para as placas de Petri contendo a camada basal de 20 mL do meio de cultura MHA estéril já previamente solidificado.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, foram colocados os discos de papel estéreis impregnados com as diferentes concentrações das soluções dos antimicrobianos, conforme mostrado na **Figura 26**. Como o tempo de pré-incubação adotado nos ensaios da concentração crítica foi de 0 hora, as placas foram imediatamente incubadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de incubação 18 a 24 horas e depois foram medidos os halos de inibição de crescimento formados através do leitor de halos. Foram realizadas 8 réplicas para cada ensaio.

Figura 26. Esquema de distribuição das concentrações das soluções padrão dos antimicrobianos sobre a camada superficial inoculada nos ensaios para a determinação da concentração crítica (C').

* A = Cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, linezolida e vancomicina

** B = Ceftriaxona e cefepima

2.6. Determinação da população crítica (N')

Para a determinação da população crítica (N') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) foram variados as suspensões do inóculo e fixados a concentração e o período de pré-incubação.

Nos ensaios para a determinação da população crítica (N') utilizou-se o sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL, no qual foram fixadas as concentrações dos antimicrobianos em 80 µg/mL para cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina, em 40 µg/mL para a linezolida e 20 µg/mL para a cefazolina, e o tempo de pré-incubação em 0 hora e variados a suspensão do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 0,25, 0,5, 1, 2 e 4%.

Para o preparo das soluções dos ensaios microbiológicos, foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano, porém, devido ao fator de correção, no caso do sulfato de gentamicina foi pesado $16,0 \pm 1,0$ mg, que corresponde a $10,0 \pm 1,0$ mg de gentamicina.

Após a pesagem, o antimicrobiano foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e diluído com solução tampão estéril $\text{pH} = 6,0 \pm 0,1$ (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima e linezolida) ou solução tampão estéril $\text{pH} = 8,0 \pm 0,1$ (gentamicina e vancomicina), obtendo-se assim a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Conforme respectivas diluições, explicadas anteriormente e mostradas na **Figura 24**, foram obtidas as concentrações de 80 $\mu\text{g/mL}$ (cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina), 40 $\mu\text{g/mL}$ (linezolida) e 20 $\mu\text{g/mL}$ (cefazolina), utilizadas nos ensaios para a determinação da população crítica (N').

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), no qual a mesma foi diluída e ajustada no espectrofotômetro até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Os meios de cultura MHA de 100 mL estéreis, fundidos e mantidos a cerca de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho-maria, foram inoculados e homogenizados com 1 mL, 2 mL e 4 mL da suspensão microbiana previamente ajustada, para se obter o inóculo de 1, 2 e 4%. Para fazer o inóculo de 0,5%, foi adicionado 3 mL da suspensão microbiana previamente ajustada, em um tubo de ensaio estéril e apirogênico contendo cerca de 3 mL de solução fisiológica estéril 0,9%, homogeneizado e posteriormente inoculado 1 mL no meio de cultura MHA de 100 mL estéril. Para fazer o inóculo de 0,25%, foi adicionado 3 mL da suspensão microbiana diluída anteriormente para o inóculo de 0,5%, em um tubo de ensaio estéril e apirogênico contendo cerca de 3 mL de solução fisiológica estéril 0,9%, homogeneizado e posteriormente inoculado 1 mL no meio de cultura MHA de 100 mL estéril. O esquema geral das diluições para o preparo das suspensões dos inóculos utilizadas nos ensaios para determinação da população crítica (N') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos é mostrado na **Figura 27**. Para o preparo da camada superficial inoculada, alíquotas de 5 mL de cada meio inoculado com diferente suspensão microbiana, foram adicionadas para as placas de Petri contendo a camada basal de 20 mL do meio de cultura MHA estéril já previamente solidificado. Foram realizadas em triplicata cada ensaio com diferente suspensão do inóculo.

Figura 27. O esquema das diluições para o preparo das suspensões do inóculo utilizadas nos ensaios para determinação da população crítica (N') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos.

Após a solidificação da camada superficial inoculada, foram colocados os discos de papel estéreis impregnados com as respectivas concentrações fixas das soluções padrão dos antimicrobianos, conforme mostrado na **Figura 28**. Como o tempo de pré-incubação adotado nos ensaios da população crítica foi de 0 hora, as placas foram imediatamente incubadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de incubação 18 a 24 horas e depois foram medidos os halos de inibição de crescimento formados através do leitor de halos.

Figura 28. Esquema de distribuição das concentrações fixas das soluções padrão dos antimicrobianos sobre a camada superficial inoculada nos ensaios para a determinação da população crítica (N') e do tempo crítico (T').

*C = Concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ (cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, e vancomicina), 40 $\mu\text{g/mL}$ (linezolida) e 20 $\mu\text{g/mL}$ (cefazolina).

2.7. Determinação do tempo crítico (T')

Para a determinação do tempo crítico (T') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), aminoglicosídeo (gentamicina), oxazolidinona (linezolida) e glicopeptídeo (vancomicina) foram fixados a concentração e a suspensão do inóculo e variados os períodos de pré-incubação.

Nos ensaios para a determinação do tempo crítico (T') utilizou-se o sistema de bicamada, sendo a camada basal com 20 mL e a camada superficial inoculada com 5 mL, no qual foram fixadas as concentrações dos antimicrobianos em 80 $\mu\text{g/mL}$ para cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina, em 40 $\mu\text{g/mL}$ para a linezolida e 20 $\mu\text{g/mL}$ para a cefazolina e a suspensão do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 1%, e variados os tempos de pré-incubação em 0, 1, 2, 3 e 4 horas.

Para o preparo das soluções dos ensaios microbiológicos, foram pesados $10,0 \pm 1,0$ mg de cada antimicrobiano, porém, devido ao fator de correção, no caso do sulfato de gentamicina foi pesado $16,0 \pm 1,0$ mg, que corresponde a $10,0 \pm 1,0$ mg de gentamicina. Após a pesagem, o antimicrobiano foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e

diluído com solução tampão estéril $\text{pH} = 6,0 \pm 0,1$ (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima e linezolida) ou solução tampão estéril $\text{pH} = 8,0 \pm 0,1$ (gentamicina e vancomicina), obtendo-se assim a concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$. Conforme respectivas diluições, explicadas anteriormente e mostradas na **Figura 24**, foram obtidas as concentrações de $80 \mu\text{g/mL}$ (cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina), $40 \mu\text{g/mL}$ (linezolida) e $20 \mu\text{g/mL}$ (cefazolina), utilizadas nos ensaios para a determinação do tempo crítico (T').

A suspensão microbiana foi preparada pela adição de cerca de 2 mL de solução fisiológica estéril 0,9% em tubo contendo o crescimento de 24 horas do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), no qual a mesma foi diluída e ajustada no espectrofotômetro até se obter transmitância de $25 \pm 1\%$ em 580 nm.

Os meios de cultura MHA de 100 mL estéreis, fundidos e mantidos a cerca de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho-maria, foram inoculados e homogenizados com 1 mL da suspensão microbiana previamente ajustada, para se obter o inóculo de 1,0 %. Para o preparo da camada superficial inoculada, alíquotas de 5 mL do meio inoculado, foram adicionadas para as placas de Petri contendo a camada basal de 20 mL do meio de cultura MHA estéril já previamente solidificado.

O período de pré-incubação é quando as placas após serem inoculadas, são colocadas para incubação, sem colocarmos os discos contendo as soluções dos antimicrobianos, portanto nesta condição haverá o favorecimento do crescimento microbiano e não haverá a difusão do antimicrobiano. Os discos impregnados com os antimicrobianos, só foram colocados após um determinado período de pré-incubação, que nos ensaios para a determinação do tempo crítico eram de 0, 1, 2, 3 e 4 horas. Portanto, após a solidificação da camada superficial inoculada, foram colocados os discos de papel estéreis impregnados com as concentrações fixas dos antimicrobianos nas placas inoculadas dos ensaios com o período de pré-incubação de 0 hora, e em seguida foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de incubação 18 a 24 horas. Para os ensaios com tempo de pré-incubação de 1, 2, 3 e 4 horas, as placas inoculadas foram colocadas na estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e somente após os respectivos tempos de pré-incubação foram adicionados os discos com as soluções dos antimicrobianos, e novamente as placas foram incubadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de incubação 18 a 24 horas. Os halos de inibição de crescimento formados foram medidos através do leitor de halos. O esquema geral dos ensaios com diferentes tempos de pré-incubação utilizados para determinação

do tempo crítico (T') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos, é mostrado na **Figura 29**.

Os ensaios para a determinação do tempo crítico (T') adotaram o mesmo procedimento adotado para os ensaios da população crítica (N') mostrado anteriormente na **Figura 28**, e também foram realizadas em triplicata cada ensaio com diferente tempo de pré-incubação.

Figura 29. O esquema dos ensaios com diferentes tempos de pré-incubação utilizados para determinação do tempo crítico (T') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio de determinação UFC/mL

As placas das suspensões microbianas diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} incubadas em estufa de cultura bacteriológica a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante o período de incubação de 48 horas no qual, foram contados o número de UFC formados através de um contador de colônias. Foram considerados os valores mínimo de 30 e máximo de 300 UFC por placa. Foi relacionado

o número de UFC/mL obtido de acordo com a sua respectiva diluição, de acordo com a equação abaixo:

$$UFC = \frac{\text{Número de colônias}}{\text{Diluição}}$$

Através da média dos dois dias diferentes dos ensaios, foi obtido o valor de 3.650.000 UFC/mL na suspensão de 1% do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) no meio MHA.

3.2. Ensaios de determinação da concentração crítica (C')

As placas dos ensaios utilizadas na determinação da concentração crítica (C') foram incubadas por 18 a 24 horas, a temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, e após este período, foram medidos os halos de inibição de crescimento formados com as diferentes concentrações dos antimicrobianos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, linezolida e vancomicina) através de um leitor de halos.

Com os resultados obtidos foram construídos os gráficos que relacionam o logaritmo natural das concentrações iniciais dos antimicrobianos (lnCo) com as médias dos halos de inibição de crescimento formados, e calculados os respectivos coeficientes de correlação (R^2) conforme as **Figuras 30 e 31**.

Figura 30. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento em função do logaritmo natural das concentrações iniciais dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) ($\ln Co$).

Figura 31. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento em função do logaritmo natural das concentrações iniciais dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina ($\ln Co$).

Primeiramente para a determinação da concentração crítica (C') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos foram utilizadas cinco concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 $\mu g/mL$), porém apenas a cefazolina, gentamicina e vancomicina

possibilitaram a formação dos halos de inibição de crescimento com todas as cinco concentrações, no caso da cefuroxima e linezolida foi possível a formação dos halos de inibição de crescimento com quatro concentrações (10, 20, 40 e 80 µg/mL), e para a ceftriaxona e cefepima, foi possível a formação dos halos de inibição de crescimento com quatro concentrações porém adotando uma nova faixa de concentração (20, 40, 80 e 160 µg/mL). Foram fixados a suspensão do inóculo do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 1% e o tempo de pré-incubação em 0 hora.

Todos os antimicrobianos apresentaram resposta linear dos halos de inibição de crescimento em função do logaritmo natural (ln) das concentrações utilizadas nos ensaios e foram obtidos os seguintes coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina (0,994), cefuroxima (0,966), ceftriaxona (0,921), cefepima (0,994), gentamicina (0,996), linezolida (0,998) e vancomicina (0,992).

Para a concentração de 80 µg/mL, foram obtidos os tamanhos médios dos halos de inibição de crescimento para a cefazolina (27,3 mm), cefuroxima (14,5 mm), ceftriaxona (10,8 mm), cefepima (13,1 mm), gentamicina (16,2 mm), linezolida (17,6 mm) e vancomicina (13,0 mm), mostrado na **Figura 32**. Conforme observado a cefazolina foi mais efetiva contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) devido a mesma apresentar maiores halos de inibição de crescimento, enquanto que a ceftriaxona e a cefepima que são beta-lactâmicos de 3ª e 4ª geração, portanto menos efetivos contra Gram-positivos apresentaram menores halos de inibição, fato observado pois só a partir da concentração mínima de 20 µg/mL que houve a formação do halo de inibição de crescimento. A vancomicina embora seja bastante efetiva contra micro-organismos Gram-positivos, pois houve a formação de halos de inibição de crescimento a partir de uma concentração de 5 µg/mL, devido à sua alta massa molecular (1449,254 g/mol) tem sua difusão mais lenta em relação aos outros antimicrobianos, contribuindo com isso em menores halos de inibição.

Figura 32. Média dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos, obtidos com uma concentração de 80 µg/mL, suspensão do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 1% e o tempo de pré-incubação em 0 hora.

Para obtermos a concentração crítica (C') dos antimicrobianos, primeiramente os valores das médias dos halos de inibição foram convertidos para x^2 , onde foram subtraídos o valor de 6,4, correspondente ao diâmetro do disco de papel, de acordo com a equação abaixo:

$$x^2 = \left(\frac{\text{média do halo} - 6,4}{2} \right)^2$$

Os valores dos logaritmos naturais das concentrações críticas dos antimicrobianos ($\ln C'$) foram determinados através da razão entre a intercepção (b) dos valores convertidos de x^2 em relação aos logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln C_0$), pela inclinação (a) dos valores convertidos de x^2 em relação aos logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln C_0$), conforme a equação abaixo:

$$\ln C' = - \frac{b}{a}$$

Assim foram calculados os valores das concentrações críticas dos antimicrobianos (C') e construídos os respectivos gráficos com os seus coeficientes de correlação (R^2),

que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln Co$) conforme mostrado nas **Figuras 33 e 34**.

Figura 33. Gráfico das concentrações críticas (C') dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln Co$).

Figura 34. Gráfico das concentrações críticas (C') dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos naturais das concentrações iniciais dos antimicrobianos ($\ln Co$).

Foram obtidas os seguintes os valores das concentrações críticas dos antimicrobianos (C') e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina (4,43 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,991), cefuroxima (13,0 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,838), ceftriaxona (26,86 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,823), cefepima (24,38 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,939), gentamicina (4,65 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,979), linezolida (10,56 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,974) e vancomicina (7,11 $\mu\text{g/mL}$ com R^2 de 0,900).

O tamanho do halo de inibição de crescimento é resultado do equilíbrio formado quando o antimicrobiano através da sua difusão atinge sua concentração crítica (C'), enquanto que o inóculo através do seu crescimento microbiano por sua vez atinge sua população crítica (N'), no qual esses dois parâmetros são determinados em um mesmo tempo crítico (T') (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016). Portanto, quanto menor for a concentração crítica (C') mais efetivo o antimicrobiano contra o micro-organismo, desse modo como foi observado os antimicrobianos cefazolina, gentamicina e vancomicina apresentaram as menores concentrações críticas (C') e também foram os únicos antimicrobianos que conseguiram a formação dos halos de inibição de crescimento a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, a cefuroxima e linezolida tiveram uma ação antimicrobiana menor que as anteriores, e com isso apresentaram suas concentrações críticas (C') maiores, a ceftriaxona e a cefepima apresentaram por sua vez, os maiores valores das suas concentrações críticas (C') e portanto como mostrou-se durante os ensaios, foram menos efetivas contra o micro-organismo Gram-positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Os resultados obtidos nos ensaios na determinação da concentração crítica (C') permitiram definir as concentrações que foram utilizadas para os ensaios da população crítica (N') e também do tempo crítico (T'), sendo para a cefazolina (20 $\mu\text{g/mL}$), linezolida (40 $\mu\text{g/mL}$) e para cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina (80 $\mu\text{g/mL}$).

3.3. Ensaios de determinação da população crítica (N')

As placas dos ensaios utilizadas na determinação da população crítica (N') dos antimicrobianos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, linezolida e vancomicina) foram incubadas por 18 a 24 horas, a temperatura de $37\pm 1^\circ\text{C}$, e após este

período, foram medidos os halos de inibição de crescimento formados com as diferentes suspensões do micro-organismo, através de um leitor de halos.

Para o cálculo dos ensaios da população crítica (N') utilizou-se as suspensões de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4% do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), no qual anteriormente foi determinada que 1 mL de sua suspensão, ajustada com transmitância de 25 ± 1 em 580 nm, tem aproximadamente 3.650.000 UFC (unidades formadoras de colônias), portanto, cada diferente suspensão do inóculo foi proporcionalmente multiplicado por esse valor.

Com os resultados obtidos foram construídos os gráficos que relacionam o logaritmo dos inóculos iniciais das suspensões do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ($\log_2(N_0)$) com as médias dos halos de inibição de crescimento formados pela ação dos antimicrobianos, e calculados os respectivos coeficientes de correlação (R^2) conforme as **Figuras 35 e 36**.

Figura 35. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), em função do logaritmo dos inóculos iniciais das suspensões do micro-organismo ($\log_2(N_0)$).

Figura 36. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, em função do logaritmo dos inóculos iniciais das suspensões do micro-organismo ($\log_2(N_0)$).

Na determinação da população crítica (N') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos foram utilizadas cinco diferentes suspensões do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (0,25, 0,5, 1, 2 e 4%), porém devido ao problema de gradação (formação de halos duplos), que foi observado nos halos formados com o inóculo de 4% para a cefuroxima e ceftriaxona, esses antimicrobianos utilizaram apenas as suspensões de 0,25, 0,5, 1 e 2% para calcular a sua população crítica (N'). Foram fixadas as concentrações dos antimicrobianos para cefazolina (20 $\mu\text{g/mL}$), linezolida (40 $\mu\text{g/mL}$) e para cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina (80 $\mu\text{g/mL}$), e o tempo de pré-incubação em 0 hora.

Todos os antimicrobianos apresentaram resposta linear dos halos de inibição de crescimento em função do logaritmo dos inóculos iniciais das suspensões do micro-organismo, utilizadas nos ensaios e foram obtidos os seguintes coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina (0,924), cefuroxima (0,984), ceftriaxona (0,963), cefepima (0,964), gentamicina (0,997), linezolida (0,974) e vancomicina (0,978).

Para padronizar as medições, foram obtidas as variações resultantes das diferenças dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento, entre suspensão de 0,25 e 2,0 % do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), para a cefazolina (2,9 mm), cefuroxima (0,9 mm),

ceftriaxona (1,0 mm), cefepima (1,6 mm), gentamicina (1,3 mm), linezolida (0,6 mm) e vancomicina (0,9 mm), conforme mostrado na **Tabela 25**.

Tabela 25. Variação do tamanho dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos, obtidos, entre suspensão de 0,25 % e 2, 0% do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) com tempo de pré-incubação em 0 hora.

Halos médios (mm)							
Inóculo	Cefazolina	Cefuroxima	Ceftriaxona	Cefepima	Gentamicina	Linezolida	Vancomicina
0,25%	21,6	13,9	10,6	13,2	17,3	14,8	13,4
2,0%	18,8	13,1	9,7	11,6	16,0	14,2	12,5
Variação	2,9	0,9	1,0	1,6	1,3	0,6	0,9

Cefazolina (20 µg/mL), linezolida (40 µg/mL), cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina (80 µg/mL).

Foi observado que a cefazolina com sua concentração de 20 µg/mL, apresentou a maior variação do tamanho dos halos de inibição obtidos para as suspensões de 0,25 e 2,0% do micro-organismo, conseguindo portanto ser mais efetiva, isto é, gerar halos de inibição maiores em populações menores do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A linezolida com concentração de 40 µg/mL, apresentou os tamanhos dos halos médios consideráveis, por outro lado, também obteve-se a menor variação entre os halos de inibição obtidos para as suspensões de 0,25 e 2,0 % do micro-organismo. Os outros antimicrobianos (cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina, com concentração de 80 µg/mL, apresentaram uma variação de 0,9 a 1,6 mm entre os halos de inibição obtidos para as suspensões utilizadas nesses ensaios.

Para determinarmos a população crítica (N') dos antimicrobianos, primeiramente os valores das médias dos halos de inibição foram convertidos para x^2 , onde foram subtraídos o valor de 6,4, correspondente ao diâmetro do disco de papel, de acordo com a equação abaixo:

$$x^2 = \left(\frac{\text{média do halo} - 6,4}{2} \right)^2$$

Os valores dos logaritmos das populações críticas dos antimicrobianos ($\log_2(N')$) foram determinados através da razão entre a intercepção (b) dos valores convertidos de x^2 em relação aos logaritmos dos inóculos iniciais do micro-organismo ($\log_2(N_0)$), pela

inclinação (a) dos valores convertidos de x^2 em relação aos logaritmos dos inóculos iniciais do micro-organismo ($\log_2(\text{No})$), conforme a equação abaixo:

$$\log_2(N') = -\frac{b}{a}$$

Desse modo, foram calculados os valores das populações críticas dos antimicrobianos (N') e construídos os respectivos gráficos com os seus coeficientes de correlação (R^2), que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos dos inóculos iniciais do micro-organismo ($\log_2(\text{No})$), conforme mostrado nas **Figuras 37** e **38**.

Figura 37. Gráfico das populações críticas (N') dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos dos inóculos iniciais dos antimicrobianos ($\log_2(\text{No})$).

Figura 38. Gráfico das populações críticas (N') dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com os logaritmos dos inóculos iniciais dos antimicrobianos ($\log_2(N_0)$).

Foram obtidas os seguintes os valores das populações críticas dos antimicrobianos (N') e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina ($\log_2(N') = 29,87$ UFC/mL com R^2 de 0,902), cefuroxima ($\log_2(N') = 34,07$ UFC/mL com R^2 de 0,982), ceftriaxona ($\log_2(N') = 27,47$ UFC/mL com R^2 de 0,955), cefepima ($\log_2(N') = 27,99$ UFC/mL com R^2 de 0,944), gentamicina ($\log_2(N') = 34,0$ UFC/mL com R^2 de 0,997), linezolida ($\log_2(N') = 39,81$ UFC/mL com R^2 de 0,979) e vancomicina ($\log_2(N') = 31,85$ UFC/mL com R^2 de 0,982).

Para uma concentração fixa, quanto maior for o inóculo, maior sua população microbiana, e com isso no decorrer do período de incubação, a ação antimicrobiana causada pela difusão do antimicrobiano terá mais dificuldade de vencer a resistência microbiana e como consequência menor será o tamanho dos halos de inibição de crescimento (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016). Como o micro-organismo é o mesmo em todos os seus ensaios e também a quantidade padronizada de suas suspensões, o valor do logaritmo da população crítica $\log_2(N')$ será determinada, pela eficiência demonstrada pelo antimicrobiano, através de um maior tamanho dos halos de inibição de crescimento, como também pela variação entre esses tamanhos quando se utilizou diferentes suspensões do inóculo. A cefazolina, mesmo utilizando nos ensaios

uma concentração fixa de 20 µg/mL, obteve-se os maiores tamanhos dos halos de inibição de crescimento e também a maior variação entre os inóculos, conforme mostrado anteriormente na **Tabela 25**, contribuindo assim com o seu valor médio do logaritmo da sua população crítica $\log_2(N')$. A linezolida, utilizando uma concentração de 40 µg/mL, e a cefuroxima, gentamicina e vancomicina, utilizando uma concentração de 80 µg/mL, apesar de serem bastante eficientes contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), pois formaram-se grandes halos de inibição, porém do outro lado, esses antimicrobianos que tiveram pequenas variações entre os diferentes inóculos, conforme a **Tabela 25**, portanto tivemos um maior valor do logaritmo das suas população crítica $\log_2(N')$. Ceftriaxona e cefepima utilizando uma concentração de 80 µg/mL, não são tão eficientes contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), conforme os tamanhos dos seus halos de inibição, e também tiveram pequena variação entre os diferentes inóculos, conforme a **Tabela 25**, isso portanto determinou um menor valor do logaritmo das suas população crítica $\log_2(N')$.

3.4. Ensaio de determinação do tempo crítico (T')

Para a determinação do tempo crítico (T') dos antimicrobianos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, linezolida e vancomicina), as placas dos ensaios foram primeiramente pré-incubadas em diferentes tempos, isto é, as placas inoculadas foram incubadas, sem a colocação dos discos impregnados com as soluções antimicrobianas, e após os determinados períodos de tempo, foram colocados os discos impregnados com as soluções antimicrobianas, e novamente foram incubadas por 18 a 24 horas, a temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo os halos de inibição de crescimento formados pelos diferentes tempos de pré-incubação medidos através de um leitor de halos.

Com os resultados obtidos foram construídos os gráficos que relacionam os diferentes tempos de pré-incubação (h) com as médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos, e calculados os respectivos coeficientes de correlação (R^2) conforme as **Figuras 39 e 40**.

Figura 39. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima), em função dos tempos de pré-incubação (h).

Figura 40. Gráfico das médias dos halos de inibição de crescimento formados dos antimicrobianos gentamicina, linezolid e vancomicina, em função dos tempos de pré-incubação (h).

Na determinação do tempo crítico (T') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos foram utilizadas cinco diferentes períodos de pré-incubação (0, 1, 2, 3 e 4 horas), porém devido ao problema de gradação (formação de halos duplos), que foi observado nos halos formados com o tempo de pré-incubação de 4 horas, para a cefuroxima e ceftriaxona, esses antimicrobianos utilizaram apenas os tempos de pré-incubação, compreendidos entre 0 e 3 horas, para se calcular o seu tempo crítico (T'). Foram fixadas as concentrações dos antimicrobianos para cefazolina (20 µg/mL), linezolida (40 µg/mL) e para cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina (80 µg/mL), e a suspensão do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em 1%.

Os antimicrobianos apresentaram resposta linear dos halos de inibição de crescimento em função do tempo de pré-incubação utilizados nos ensaios, e foram obtidos os seguintes coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina (0,940), cefuroxima (0,909), ceftriaxona (0,995), cefepima (0,981), gentamicina (0,968), linezolida (0,994) e vancomicina (0,992).

Para padronizar as medições, foram obtidas as variações resultantes das diferenças dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento, entre os tempos de pré-incubação de 0 e 3 horas, para a cefazolina (2,9 mm), cefuroxima (2,4 mm), ceftriaxona (1,5 mm), cefepima (2,1 mm), gentamicina (5,4 mm), linezolida (2,6 mm) e vancomicina (2,8 mm), conforme mostrado na **Tabela 26**.

Tabela 26. Variação do tamanho dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos, obtidos, entre os tempo de pré-incubação de 0 e 3 horas e suspensão de 1,0% do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Pré-incubação	Halos médios (mm)						
	Cefazolina	Cefuroxima	Ceftriaxona	Cefepima	Gentamicina	Linezolida	Vancomicina
0 h	19,3	14,5	10,8	12,8	16,3	16,0	12,7
3 h	16,4	12,1	9,3	10,8	10,9	13,4	9,9
Variação	2,9	2,4	1,5	2,1	5,4	2,6	2,8

Cefazolina (20 µg/mL), linezolida (40 µg/mL), cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina e vancomicina (80 µg/mL),

Verificou-se que a gentamicina, com sua concentração de 80 µg/mL, foi a mais influenciada pelo período de pré-incubação, pois apresentou a maior variação do tamanho dos halos de inibição obtidos entre os tempos de pré-incubação de 0 a 3 horas. A cefazolina com sua concentração de 20 µg/mL, apresentou os maiores tamanho dos halos de inibição, obtidos entre os tempos de pré-incubação de 0 a 3 horas, porém de um modo geral sua variação foi próxima da linezolida (40 µg/mL) e da cefuroxima (80 µg/mL) e principalmente da vancomicina (80 µg/mL), que embora não formou halos de inibição tão grandes, quando comparados com os outros antimicrobianos, foi bastante influenciada pelo tempo de pré-incubação, gerando uma variação muito próxima da cefazolina. A ceftriaxona e a cefepima, antimicrobianos menos efetivos contra Gram-positivos, ambos com sua concentração de 80 µg/mL, apresentaram uma menor variação entre os halos de inibição obtidos entre os diferentes tempos de pré-incubação utilizados nesses ensaios.

Para determinarmos o tempo crítico (T') dos antimicrobianos, primeiramente os valores das médias dos halos de inibição foram convertidos para x^2 , onde foram subtraídos o valor de 6,4, correspondente ao diâmetro do disco de papel, de acordo com a equação abaixo:

$$x^2 = \left(\frac{\text{média do halo} - 6,4}{2} \right)^2$$

Os valores dos tempos críticos dos antimicrobianos (T') foram determinados através da razão entre a intercepção (b) dos valores convertidos de x^2 em relação aos tempos de pré-incubação, pela inclinação (a) dos valores convertidos de x^2 em relação aos tempos de pré-incubação, conforme a equação abaixo:

$$(T') = -\frac{b}{a}$$

Assim, foram calculados os valores dos tempos críticos dos antimicrobianos (T') e construídos os respectivos gráficos com os seus coeficientes de correlação (R^2), que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com seus respectivos tempos de pré-incubação, conforme mostrado nas **Figuras 41 e 42**.

Figura 41. Gráfico dos tempos críticos (T') dos antimicrobianos beta-lactâmicos (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima) que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com seus respectivos tempos de pré-incubação (h).

Figura 42. Gráfico dos tempos críticos (T') dos antimicrobianos gentamicina, linezolida e vancomicina, que relacionam valores dos halos convertidos em x^2 com seus respectivos tempos de pré-incubação (h).

Foram obtidas os seguintes os valores dos tempos críticos dos antimicrobianos (T') e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina ($(T') = 6,7$ h com R^2 de 0,965), cefuroxima ($(T') = 5,4$ h com R^2 de 0,912), ceftriaxona ($(T') = 5,4$ h com R^2 de 0,998), cefepima ($(T') = 6,3$ h com R^2 de 0,965), gentamicina ($(T') = 4,3$ h com R^2 de 0,962), linezolida ($(T') = 6,7$ h com R^2 de 0,981) e vancomicina ($(T') = 4,6$ h com R^2 de 0,994).

Nos ensaios de pré-incubação, temos o favorecimento do crescimento microbiano, pois durante determinado período de tempo, os micro-organismos estão crescendo de forma geométrica, enquanto não temos nenhuma ação do antimicrobiano, pois os mesmos não foram colocados sobre as placas inoculadas e incubadas. Quando a colocação do antimicrobiano, o inóculo já está em crescimento contínuo, e portanto é mais difícil o antimicrobiano difundir de modo eficaz sobre a população bacteriana, quanto maior for o tempo de pré-incubação utilizado no ensaio. O tempo crítico (T') é atingido quando temos um equilíbrio entre a concentração crítica do antimicrobiano (C') e a população crítica do micro-organismo (N') (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; HEWITT, 2004; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016). A gentamicina e a vancomicina, apresentaram os menores tempos críticos (T'), pois ambas são bastante efetivas contra Gram-positivos, além disso a gentamicina, apresentou a maior variação quanto os diferentes tempos de pré-incubação utilizando nos ensaios, conforme a **Tabela 26**, enquanto que a vancomicina, como foi observado devido a sua massa molecular alta, quando foram medidos seus halos de inibição em diferentes tempos de pré-incubação, mostraram menores em tamanhos do que a maioria dos outros antimicrobianos, porém apresentou uma variação muito próxima da cefazolina, conforme a **Tabela 26**. A cefuroxima e a ceftriaxona, apresentaram os tempos críticos, maiores que as anteriores, no qual vale lembrar, que esses antimicrobianos devido ao problema de gradação, que foi observado nas placas com período de pré-incubação de 4 horas, tiveram somente utilizados para o cálculo dos seus tempos críticos (T') o intervalo de pré-incubação de 0 a 3 horas. Sabe-se que a concentração do antimicrobiano, faz grande diferença no tamanho do halo de inibição de crescimento e consequentemente, no caso da cefazolina e a linezolida embora sejam bastante eficiente contra os Gram-positivos, em decorrência do planejamento de seus ensaios, quando foram determinadas as concentrações de 20 $\mu\text{g/ml}$ (cefazolina) e 40 $\mu\text{g/ml}$ (linezolida), de certa forma contribui para um aumento no seus tempos críticos (T'), sendo próximo ao alcançado pela cefepima (80 $\mu\text{g/ml}$), que não é tão efetiva contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

3.5. Ensaios de determinação do coeficiente de difusão (D)

Os resultados obtidos dos ensaios para a determinação dos parâmetros da concentração crítica (C'), da população crítica (N') e do tempo crítico (T') foram usados para a determinação do coeficiente de difusão (D) dos antimicrobianos, conforme as equações de Cooper (COOPER e WOODMAN, 1946, COOPER, 1955, FINN, 1959, COOPER, 1963; PINTO et al., 2014, GALVÃO et. al., 2016), mostrado abaixo:

$$T' = L + G \cdot \log_2 \left(\frac{N'}{N_0} \right) \qquad X^2 = 4D \ln \left(\frac{C_0}{C'} \right) T'$$

Onde, na primeira equação T' é o tempo crítico, L é o tempo de fase lag, G é o tempo de geração do micro-organismo, N' é a população crítica e N₀ é a população inicial. Na segunda equação, X² é o valor teórico dos halos de inibição, calculados pela equação de Cooper, D é o coeficiente de difusão dos antimicrobianos, C₀ é a concentração inicial dos antimicrobianos, C' é a concentração crítica e T' é o tempo crítico.

Para a determinação do coeficiente de difusão (D) dos antimicrobianos, foi calculado a somatória do resíduo que corresponde ao valor das médias dos halos de inibição que foram convertidos para x² (experimental) menos o valor X² (teórico) dos halos de inibição, calculados pela equação de Cooper, conforme mostrado na equação abaixo:

$$\sum \text{resíduo} = (x^2 - X^2)$$

Utilizando a ferramenta Solver do Excel®, foi otimizado a somatória do resíduo, para o mínimo valor, no parâmetro do coeficiente de difusão (D), utilizando como restrições os valores da fase lag (L) = 0, pois para o cálculo do tempo crítico, verificou-se que no primeiro intervalo compreendido da pré-incubação entre o tempo 0 h a 1 h, houve diferença considerável entre as médias dos halos de inibição de crescimento, e o valor portanto da fase lag (L) não alterou de forma significativa o tempo crítico do antimicrobiano, e tempo de geração (G) = 0,5 (TODAR, 2012) do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A ferramenta Solver, considerou as variáveis irrestritas e não negativas, e método GRC não linear.

Foram, portanto, calculados os coeficientes de difusão (D) dos antimicrobianos e calculados os seus respectivos R^2 através de uma regressão entre os valores X^2 (teórico) e x^2 (experimental) com um nível de confiança de 95%.

Desse modo, foram obtidos os seguintes os valores dos coeficientes de difusão (D) dos antimicrobianos e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), para a cefazolina ((D) = 1,35 mm²/h com R^2 de 0,985), cefuroxima ((D) = 0,36 mm²/h com R^2 de 0,896), ceftriaxona ((D) = 0,19 mm²/h com R^2 de 0,755), cefepima ((D) = 0,34 mm²/h com R^2 de 0,835), gentamicina ((D) = 0,46 mm²/h com R^2 de 0,914), linezolida ((D) = 0,55 mm²/h com R^2 de 0,982) e vancomicina ((D) = 0,21 mm²/h com R^2 de 0,951).

O coeficiente de difusão (D) depende principalmente das características do antimicrobiano (tais como peso molecular e lipofilicidade/hidrofiliicidade), como também da concentração do antimicrobiano, pois quanto maior a concentração, maior será a sua difusão no meio, demonstrada através de um maior halo de inibição de crescimento. A cefazolina demonstrou o maior coeficiente de difusão (D) dos antimicrobianos estudados, sendo mais eficaz contra micro-organismo Gram-positivos, especialmente o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A linezolida e gentamicina, que são antimicrobianos bastante eficazes contra Gram-positivos, apresentaram seus respectivos coeficientes de difusão (D), maiores que cefuroxima e a cefepima, que de um modo geral apresentaram, bastante próximos. A vancomicina, como vimos é bastante eficiente contra Gram-positivos, lembrar que a partir da concentração de 5 µg/mL, foi possível a formação do halo de inibição, porém devido ao seu alto peso molecular, sua difusão foi menor que os outros antimicrobianos anteriores, porém foi ligeiramente maior que a ceftriaxona, que tem uma atividade maior para Gram-negativas, porém uma menor atividade contra Gram-positivos, como o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

3.6. Comparação entre os parâmetros C', N', T' e D dos antimicrobianos

Através da análise de variância dos resultados, mostrada na **Tabela 27**, realizada pelo software Minitab® 18, foi possível determinar quais parâmetros dos antimicrobianos (concentração crítica (C'), população crítica (N'), tempo crítico (T') e coeficiente de difusão (D)) mais influenciaram no tamanho do halo de inibição de crescimento. Foi verificado que o coeficiente de difusão (D) e a concentração crítica (C') foram os parâmetros que mais influenciaram no tamanho dos halos de inibição dos

antimicrobianos, enquanto o tempo crítico (T') e a população crítica (N') tiveram pouca influência, conforme mostrado na **Figura 43**.

Tabela 27. Análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição em função da concentração crítica (C'), população crítica (N'), tempo crítico (T') e coeficiente de difusão (D).

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	4	1264,44	316,109	1777,46	0,000
D	1	100,75	100,748	566,50	0,000
C'	1	19,25	19,250	108,24	0,000
N'	1	0,14	0,145	0,82	0,371
T'	1	3,43	3,429	19,28	0,000
Erro	54	9,60	0,178		
Falta de ajuste	2	1,13	0,565	3,47	0,039
Erro puro	52	8,47	0,163	*	*
Total	58	1274,04			

Figura 43. Gráfico dos principais parâmetros que mais influenciaram no tamanho dos halos de inibição de crescimento dos antimicrobianos.

Com os resultados obtidos através da sua análise estatística foi construído o gráfico que relaciona o tamanho do halo de inibição de crescimento em função do coeficiente de difusão (D) e da concentração crítica dos antimicrobiano (C'), conforme mostrado nas **Figura 44**.

Figura 44. Gráfico de superfície do halos de inibição de crescimento em função do coeficiente de difusão (D) e da concentração crítica dos antimicrobiano (C').

Conforme o gráfico de superfície, podemos verificar que o coeficiente de difusão (D) do antimicrobiano tem influência diretamente proporcional ao halo de inibição de crescimento, enquanto a concentração crítica tem influência inversamente proporcional, pois quando aumentamos a concentração crítica do antimicrobiano, diminuimos o tamanho do halo de inibição de crescimento.

Portanto, através da comparação dos resultados obtidos para a determinação da concentração crítica (C'), população crítica (N'), tempo crítico (T') e coeficiente de difusão (D) dos antimicrobianos, verificou que a maior influência no tamanho dos halos de inibição dos antimicrobianos é devida pelo coeficiente de difusão (D) e a concentração crítica (C') dos antimicrobianos.

4. CONCLUSÕES

A determinação da concentração crítica (C'), população crítica (N') e tempo crítico (T') dos métodos de doseamento microbiológico dos antimicrobianos cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, gentamicina, linezolid e vancomicina foram

realizados através de planejamentos experimentais nos quais foram variados ou fixados a concentração do antimicrobiano, a suspensão do inóculo do micro-organismo e o período de pré-incubação, dependendo do qual parâmetro se desejava para determinar.

Os resultados da concentração crítica (C') mostraram, que os antimicrobianos mais eficientes, a cefazolina, gentamicina e vancomicina, apresentaram as menores concentrações críticas (C'), a cefuroxima e linezolida tiveram uma ação antimicrobiana menor que as anteriores, e portanto suas concentrações críticas (C') foram maiores, a ceftriaxona e a cefepima apresentaram as maiores concentrações críticas (C') pois foram menos efetivas contra o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As concentrações fixas dos antimicrobianos utilizadas nos ensaios da população crítica (N') e do tempo crítico (T'), foram definidas após os ensaios da concentração crítica (C').

Os resultados da população crítica (N') foram determinados pela eficiência demonstrada pelo antimicrobiano, através de um maior tamanho dos halos de inibição de crescimento, como também pela variação entre esses tamanhos quando se utilizou diferentes suspensões do inóculo. Desse modo, a cefazolina obteve-se os maiores tamanhos dos halos de inibição de crescimento e também a maior variação entre os inóculos, contribuindo assim com o seu valor médio da sua população crítica $\log_2(N')$, enquanto que a linezolida, cefuroxima, gentamicina e vancomicina, que também formaram grandes halos de inibição, porém tiveram pequenas variações entre os diferentes inóculos, isso contribuiu para um aumento no valor das suas população crítica $\log_2(N')$. Ceftriaxona e cefepima não foram tão eficientes como os outros antimicrobianos, conforme os tamanhos dos seus halos de inibição, e também tiveram pequena variação entre os diferentes inóculos, isso portanto determinou um menor valor das suas população crítica $\log_2(N')$.

Os menores tempos críticos (T') foram da gentamicina que apresentou a maior variação aos diferentes tempos de pré-incubação nos ensaios, e a vancomicina que apesar do tamanho dos halos de inibição serem menores que os outros antimicrobianos, apresentou uma variação entre eles muito próxima da cefazolina. Devido ao problema de gradação, para a cefuroxima e a ceftriaxona foram utilizados os resultados do intervalo de pré-incubação de 0 a 3 horas, o que acabou contribuindo para um aumento no seus tempos críticos. A concentração do antimicrobiano é fator determinante no tamanho do halo de inibição de crescimento, e devido a cefazolina e a linezolida, usarem nos ensaios de pré-incubação, concentrações menores que as utilizadas pelos outros antimicrobianos,

acabou contribuindo em um aumento nos seus tempos críticos (T'), sendo próximo ao alcançado pela cefepima.

Os resultados obtidos dos ensaios dos parâmetros críticos (C' , N' e T') foram utilizados para a determinação do coeficiente de difusão (D) dos antimicrobianos, com auxílio da ferramenta de otimização Solver do Excel®. A cefazolina apresentou o maior coeficiente de difusão (D) por ser o antimicrobiano mais eficaz contra o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Os coeficientes de difusão (D) da linezolida e da gentamicina que também são antimicrobianos bastante eficazes contra Gram-positivos, foram maiores do que cefuroxima e a cefepima. A vancomicina, apesar de ser bastante eficiente contra Gram-positivos, devido ao seu alto peso molecular, seu coeficiente de difusão foi menor que os outros antimicrobianos anteriores, mas ligeiramente maior que a ceftriaxona, que tem uma atividade antimicrobiana menor contra Gram-positivos, contribuindo desse modo, com seu menor coeficiente de difusão.

A análise estatística realizada pelo software Minitab® 18, demonstrou que o coeficiente de difusão (D) e a concentração crítica (C') foram os parâmetros que mais influenciaram no tamanho dos halos de inibição dos antimicrobianos, enquanto o tempo crítico (T') e a população crítica (N') tiveram pouca influência. Foi observado que o coeficiente de difusão (D) do antimicrobiano, tem influência diretamente proporcional ao halo de inibição de crescimento, enquanto que a concentração crítica (C') tem influência inversamente proporcional, pois quando aumentamos a concentração crítica (C') do antimicrobiano, diminuimos o tamanho do halo de inibição de crescimento. Portanto, através dos ensaios foi possível verificar que um antimicrobiano será mais eficiente contra um determinado micro-organismo, quanto maior for o seu coeficiente de difusão (D) e menor sua concentração crítica (C'), formando com isso um maior halo de inibição de crescimento.

Estes resultados são coerentes com as equações de Cooper, considerando que os parâmetros relacionados ao crescimento microbiano (G e L) são constantes para todos os ensaios, devido ao fato de empregarem o mesmo micro-organismo (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)) e mesmo meio de cultura (Mueller-Hinton Ágar). Em outras palavras, os tamanhos dos halos de inibição são influenciados pelas características do antimicrobiano, tais como sua atividade antimicrobiana e propriedades físico-químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ARAJI, Y.H, SHNEINE, J.K., AHMED, A.A. Chemistry of formazan. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, vol. 5(1), pg. 41-76, 2015.
- ANGLOV, T.; BYRIALSEN, K.; CARSTENSEN, J.K.; CHRISTENSEN, F.; CHRISTENSEN, S.; MADSEN, B.S.; SORESEN, E.; SORESEN, J.N.; TOFTEGARD, K., WINTHER, H. HEYDORN, K. Uncertainty budget for final assay of a pharmaceutical product based on RP-HPLC. **Accreditation and Quality Assurance**, v.8, p.225-230, 2003.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, p.71-79, 2016.
- BARAT, A.; RUSKIN, H.J.; CRANE, M. Probabilistic models for drug dissolution. Part 1. Review of Monte Carlo and stochastic cellular automata approaches. **Simulation Modeling Practice and Theory**, v. 14, p. 843-856, 2006.
- BARTLETT, R.C., MAZENS, M., GREENFIELD, B. Acceleration of Tetrazolium Reduction by Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v.3, n.3, 1976, p. 327-329.
- BARTLETT, R.C., MAZENS, M.F. Rapid Antimicrobial Susceptibility Test Using Tetrazolium Reduction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 15, n. 6, 1979, p. 769-774.
- BELOTI, V., BARROS, M.A.F., FREITAS, J.C., NERO, L.A., SOUZA, J. A., SANTANA, E. H.W., FRANCO, B.D.G.M. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p.137-140, 1999.
- BRASIL, Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.
- BRÜGGEMANN, L.; WENNRICH, R. Evaluation of measurement uncertainty for analytical procedures using a linear calibration function. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, p.269-273, 2002.
- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.
- BUTLER, M.S.; COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. **Journal of Antibiotics**, v. 64, 2011, p. 413-425.
- CANNELL, R.J.P.; KNOWLES, M.; WALKER, J.M. Studies on pre-incubation conditions in the seeded agar plate well inhibition assay. **Letters in Applied Microbiology**, v. 7, 1988, p. 13-15.
- CHUI, Q.S.H.; ANTONOFF, H.B.; OLIVIERI, J.C. Utilização de índices r e R obtidos de programas interlaboratoriais para o controle de precisão de método analítico: determinação de água por Karl Fischer. **Química Nova**, v.25, n.4, 657-659, 2002.
- COOPER, K. E., WOODMAN, D. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. **J.Pathol Bacteriol.**, v. 58, p75-84, 1946.

COOPER, K. E. Theory of Antibiotic Inhibition Zones in Agar Media. **Nature**, v. 176, p-510-511, 1955.

COOPER, K.E. The theory of antibiotic inhibition zones. In: KAVANAGH, F. **Analytical Microbiology**. Academic Press, cap. 1, p. 1-86, 1963.

DESIMONI, E.; BRUNETTI, B. Uncertainty of measurement and conformity assessment: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p.1729-1741, 2011.

DRUGEON, H.B.; JUVIN, M.E.; CAILLON, J.; COURTIEU, A.L. Assessment of formulas for calculating critical concentration by the agar diffusion method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31(6), 1987, p. 870-785.

EURACHEM/CITAC GUIDE. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd ed., 2012.

FINN, R. K. Theory of Agar Diffusion Methods for Bioassay. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 6, p.975-977, 1959.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5^a ed., vol. 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010.

FRANCISCO, F.L.; SAVIANO, A.M.; PINTO, T.J.A.; LOURENÇO, F.R. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. *Journal of Microbiological Methods*, v. 103, 2014, p. 104-111.

FRANCISCO, F. L., SAVIANO, A.M., PINTO, T.J.A.; LOURENÇO, F.R. Design Space of a Rapid Colorimetric Microplate Bioassay for Bacitracin using Response Surface Methodology (RSM). *Current Analytical Chemistry*, v. 12, p. 620-627, 2016.

GAVIN, J.J. Microbiological process report. Analytical microbiology. I. The test organism. **Applied Microbiology**, v.4, p.323–331, 1956.

GAVIN, J.J. Microbiological Process Report Analytical Microbiology II. The Diffusion Methods. **Applied Microbiology**, v.5 (1), p.25–33, 1957.

GALVÃO, G.V.; SAVIANO, A.M.; LOURENÇO, F.R. Reduced incubation time for inhibition zone formation based on diffusion and growth mechanism elucidation. *Analytical Methods*, v. 8, p. 3885-3891, 2016.

GHISLENI, D.D.M.; OKAMOTO, R.T.; AMARAL, C.M.O.; LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. New microbiological assay for determination of caspofungin in the presence of its degradation products and its measurement uncertainty. **Journal of AOAC International**, v. 97(3), 2014, p. 908-912.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v.33, p.667-679, 2010.

HEWITT, W. **Microbiological Assay. An introduction to quantitative principles and evaluation**. Academic Press, cap. 2, p.17-69, 1977.

HEWITT, W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach. **CRC Press**, Boca Raton, Florida, 2004.

HSU, K.H.; CHEN, C. The effect of calibration equations on the uncertainty of UV-Vis spectrophotometric measurements. **Measurement**, v.43, p.1525-1531, 2010.

HUANG, J.; KAUL, G.; CAI, C.; CHATLAPALLI, R.; HERNANDEZ-ABAD, P.; GHOSH, K.; NAGI, A. Quality by design case study: An integrated multivariate approach to drug product and process development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382(1), 2009, p. 23-32.

ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

JOHNSON, T.L., FORBES, B.A., O'CONNOR-SCARLET, M., MACHINSKI, A., MCCLATCHEY, K.D. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. *Am J Clin Pathol.*, n.83 (3), 1985, p. 374 -378.

JUNIOR, W.A.P. Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of therapeutics. 11^a ed. McGraw-Hill, cap. 43, p. 1127-1154, 2006.

KAISER, C.R., CUNICO, W., PINHEIRO, A.C., OLIVEIRA, A. G., PERALTA, M.A., SOUZA, M.V.N. Oxazolidinonas: uma nova classe de compostos no combate à tuberculose. **Rev. Bras. Farm.** v.88 (2), pg. 83 -88, 2007.

KALMAN, D., BARRIERE, S.L. Review of the Pharmacology, Pharmacokinetics and Clinical use of Cephalosporins. **Texas Heart Institute Journal**, v.17, n.3, p. 203-215, 1990.

KATZUNG, B.G.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A.J. **Basic & Clinical Pharmacology**. 12^a Edição, McGraw-Hill, cap. 43, 44, 45, p. 790-829, 2012.

KIM S., THIESSEN P.A., BOLTON E.E., CHEN J., FU G., GINDULYTE A., HAN L., HE J., HE S., SHOEMAKER B.A., WANG J., YU B., ZHANG J., BRYANT S.H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093/nar/gkv951.

KUMAR, P., TARAFDAR, J. C. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. **Biol Fertil Soils**, v. 38, p.186–189, 2003.

LALPURIA, M.; KARWA, V.; ANANTHESWARAN, R.C.; FLOROS, J.D. Modified agar diffusion bioassay for better quantification of Nisaplin®. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, 2012, p. 663-671.

LEITO, I.; STRAUSS, L.; KOORT, E.; PIHL, V. Estimation of uncertainty in routine pH measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, p.242-249, 2002.

LINTON, A.H. Influence of inoculum size on antibiotic assays by the agar diffusion technique with *Klebsiella pneumonia* and streptomycin. **Journal of Bacteriology**, v. 76(1), 1958, p. 94-103.

LIONBERGER, R.A.; LEE, S.L.; LEE, L.; RAW, A.; YU, L.X. Quality by design: concepts for ANDAs. **The AAPS Journal**, v. 10(2), 2008, p. 268-276.

LOURENÇO, F.R. KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.4, p.437-443, 2005.

LOURENÇO, F.R. Simple estimation of uncertainty in the quantification of cefazolin by HPLC and bioassay. **Journal of Chromatography & Separation Techniques**, v.3, n.8, p.1-3, 2012.

LOURENÇO, F.R. Uncertainty measurement of microbiological assay for apramycin soluble powder. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32(5), 2013, p. 640-645.

LOURENÇO, F.R.; AMARAL, C.M.O., AZEVEDO, J.C.; PINTO, T.J.A. Estimativa da incerteza de medição em contagem microbiana pelo método de semeadura em profundidade a partir dos resultados de validação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, supl.1, p.181-183, 2004.

LOURENÇO, F.R.; BOTELHO, T.S.; PINTO, T.J.A. How pH, temperature, and time of incubation affect false-positive responses and uncertainty of the LAL gel-clot test. **PDA Journal of Pharmaceutical Science Technology**, v.66, n.6, p.542-546, 2012.

LOURENÇO, F.R.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Evaluating measurement uncertainty in microbiological assay of vancomycin from methodology validation data. **Journal of AOAC International**, v.90, n.5, p.1383-1386, 2007.

MASOUD, M.S.; ALI, A.E.; NASR, N.M. Chemistry, classification, pharmacokinetics, clinical uses and analysis of beta lactam antibiotics: A review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6 (11), 2014, p. 28-58.

MOAT, A. G., FOSTER, J. W. **Microbial Physiology**. 3rd edition. New York, Wiley-Liss, Inc., p.19-22, 1995.

MUELLER, N. Introducing the concept of uncertainty of measurement in testing in association with the application of the standard ISO/IEC 17025. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, p.79-80, 2002.

NIEMI, R.M.; NIEMELÄ, S.I. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.372-375, 2001.

OHARA, M.T., SAITO, T. Aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio no teste limite microbiano em medicamentos e cosméticos. Técnica de “pour plate”. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 29, n.2, p. 73-80, 1993.

OHARA, M.T., SAITO, T. Application of Triphenyltetrazolium Chloride in Microbial Limit Test of Pharmaceuticals and Cosmetics. **Journal of AOAC International**. v. 78, n. 6, 1995.

OSTRONOFF, C.S.; LOURENÇO, F.R. Measurement uncertainty of chromogenic LAL assays: reaction time and proportion of endotoxin and LAL reagent affect release of p-nitroaniline. **Journal of AOAC International**, v. 98(1), 2015, p. 51-55.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Dosagem microbiológica de antibióticos e fatores de crescimento. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4^a Edição, Manole, São Paulo, 2014, cap. 12, p. 331-365.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Hang & Dale Farmacologia**. 7^a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, cap. 50, p.622-637, 2012.

RATHORE, A.S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. **Trends in Biotechnology**, v. 27(9), 2009, p. 546-553.

SATO, S. Produção de antibióticos. In: AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial. Processos fermentativos e enzimáticos**. vol. 3. 1º ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, cap.5, p. 101-122, 2002.

SAVIANO, A.M. MADRUGA, R.O.G.; LOURENÇO, F.R. Measurement uncertainty of a UPLC stability indicating method for determination of linezolid in dosage forms. **Measurement**, v. 59, 2015, p. 1-8.

SAVIANO, A.M.; FRANCISCO, F.L.; LOURENÇO, F.R. Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty. **Talanta** v. 127, 2014, p. 225-229.

SAVIANO, A.M.; LOURENÇO, F.R. Uncertainty evaluation for determining linezolid in injectable solution by UV spectrophotometry. **Measurement**, v. 46, 2013, p. 3924-3928.

SAVIANO, A.M.; OSTRONOFF, C.S.; FRANCISCO, F.L.; LOURENÇO, F.R. Development, optimization, and validation of microplate bioassay for relative potency of linezolid using design space concept and its measurement uncertainty. **Journal of AOAC International**, v. 98, p.1267-1275, 2015.

SAVIANO, ALESSANDRO MORAIS; LOURENÇO, FELIPE REBELLO. Measurement uncertainty estimation based on multiple regression analysis (MRA) and Monte Carlo (MC) simulations – Application to agar diffusion method. **Measurement**, v. 115, p. 269–278, 2018.

SHAWALI, A.S., SAMY, N.A. Functionalized formazans: A review on recent progress in their pharmacological activities. *Journal of Advanced Research*, n. 6, 2015, p. 241–254.

SOOVÄLI, L.; RÕÕM, E.I.; KÜTT, A.; KALJURAND, I.; LEITO, I. Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, v.11, p.246-255, 2006.

SUÁREZ, C., GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.27(2), p.116-129, 2009.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3ª edição rev. e atual. São Paulo, Editora Atheneu, cap. 4, 5, 12 e 15, p.23 a 35; p.37 a 55; p. 207 a 230; p. 269-280, 2014.

TODAR, KENNETH. The Growth of Bacterial Populations. In **Todar's Online Textbook of Bacteriology**, 2012. Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/growth_3.html> Acesso em: 08/04/2019.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição. São Paulo, Editora Atheneu, cap. 10, p. 87-91, 2008.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35ª Edição, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2015.

WEITZEL, M.L.J. The estimation and use of measurement uncertainty for a drug substance test procedure validated according to USP <1225>. **Accreditation and Quality Assurance**, v.17, p.139-146, 2012.

WISHART, D. S., KNOX, C., GUO, A. C., SHRIVASTAVA, S., HASSANALI, M., STOTHARD, P., CHANG, Z., WOOLSEY, J. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Research**, v.34, Database issue, p.668-672, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, Geneva, 2019.

WU, H.; WHITE, M.; KHAN, M.A. Quality-by-design (QbD): An integrated process analytical technology (PAT) approach for a dynamic pharmaceutical co-precipitation process characterization and process design space development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405(1), 2011, p. 63-78.

WUNDERLI, S. Uncertainty and sampling. **Accreditation and Quality Assurance**, v.8, p.90, 2003.

YAMAMOTO, C.H.; PINTO, T.J.A. Rapid determination of neomycin by a microbiological agar diffusion assay using triphenyltetrazolium chloride. **Journal of AOAC International**, v. 79, 1996, p. 434-440.

YORIYAZ, H. Método de Monte Carlo: princípios e aplicações em Física Médica. *Revista Brasileira de Física Médica*, v.3 (1), p. 141-149, 2009.

YOSHIZAWA, S.; FOURMY, D.; PUGLISI, J. D. Structural origins of gentamicin antibiotic action. **The EMBO Journal**, vol.17, n.22 p. 6437–6448, 1998.

YU, L.X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharmaceutical Research*, v. 25(4), 2008, p. 781-791.