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

**Doseamento microbiológico de apramicina -
desenvolvimento e validação de método empregando leitura
cinética em microplacas**

Felipe Rebello Lourenço

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Prof. Tit. Terezinha de J. Andreoli Pinto

São Paulo
2009

Felipe Rebello Lourenço

**Doseamento microbiológico de apramicina -
desenvolvimento e validação de método empregando
leitura cinética em microplacas**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2009.

Ao Senhor *Jesus Cristo*, a quem devo todas
coisas, pelo amor e constante presença.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais *Luiz Antônio* e *Marisa*, a quem devo a existência, a formação e orientação de vida. Aos meus irmãos *Guilherme*, *Juliana* e *Pedro Henrique* pela compreensão e amizade. À minha avó *Nair*, meus tios e tias *Marli*, *Maria Alice* e *Darwin*, aos meus primos *Tiago*, *Marcos* e *Vinícius*.

À Prof. Tit. *Terezinha de Jesus Andreoli Pinto*, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo empenho e determinação em propiciar disponibilidade no suporte técnico e material.

Aos amigos do CONFAR - Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários e Produtos Afins e as Respektivas Matérias-Primas: *Andrea*, *Anna Carolina*, *Cleide*, *Daniela*, *Diane*, *Elisabete*, *Gláucia*, *Joseane*, *Marcus*, *Marly*, *Rita*, *Rosa*, *Sueli*, *Thiago*, *Vivianne* e *Wesley* pela amizade e apoio.

A todos que colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	19
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1. Dosagem microbiológica em tubos	33
2.1.1. Método de diluição seriada	33
2.1.2. Método turbidimétrico	38
2.1.3. Princípios do método turbidimétrico	43
2.1.4. Fatores de influência	45
2.1.4.1. Microrganismo-teste	45
2.1.4.2. Meio de cultura	46
2.1.4.3. Condições de Incubação	47
2.1.5. Curva dose-resposta	48
2.2. Ensaio empregando microplacas	51
2.2.1. Ensaio de antibióticos empregando microplacas	52
2.3. Validação de métodos analíticos	53
2.3.1. Planejamento e documentação da validação	57
2.3.1. Parâmetros de validação	59
2.3.1.1. Especificidade e seletividade	60

2.3.1.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear	61
2.3.1.3. Limite de detecção e quantificação	64
2.3.1.4. Exatidão	65
2.3.1.5. Precisão	67
2.4. Aminoglicosídeos e apramicina	69
2.4.1. Antibióticos Aminoglicosídeos	69
2.4.2. Apramicina	70
2.4.3. Métodos de Determinação de Antibióticos Aminoglicosídeos	73
2.4.4. Métodos de Determinação de Apramicina	75
3. OBJETIVOS	81
4. MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.1. Materiais	85
4.1.1. Meios de cultura	85
4.1.1.1. Caldo de triptona-soja	85
4.1.1.2. Agar de triptona-soja	86
4.1.2. Substância química de referência	86
4.1.3. Amostras	87
4.1.4. Microrganismo-teste	87
4.2. Métodos	88
4.2.1. Determinação das condições experimentais	88
4.2.1.1. Preparação das soluções padrão	88

4.2.1.2. Preparação do microrganismo-teste	88
4.2.1.3. Preparação das microplacas	89
4.2.1.4. Condições de incubação e leitura	90
4.2.2. Validação do método analítico	91
4.2.2.1. Especificidade e seletividade	92
4.2.2.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear	93
4.2.2.3. Limite de detecção e quantificação	93
4.2.2.4. Exatidão	93
4.2.2.5. Precisão	94
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	97
5.1. Determinação das condições experimentais	106
5.2. Validação do método analítico	116
5.2.1. Absorbância <i>vs.</i> Logaritmo da Concentração de Apramicina	116
5.2.1.1. Especificidade e seletividade	116
5.2.1.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear	117
5.2.1.3. Limite de detecção e quantificação	119
5.2.1.4. Exatidão	119
5.2.1.5. Precisão	121
5.2.2. Tempo de reação <i>vs.</i> Logaritmo da Concentração de Apramicina	122
5.2.2.1. Especificidade e seletividade	122
5.2.2.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear	122

5.2.2.3. Limite de detecção e quantificação	124
5.2.2.4. Exatidão	124
5.2.2.5. Precisão	126
5.2.3. Área sob a Curva <i>vs.</i> Logaritmo da Concentração de Apramicina	127
5.2.3.1. Especificidade e seletividade	127
5.2.3.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear	127
5.2.3.3. Limite de detecção e quantificação	129
5.2.3.4. Exatidão	129
5.2.3.5. Precisão	131
5.3. Comparação dos métodos de leitura de ponto final e leitura cinética	132
5.3.1. Comparação do ensaio em microplacas com outros métodos	135
6. CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos métodos analíticos.	55
Tabela 2. Conjunto de testes exigidos para validação de métodos analíticos.	56
Tabela 3. Avaliação de 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes através do método de leitura de ponto final, empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação	121
Tabela 4. Avaliação de 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes através do método de leitura cinético - tempo de reação, empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absorbância de 25 mAU	126
Tabela 5. Avaliação de 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes através do método de leitura cinético - área sob a curva, empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação	131
Tabela 6. Comparação dos resultados das validações dos métodos empregando leitura de ponto final, leitura cinética - tempo de reação - e leitura cinética - área sob a curva	133
Tabela 7. Comparação entre os métodos empregando leitura de ponto final, método de difusão em agar e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da apramicina.	71
Figura 2. Esquema de distribuição das soluções de sulfato de apramicina, nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90 e 100 µg/ml, controles negativos (CN) e controles positivos (CP) e da distribuição dos meios de cultura caldo de triptona-soja inoculados em proporções de 1, 3 e 5%.	90
Figura 3. Esquema de distribuição das soluções de padrão de sulfato de apramicina nas concentrações de 5 (P5), 10 (P10), 15 (P15), 20 (P20), 25 (P25), 30 (P30) e 35 (P35) µg/ml, das soluções das amostras nas concentrações de 10 (A10, B10 e C10), 15 (A15, B15 e C15), 20 (A20, B20 e C20), 25 (A25, B25 e C25) e 30 (A30, B30 e C30) µg/ml, controles negativos (CN) e controles positivos (CP) e da distribuição dos meios de cultura caldo de triptona-soja inoculado com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5%.	92
Figura 4. Gráfico de absorbância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina (µg/mL) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 1% como inóculo após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação.	99
Figura 5. Gráfico de absorbância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina (µg/mL) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 3% como inóculo após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação.	100
Figura 6. Gráfico de absorbância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina (µg/mL) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação.	101

Figura 7. Gráfico do logaritmo do tempo de reação (minutos) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) nas proporções de 3% e 5% como inóculo e diferenças de absorvância de 25 mAU, 50 mAU e 75 mAU.	103
Figura 8. Gráfico da área sob a curva (ASC) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) nas proporções de 1%, 3% e 5% como inóculo.	105
Figura 9. Gráfico de crescimento microbiano em meio de cultura caldo de caseína-soja inoculado com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5%, contendo apramicina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 $\mu\text{g/mL}$.	107
Figura 10. Gráfico de absorvância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação.	111
Figura 11. Gráfico de absorvância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação.	118
Figura 12. Gráfico de concentrações de amostras simuladas determinadas experimentalmente através do método de leitura de ponto final (empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação) vs. concentrações teóricas das amostras simuladas.	120
Figura 13. Gráfico de tempo de reação vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absorvância de 25 mAU.	123

- Figura 14.** Gráfico de concentrações de amostras simuladas determinadas experimentalmente através do método de leitura cinética - área sob a curva (empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absorbância de 25 mAU) vs. concentrações teóricas das amostras simuladas. 125
- Figura 15.** Gráfico de área sob a curva (ASC) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação. 128
- Figura 16.** Gráfico de concentrações de amostras simuladas determinadas experimentalmente através do método de leitura cinética - área sob a curva (empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação) vs. concentrações teóricas das amostras simuladas. 130

RESUMO

RESUMO

O princípio do ensaio turbidimétrico é simples: a solução-teste é adicionada à suspensão do microrganismo-teste em meio de cultura, a mistura é incubada em condições adequadas e o crescimento microbiano é medido através da leitura fotométrica. O emprego de método de microplacas com leitura cinética para a dosagem de antibióticos é de interesse considerável, uma vez que possibilita reduzir quantidade de material e tempo de análise necessários e permite o ensaio de grande número de amostras simultaneamente, com leitura e cálculo automatizados. O objetivo deste trabalho é determinar as condições experimentais ideais para o desenvolvimento de metodologia para a dosagem microbiológica de apramicina empregando microplacas e modo de leitura cinético, e validar o método desenvolvido, através da avaliação dos parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, faixa ou intervalo linear, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão. As condições estabelecidas abrangem curva-padrão de apramicina com concentrações entre 5 e 35 µg/ml, e emprego de meio de cultura caldo de triptona-soja inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5%. Foram obtidos resultados satisfatórios após 2 horas de incubação. O método desenvolvido apresentou especificidade e seletividade adequadas, linearidade na faixa de 5 a 35 µg/ml, limite de detecção e quantificação de 0,1 e 0,4 µg/ml, respectivamente, exatidão (recuperação = 98,5%) e precisão (DPR = 6,0%) satisfatórias. O ensaio em microplaca agrega características dos ensaios microbiológicos (avaliação da atividade do antibiótico frente a microrganismo-teste sensível) e físico-químicos (facilidade operacional e maior rapidez na obtenção dos resultados).

ABSTRACT

ABSTRACT

The turbidimetric assay principle is simple: the test-solution is added to a suspension of test-microorganism in culture media, the mixture is incubated in appropriate conditions and the microbial growth is measured by photometric reading. Microplate with kinetic reading mode employed in antibiotic assay is considerable interesting, once it allows reduction of material and analysis time and it permits that a great numbers of samples could be analyzed simultaneously, with automated reading and calculating. The aim of this work is to determinate best experimental conditions to development of methodology for microbiological assay of apramycin employing microplate and kinetic reading mode, and to validate the developed method, through evaluation of parameters of specificity and selectivity, linearity, linear range, limit of detection and quantification, accuracy and precision. Established conditions considered standard-curve of apramycin in concentrations from 5 to 35 $\mu\text{g/ml}$, and tryptic soy broth inoculated with 5% of *Escherichia coli* (ATCC 8739) suspension. Satisfactory results were obtained with 2 hours incubation. The developed method showed appropriate specificity and selectivity, linearity in the range from 5 to 35 $\mu\text{g/ml}$, limit of detection and quantification of 0,1 and 0,4 $\mu\text{g/ml}$, respectively, satisfactory accuracy (recuperation = 98,5%) and precision (RSD = 6,0%). Microplate assay considered characteristics of microbiological assay (evaluation of antibiotic activity against sensible test-microorganism) and physical-chemistry (operational facility and quicker results).

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes classes de fármacos, os antimicrobianos estão entre os mais comumente prescritos. A consequência inevitável do uso indiscriminado e, muitas vezes, incorreto dos agentes antimicrobianos é o surgimento de patógenos resistentes. O sucesso da terapia antimicrobiana está intimamente relacionado à concentração do antibiótico no local da infecção, devendo ser suficiente para inibir o crescimento do microrganismo responsável pela infecção (CHAMBERS, 2006).

Neste contexto, a confirmação da eficácia terapêutica dos medicamentos contendo agentes antimicrobianos é fundamental, principalmente quando a faixa terapêutica é relativamente pequena (PINTO et al., 2003). A atividade (potência) dos antibióticos pode ser demonstrada sob condições específicas através de seu efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismo-padrão sensível (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Os ensaios microbiológicos para quantificação da atividade de antibióticos são métodos relativos, que exigem o emprego de uma avaliação comparativa frente a uma substância química de referência (KAVANAGH, 1972; PINTO et al., 2003). A alta variabilidade, inerente ao ensaio microbiológico torna imprescindível a utilização de delineamentos experimentais adequados e a análise estatística dos resultados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Embora a dosagem de antibióticos possa ser determinada por métodos químicos e físico-químicos, os ensaios microbiológicos são, em geral, os métodos de escolha para eliminar dúvidas quanto à perda de atividade, não demonstradas pelos métodos químicos e físico-químicos. Particularmente, estes ensaios aplicam-se àqueles antibióticos de origem biológica, que podem conter misturas de substâncias, com

efeitos compatíveis, sinérgicos ou antagônicos (PINTO et al., 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Os métodos microbiológicos mais comumente utilizados para a dosagem de antibióticos são o método de difusão em agar e o método turbidimétrico. Ambos estão descritos em compêndios oficiais. Ao longo dos anos, os métodos descritos nas diversas farmacopéias têm sofrido alterações, principalmente no que diz respeito à natureza do diluente, microrganismo-teste e inóculo empregado, concentração da curva padrão e composição do meio de cultura, embora o fundamento seja o mesmo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009; BRITISH PHARMACOPEIA, 2008).

O ensaio microbiológico por difusão em agar relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento microbiano com a dose da substância ensaiada. Emprega meio de cultura sólido inoculado com microrganismo-teste, distribuído em placas, em sistemas de mono ou bicamada. A solução-teste é aplicada sobre a superfície do agar em um área restrita. O crescimento microbiano ocorre respeitando a área de difusão do antibiótico, gerando contraste e resultando na zona de inibição de crescimento (COOPER, 1963; PINTO et al., 2003).

O princípio do ensaio turbidimétrico é simples: a solução-teste é adicionada à suspensão do microrganismo-teste em meio de cultura, a mistura é incubada em condições adequadas e o crescimento microbiano é medido empregando leitura fotométrica. Entre as vantagens da utilização de meio de cultura líquido destacam-se: a rapidez, facilidade operacional, medida objetiva da resposta, não interferência de características de difusão, além de exatidão. As desvantagens incluem a necessidade de equipamento para a leitura da resposta e ausência de contaminação grosseira ou coloração da amostra que interfira na leitura fotométrica (KAVANAGH, 1963; PINTO et al., 2003).

Atualmente, os equipamentos fotométricos, em particular aqueles que permitem o uso de microplacas com leitura cinética, são considerados de grande utilidade e versatilidade para os laboratórios de microbiologia, tendo aplicações em ensaios cromogênicos, imunogênicos e turbidimétricos. A leitura cinética envolve a medida do incremento de parâmetros como densidade óptica, fluorescência ou bioluminescência observados na solução ou suspensão analisada a intervalos de tempo crescentes.

O emprego de método de microplacas com leitura cinética para a dosagem de antibióticos apresenta interesse considerável, uma vez que possibilita reduzir quantidade de material e tempo de análise necessários e permite o ensaio de grande número de amostras simultaneamente, com leitura e cálculo automatizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dosagem microbiológica em tubos

2.1.1. Método de diluição seriada

O método de diluição seriada emprega séries de tubos contendo meios de cultura líquido ou sólido, com concentrações crescentes da amostra testada. Os tubos são incubados após inoculação com o microrganismo-teste, sendo que a menor concentração que impede o crescimento microbiano, evidenciada através de recursos tais como alteração de pH, de potencial de oxi-redução do meio ou atividade hemolítica, é considerada ponto final. A potência da amostra é obtida por comparação do ponto final com série similar realizada em paralelo contendo concentração conhecida do antibiótico.

Em 1942, devido a desvantagem do método turbidimétrico quanto à necessidade de grande quantidade de amostra em solução, fator limitante na determinação de antibiótico em amostras de fluídos biológicos e exsudatos contendo penicilina, foi proposto teste de diluição utilizando o *Streptococcus hemoliticus* do grupo A, considerado 4 a 16 vezes mais sensível que o *Staphylococcus aureus*. Este ensaio, cujo princípio se fundamenta na intensidade de hemólise, exige cerca de 18 horas para sua execução e emprega 0,2 a 0,9 mL de amostra para o teste (RAMMELKAMP, 1942). Foi ainda realizado estudo comparativo deste método com o de difusão Oxford, tendo encontrado erro semelhante para ambos. Desvantagem do método em placas consistiu na variação da espessura e ressecamento do meio de

cultura, sendo o tamanho dos halos de inibição de crescimento limitado pelo tempo da fase *lag* de crescimento do microrganismo (HOBBY et al., 1942). Método de diluição em meio sólido foi também descrito, misturando-se soluções da penicilina, de diferentes concentrações, em meio fundido e distribuindo-se o gel em placas de Petri. Após solidificação foram semeados um ou mais microrganismos, com repiques em estrias (FOSTER & WOODRUFF, 1943).

O teste convencional de diluição em tubos para determinação do ácido aspergílico, utilizando o *Streptococcus pyogenes* cepa C203, exigia cerca de 18 horas (MCMAHAN, 1965). Este teste foi substituído por método rápido, que emprega *Photobacterium fischieri*, cepa proveniente da National Collection of Type Cultures (NCTC) e da American Type Culture Collection (ATCC), cuja intensidade de luminescência foi relacionada com a atividade antibacteriana, com resposta em cerca de 30 minutos após o preparo dos tubos (RAKE et.al. , 1942). Empregando método de diluição com microrganismo hemolítico, *Streptococcus pyogenes*, foram obtidos resultados satisfatórios com leitura em 60 a 90 minutos de teste (RAKE & JONES, 1943).

Em 1942, foi desenvolvido método titulométrico, com técnica de diluição, utilizando glicose no meio de cultura para compatibilizar o crescimento do *Staphylococcus aureus* na presença de indicador de Andrade, que apresenta viragem devido à presença de ácido. Sugeriu-se o emprego de meio de cultura de composição uniforme e inóculo proveniente da mesma cepa para se obter resultados comparáveis e constantes em diferentes laboratórios (FLEMING, 1942). Posteriormente, foi descrito micrométodo com finalidade de determinação da atividade da penicilina em amostras sangüíneas provenientes de pacientes, disponíveis em quantidades mínimas, utilizando lâmina como dispositivo para contato da amostra com o *Staphylococcus aureus*. No entanto, foram obtidos melhores resultados empregando *Streptococcus hemoliticus*, e

utilizando o sangue como indicador de crescimento, sendo que o crescimento microbiano foi detectado pela presença de hemólise (FLEMING, 1944). Outra alteração foi proposta, empregando tubo capilar, de forma a evitar o trabalho de preparação das lâminas. O meio de cultura constituído de mistura de glicose, vermelho fenol e soro, após incubação, possibilitou detectar o crescimento do estreptococo pelo aparecimento de precipitado de cor amarela intensa. A diferenciação entre capilares com ausência e presença de crescimento foi feita pela cor, sendo que onde o crescimento foi ausente, o meio de cultura apresentava-se vermelho ou vermelho-violeta (FLEMING, 1947).

Amostras sanguíneas, fluído cerebrospinal e urina foram ensaiadas por método que envolveu a fermentação da glicose em meio de soro aquoso inoculado com *Staphylococcus* cepa Oxford colocado em tubos capilares vedados. Foi observada a produção de ácido e conseqüente coagulação do soro, uniformemente colorido de rosa devido à presença de indicador, sendo esta a resposta observada como ponto final do teste. Este método mantém a vantagem de empregar pequena quantidade de amostra, e apresentar facilidade de observação do ponto final, além de exigir pouca manipulação e permitir suficiente exatidão para propósitos clínicos (FIELDING, 1947).

Substâncias ácidas, como a penicilina, são mais ativas em meio ácido, e substâncias alcalinas, como a estreptomicina, em meio alcalino. Assim, no método de diluição, a formação de ácido durante a incubação torna a penicilina mais ativa, fazendo com que a viragem seja pouco nítida. Por outro lado, a estreptomicina torna-se menos ativa em meio ácido, proporcionando ponto final de viragem nítido (ABRAHAM & DUTHIE, 1946).

Na avaliação quantitativa da estreptomicina, foram estudadas a influência do meio de cultura, das condições de incubação, da natureza do microrganismo e do

tamanho do inóculo na definição do ponto final do teste de diluição em tubos. Foi recomendado método de ensaio com meio de cultura adicionado de 1% de glicose e vermelho fenol empregando *Klebsiella* como reagente biológico. De acordo com o meio de cultura, diferentes observações do ponto final do teste foram obtidas. Com caldo peptonado, o aparecimento visível de turbidez do meio indica o ponto final. Na presença de vermelho fenol e crescimento bacteriano o indicador inicialmente vermelho adquire coloração amarela. O meio de cultura contendo sangue apresentou ótima visualização do ponto final devido à hemólise provocada pelos microrganismos do gênero *Klebsiella*. O trabalho mostrou a influência da condição de anaerobiose na resposta dos microrganismos *Klebsiella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* (MAY et al., 1947).

Diferentes meios de cultura líquidos foram testados com estreptococo hemolítico, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, bacilo de Friedlander e outros, sendo que resultados favoráveis foram conseguidos com soro aquoso contendo glicose e vermelho de fenol. O meio de soro ou caldo diluídos 10 vezes em água proporcionou resultados adequados, quando comparado com os não diluídos, inoculados com carga microbiana em quantidade considerável, sendo que nestes a redução do inóculo tornou os resultados irregulares. O trabalho envolveu estudo em condição de anaerobiose, quando ocorreu a exigência de concentrações maiores de estreptomicina para inibir completamente o crescimento em tubos capilares selados. (MAY et al., 1947).

Outro recurso titulométrico foi conseguido através da determinação de amônia liberada a partir de uréia quando o microrganismo-teste é produtor da urease. O vermelho fenol, presente no meio de cultura, passa para coloração amarela quando o pH atinge valor da ordem de 8,3 (VALENTINE & JOHNS, 1949).

Método utilizando o *Streptococcus agalactiae* demanda apenas 30 minutos de incubação quando empregado inóculo na fase logarítmica de crescimento, condição em

que a turvação aumentou de 2 a 3 vezes. A diluição das amostras foi realizada com seringas padronizadas e os meios de cultura, distribuídos rapidamente com máquina de enchimento de ampolas, permitindo maior rapidez na execução do teste (BERRIDGE & BARRETT, 1951)

Laboratórios da rede oficial de saúde norte-americana e européia empregavam procedimento para diagnóstico de doenças infecciosas e no estudo da terapia adequada, com vários antibióticos rotineiramente utilizados em setores da saúde pública. O ensaio de escolha foi o método de diluição em tubos, por permitir resultados mais exatos e com distinção entre níveis bacteriostático e bactericida. Recomenda-se controle dos meios de cultura, avaliação quanto à condição de esterilidade de cada lote, à capacidade de crescimento dos microrganismos-teste nos mesmos e conhecimento de sua sensibilidade frente ao antibiótico em questão (FALK, 1953).

Várias técnicas para o ensaio de nisina empregando o teste de diluição em tubos foram descritas. O procedimento foi alterado quanto à medida da resposta em densidade óptica e envolvendo período de aproximadamente 30 minutos de incubação, permitindo a determinação da penicilina, estreptomicina, aureomicina e gramicidina (BERRIDGE & BARRETT, 1952).

2.1.2. Método turbidimétrico

O método turbidimétrico é similar ao teste de diluição, mas o efeito inibitório do antibiótico não se caracteriza por resposta tudo ou nada para a determinação do ponto final, e sim por redução gradual do crescimento microbiano. Caracteriza-se por séries de tubos contendo diferentes concentrações de antibiótico, além de meio de cultura líquido e microrganismo-teste. Dados de leitura turbidimétrica originados após incubação permitem construção de curva que relaciona a concentração do antibiótico com a turbidez resultante.

No método turbidimétrico, inicialmente descrito em 1942, foi constatado que quantidades crescentes de penicilina produziam, proporcionalmente, inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* cepa Oxford, permitindo realizar determinações quantitativas em caldo nutriente. Desta forma foi desenvolvido método simples, rápido e relativamente sensível. Neste método várias diluições da amostra desconhecida foram comparadas quanto à inibição de crescimento do microrganismo, em paralelo a várias diluições da substância padrão. Inicialmente foi utilizado período de incubação de 16 horas, reduzido posteriormente para 4 horas (FOSTER, 1942).

A técnica de 4 horas foi fundamental para a determinação da atividade da penicilina durante o processo produtivo, quando quantidade máxima de penicilina era atingida em caldos de fermentação. As culturas de *Penicillium notatum* mantinham a potência por um período relativamente curto. Neste tipo de análise, alta concentração de microrganismo era utilizada como inóculo para acelerar a visualização de crescimento microbiano, o que acarretava diminuição da sensibilidade do método. Para ensaios requerendo exatidão, aquele com 16 horas de incubação permaneceu como de escolha, utilizando pequeno inóculo. Outra recomendação diz respeito ao emprego de microrganismo com crescimento rápido, como *Bacillus adhaerans*, que possuía

sensibilidade à penicilina equivalente ao *Staphylococcus aureus* cepa H (FOSTER & WOODRUFF, 1943).

Estudos das variáveis envolvidas em teste turbidimétrico com período de incubação de 3 a 4 horas demonstraram que os resultados apresentavam precisão satisfatória. Através de estudo comparativo, avaliou-se que o método turbidimétrico apresentou maior precisão em relação ao teste de diluição em tubos, mas semelhante ao de difusão (MCMAHAN, 1944; FOSTER, 1942). Quanto ao aspecto de custo, o teste turbidimétrico foi relativamente vantajoso (MCMAHAN, 1944).

Em trabalho com dosagens de penicilinas foram observadas irregularidades na curva de crescimento do *Staphylococcus aureus*, quando da presença de glicose no meio de cultura, que permitiram concluir que o retardamento no crescimento microbiano na presença de penicilina foi devido ao prolongamento do tempo de geração das bactérias (FOSTER & WILKER, 1943). Contudo, também foram obtidos resultados conflitantes, em que apesar da glicose, a curva de crescimento se manteve regular (BOND & DAVIES, 1948).

Em 1944, foi proposto ensaio turbidimétrico para dosagem de penicilina com 4 horas de incubação, seguidas de leitura da densidade óptica. Este método empregava séries de 9 tubos com concentrações aumentadas em progressão aritmética, de padrão e amostra (JOSLYN, 1944). Outros métodos turbidimétricos propostos na mesma época apresentaram possibilidade de leitura em cerca de 3 a 4 horas, utilizando *Streptococcus* (RAKE & JONES, 1944), e em 90 minutos, empregando cepa de *Streptococcus* do grupo B de Lancefield, com exatidão adequada para determinação da penicilina (LEE et al., 1944).

Os procedimentos técnicos foram também melhorados pelo emprego de dispositivos auxiliares, tornando os métodos estabelecidos mais rápidos. Com esta finalidade, foram introduzidos o uso de tubos padronizados em que a turvação poderia

ser lida diretamente no aparelho (JOSLYN, 1944) e de pipetas especiais para rápida e exata medida das soluções-teste (MCMAHAN, 1944). Foi ainda incluída modificação na técnica para interromper o crescimento dos microrganismos através da colocação de todos os tubos, ao mesmo tempo, em banho de água quente (MCMAHAN, 1944). Foi também recomendada a utilização de banho de água provido de agitação durante a incubação dos tubos, assim, as melhorias abrangeram manter a temperatura uniforme durante a incubação, seguida da leitura da suspensão, auxiliada pela técnica de esvaziamento dos tubos por sucção (MCMAHAN, 1944; BOND & DAVIES, 1948).

Em 1948, foram relatados resultados experimentais a respeito dos fatores que influenciam a exatidão do ensaio turbidimétrico. Neste trabalho utilizou-se *Staphylococcus aureus* cepa Oxford NCTC 6571 e cepa americana NRRL 313. Foi proposta metodologia empregando 3 concentrações do padrão e da amostra. A relação entre a medida de turvação e o logaritmo da concentração do antibiótico apresentou resposta linear, cujas retas eram paralelas. No estudo comparativo obteve-se erro padrão de 10%, 4% e 4%, respectivamente, para o método de diluição em tubos, de cilindros em placas e turbidimétrico. Destacou-se como desvantagens do método de diluição seriada em relação ao turbidimétrico a exigência de esterilidade do meio de cultura e das soluções-teste da penicilina, a necessidade de grande número de tubos para cada amostra e representativo erro padrão do método. Por outro lado, as vantagens do método turbidimétrico abrangem o emprego de uma série do padrão para todas as amostras ensaiadas simultaneamente, além de tempo de incubação de no máximo 4 horas, tornando dispensável a esterilidade das soluções-teste (BOND & DAVIES, 1948).

No sentido de desenvolver método que fosse adequado para determinar a potência de antibióticos em preparações experimentais, foram estudadas curvas de crescimento de bactérias patogênicas em várias condições. Parte inicial do estudo

revelou que, após período de incubação de 4 horas, o crescimento atinge ponto máximo e começa a decair. Porém, na presença de antibiótico, o crescimento foi alterado de maneira regular quando na presença de concentrações crescentes do antibiótico e de maneira menos ordenada quando a concentração da substância antimicrobiana era muito alta. A segunda parte do estudo mostrou vantagem na supressão da fase lag de crescimento, através da utilização de inóculo jovem. Definiu-se o inóculo adequado como sendo a menor quantidade de cultura susceptível, que produzisse a turbidez desejada em 3 a 4 horas, considerando a sensibilidade do inóculo a baixas concentrações do antibiótico. O ponto final do teste foi estabelecido através de inibição do crescimento do microrganismo-teste em 50% com relação ao tubo controle (JOSLYN & GALBRAITH, 1950).

Em 1957, foi publicada extensa revisão para método turbidimétrico de determinação de antibióticos e vitaminas, destacando vantagens e desvantagens. Neste trabalho, o ensaio turbidimétrico foi classificado em 2 categorias, tendo por base o tipo de resposta. A primeira envolvia resposta tudo ou nada, do tipo semi-quantitativo, e a segunda, resposta gradual, método quantitativo. Os fatores influenciando o método turbidimétrico e os procedimentos de leitura da turvação foram relatados juntamente com estudos da precisão dos resultados, evidenciando limites de erro que variaram de 2% a 20% (GAVIN, 1957). Outro trabalho de revisão, publicado em 1959, também relatou vantagens e desvantagens do ensaio turbidimétrico. O estudo, incluindo desenvolvimento e aplicação do método, envolveu o conhecimento da utilização adequada de padrões de referência, microrganismos, meios de cultura, preparação das soluções-teste, procedimentos técnicos na preparação dos tubos, medida da resposta do teste e exigências das condições do teste para obtenção de respostas uniformes e precisas. Foram destacadas a importância na utilização de padrão de referência puro, microrganismo sensível à substância testada, meio de cultura de composição conhecida, amostras preparadas com precisão e em

condições de liberar os princípios ativos, eliminação dos interferentes, preparação dos tubos de ensaio e resposta medida com exatidão através da titulometria, turbidimetria, gravimetria ou outra técnica adequada (LOY & WRIGHT, 1959).

O método de ensaio turbidimétrico automático empregando detecção do dióxido de carbono apresenta limitações, devido a sua utilização ser restrita aos microrganismos capazes de produzir alta taxa de dióxido de carbono sob as condições de análise. Este ensaio foi estabelecido para determinação de vários antibióticos, com exceção da polimixina B e neomicina, pelo fato do microrganismo-teste, *Streptococcus faecalis* Squibb 1648, ATCC 10541, apresentar resistência aos mesmos. Foram necessárias 24 horas para ensaio de 50 amostras, sendo 8 horas com a execução técnico-operacional e 16 restantes envolvendo incubação e leitura das respostas (PLATT et al., 1965).

Em 1965, foram estabelecidas as etapas básicas de automação do ensaio turbidimétrico de antibióticos e vitaminas, tendo como finalidade a transferência de trabalho altamente repetitivo para as máquinas, diminuindo erros, bem como a fadiga e monotonia inerentes ao procedimento analítico. A economia de mão de obra foi de cerca de 30% e a taxa de processamento, 50 testes por hora (MCMAHN, 1965). Ainda considerando a automação nas etapas críticas do ensaio turbidimétrico, foi demonstrado que esta resultou em aumento significativo da precisão e exatidão. A interpolação de dados da amostra através de um computador em sistema on-line permitiu a obtenção do resultado após 5 minutos da última leitura da amostra. O sistema foi utilizado para estudar a adequacidade de 4 fórmulas de interpolação no ensaio de clortetraciclina e eritromicina, presentes em rações (KAVANAGH, 1975).

Considerando a exatidão e precisão do método turbidimétrico em relação ao de difusão, o primeiro apresenta vantagens. O ensaio turbidimétrico apresenta ainda inclinação da curva padrão adequada na faixa de absorbância entre 0,4 a 1,2. Destaca-

se também a importância da seleção do espectrofotômetro usado para medir o crescimento bacteriano com a finalidade de assegurar medidas exatas (RIPPERE, 1979).

2.1.3. Princípios do método turbidimétrico

Os ensaios microbiológicos turbidimétricos têm sido empregados para a avaliação de antibióticos desde o início do uso da penicilina (KAVANAGH, 1963). O entendimento do ensaio turbidimétrico para avaliação de antibióticos é baseado em dois conceitos: (a) a interação entre o microrganismo-teste e o antibiótico e (b) o significado da medida da turbidez (KAVANAGH, 1972).

A interação entre microrganismo-teste e antibiótico ocorre de forma que o antibiótico inibe o crescimento microbiano. Desta forma, a turbidez resultante do crescimento microbiano é inversamente proporcional à concentração do antibiótico presente no meio de cultura. É requisito para um ensaio turbidimétrico adequado que o antibiótico interaja com o microrganismo-teste de forma a alterar sua cinética de crescimento, e permitir que a resposta (turbidez relacionada à concentração do antibiótico) possa ser elucidada (KAVANAGH, 1972).

A cinética de crescimento do microrganismo-teste na presença do antibiótico pode ser alterada de diversas formas:

- a) o antibiótico mata toda população de microrganismo-teste;
- b) o antibiótico mata parte da população de microrganismo-teste;
- c) o antibiótico reduz a velocidade de crescimento do microrganismo-teste de forma uniforme;
- d) o antibiótico reduz a velocidade de crescimento do microrganismo-teste de forma não uniforme;
- e) o antibiótico prolonga a fase *lag* do microrganismo-teste;
- f) combinações de algumas das interações antibiótico/microrganismo-teste apresentadas acima.

Ainda, estas interações antibiótico/microrganismo-teste podem depender da concentração do antibiótico. (KAVANAGH, 1972)

O emprego de meio líquido e o parâmetro de resposta apresentam como vantagens a rapidez, facilidade operacional, medida objetiva da resposta, não interferência dos efeitos de difusão e exatidão. As desvantagens incluem a necessidade de equipamento para leitura da resposta, e ausência de contaminação grosseira ou coloração da amostra que interfira na leitura fotométrica (GAVIN, 1957; KAVANAGH, 1963; HEWITT, 1977 e RIPPERS, 1979).

2.1.4. Fatores de influência

2.1.4.1. Microrganismo-teste

O microrganismo-teste deve ser sensível ao antibiótico avaliado e deve crescer no meio de cultura líquido de forma diferenciada em função da concentração do antibiótico. O crescimento microbiano é dividido em 4 fases:

- a) fase *lag*;
- b) fase *log* ou de crescimento exponencial;
- c) fase estacionária
- d) fase de decaimento ou morte microbiana.

A fase *lag* corresponde a período de adaptação do microrganismo às condições em que se encontra, trata-se de período em que não ocorre crescimento microbiano ou este é lento. Depende do microrganismo assim como de condições como presença de nutrientes, pH, temperatura, entre outras (COOPER, 1963).

Durante a fase *log* (ou de crescimento exponencial) o crescimento microbiano ocorre de forma rápida. As bactérias, quando em condições adequadas, dividem-se num determinado intervalo de tempo (tempo de geração) de forma que a população microbiana aumenta em progressão geométrica. O tempo de geração é inerente ao microrganismo e depende da presença de nutrientes, do pH e da temperatura (COOPER, 1963). A turbidez resultante do crescimento microbiano e decorrente da interação entre antibiótico e microrganismo-teste é influenciada pelas fases *lag* e *log* de crescimento (COOPER, 1963 e PINTO et al., 2003).

Na fase estacionária o crescimento microbiano é interrompido devido a diminuição da quantidade de nutrientes e ao acúmulo de substâncias produzidas pelo metabolismo microbiano durante a fase *log*. A falta de nutrientes e acúmulo de metabólitos leva a morte microbiana (COOPER, 1963).

O inóculo a ser empregado no doseamento microbiológico de antibióticos pode ser preparado em meio de cultura similar ou idêntico ao empregado no ensaio. Usualmente, o microrganismo-teste é inoculado em tubo contendo meio de cultura líquido, incubado durante a noite e diluído a um volume fixo pré-determinado. (KAVANAGH, 1963 e PINTO et al., 2003).

A proporção de microrganismo-teste empregado como inóculo depende do tempo de incubação do ensaio. Quantidades pequenas de inóculo (10^2 a 10^3 células/tubo) são empregadas para ensaios de longo período de incubação, enquanto que grandes quantidades de inóculo (10^5 a 10^6 células/tubo) são empregadas em ensaios com curto período de incubação. A influência do tamanho do inóculo deve ser avaliada para cada método, meio de cultura, microrganismo-teste e substância ensaiada (KAVANAGH, 1963).

2.1.4.2. Meio de cultura

A velocidade de crescimento na ausência de agentes inibidores é afetada pela composição do meio, pH, temperatura de incubação e aeração, bem como pela capacidade de síntese, inerente ao microrganismo-teste. Usualmente, o meio de cultura é uma mistura de peptonas de origem natural, sais e água, podendo também conter açúcares e agentes tamponantes. As peptonas podem ou não apresentar todos

os nutrientes na proporção ideal para o crescimento microbiano rápido. A adição de açúcares pode aumentar a velocidade e prolongar o crescimento microbiano (KAVANAGH, 1963).

O meio de cultura empregado no ensaio deve promover o crescimento do microrganismo-teste de forma adequada ao período de incubação. Para ensaios com período de incubação curto é indicado o uso de meio de cultura capaz de promover crescimento microbiano rápido. Ensaaios com período de incubação longo não exigem meio de cultura capaz de promover crescimento microbiano rápido (KAVANAGH, 1963).

A composição dos meios de cultura empregados para a dosagem de antibióticos deve ser tal que não interfira na resposta gradual do microrganismo-teste em função das diferenças na concentração de antibiótico (PINTO et al., 2003).

O pH do meio de cultura pode afetar o crescimento microbiano e principalmente influenciar na atividade do antibiótico ensaiado. A atividade de antibióticos ácidos aumenta e a de antibióticos básicos diminui com a redução do pH do meio de cultura. Conseqüentemente, se o pH do meio de cultura varia de forma significativa durante o período de incubação do ensaio, a atividade do antibiótico avaliado frente ao microrganismo-teste pode se alterar (KAVANAGH, 1963).

2.1.4.3. Condições de Incubação

Embora a faixa de temperatura especificada na maioria dos procedimentos seja de 36 a 38 °C, esta pode não ser a temperatura ótima para um ensaio particular. A redução da temperatura de incubação faz diminuir a velocidade de crescimento e

aumenta o tempo de incubação para que se atinja o crescimento microbiano ideal, onde a sensibilidade da resposta seja ótima, verificada pela inclinação da curva dose-resposta. Um problema prático durante o período de incubação diz respeito à condução térmica desigual nos diversos tubos de ensaio, prejudicando aqueles mais internos das estantes, o que ocorre quando se utiliza estufa de incubação. Este problema é menos marcante quando se trata de banho de água, particularmente aqueles com sistema de circulação (PINTO et al., 2003).

Durante o período de incubação, as bactérias podem lentamente sedimentar no fundo do tubo, onde a quantidade de oxigênio é limitada e pode interferir no crescimento microbiano. Desta forma, a incubação sob agitação, periódica ou constante, pode ser exigência indispensável para alguns microrganismos-teste, sendo também interessante para obter a redução do período de incubação (KAVANAGH, 1963 e PINTO et al., 2003).

O tempo de incubação necessário para atingir o crescimento microbiano ideal depende da composição do meio de cultura, do pH, da temperatura de incubação, do tamanho do inóculo, da aeração e do microrganismo-teste. A inclinação da curva-padrão aumenta com o aumento do tempo de incubação, facilitando as leituras das amostras do antibiótico. Formas alternativas de relacionar a resposta fotométrica com a concentração do antibiótico podem ser empregadas com a finalidade de reduzir o tempo de incubação (KAVANAGH, 1963).

2.1.5. Curva dose-resposta

A curva dose-resposta é parte fundamental do doseamento microbiológico de antibióticos. Uma curva dose-resposta construída inadequadamente, seja por motivos

teóricos ou práticos, é causa comum de erro no ensaio de antibióticos. A curva dose-resposta significa a relação entre a turbidez resultante do crescimento microbiano e a concentração do antibiótico avaliado (KAVANAGH, 1972).

Os dois parâmetros do crescimento microbiano afetados pela presença do antibiótico são o tempo de geração e o tempo da fase *lag*. O tempo de geração é zero e o período de da fase *lag* é infinito quando o microrganismo está morto. A maior parte dos antibióticos atua reduzindo o tempo de geração, enquanto que algumas substâncias atuam promovendo o aumento do período da fase *lag* (KAVANAGH, 1972).

Considerando:

- a) A temperatura de incubação, as mudanças de pH e composição do meio de cultura decorrentes do período de incubação exercem influências insignificantes;
- b) As condições de incubação idênticas em todos os tubos;
- c) No término do período de incubação, o crescimento microbiano ainda está na fase *log*;
- d) O período da fase *lag* é função da concentração de antibiótico: $L = L_0 + aC$ (onde L é o período da fase *lag*, L_0 é o período da fase *lag* na ausência do antibiótico, a é uma constante e C é a concentração de antibiótico);
- e) O tempo de geração para uma determinada concentração de antibiótico é constante durante o período de incubação;
- f) O tempo de geração é função da concentração de antibiótico: $k = k_0 + kaC$ (onde k é o tempo de geração, k_0 é o tempo de geração na ausência do antibiótico, ka é o coeficiente de inibição e C é a concentração do antibiótico);
- g) O antibiótico não é consumido pelo microrganismo-teste;

h) O crescimento microbiano, na ausência do antibiótico, é função do tempo de geração e do período da fase lag: $N = N_0 \exp k (t - L)$ (onde N é o número de células após tempo t , N_0 é o número de células inicial, k é o tempo de geração, t é o tempo de incubação e L é o período da fase *lag*).

Tem-se:

$$N = N_0 \exp (k_0 - k_a C) [t - (L_0 + aC)]$$

ou

$$\log N = 0,4343 (k_0 - k_a C) [t - (L_0 + aC)] + \log N_0$$

2.2. Ensaio empregando microplacas

Atualmente, os equipamentos fotométricos, em particular aqueles que permitem o uso de microplacas com leitura cinética, são utilizados em diversas aplicações. Usualmente são dotados de softwares que permitem a leitura e cálculo de resultados de forma automatizada. Ensaio para quantificação de endotoxina bacteriana (TAMURA et al., 1990; TAMURA et al., 1991; TAMURA et al., 1992; TAMURA et al., 1993), estudos de atividade biológica (BARRET et al., 1997; HOLOWACHUK et al. 2003; LEHTINEN et al., 2006), ensaios microbiológicos (BAMBA et al., 1997; BURTON et al., 2007; PETTIT et al., 2005) e envolvendo biologia molecular (BORISEVICH et al., 2008; MAYO & CURNUTTE, 1990; ZHONG & SMITH, 1994) empregam sistema de microplacas com modo de leitura cinético, permitindo análise de grande número de amostras de forma rápida e confiável. Os equipamentos leitores de microplacas permitem que os dados sejam processados de três maneiras diferentes:

- a. Leitura de ponto final: neste modo é realizada uma única leitura de densidade óptica, fluorescência ou bioluminescência após um determinado período de tempo;
- b. Leitura cinética - tempo de reação: neste modo são realizadas leituras em intervalos de tempo pré-estabelecidos e é medido o tempo necessário para que ocorra um determinado incremento de densidade óptica, fluorescência ou bioluminescência;
- c. Leitura cinética - área sob a curva: neste modo são realizadas leituras de densidade óptica, fluorescência ou bioluminescência em intervalos de tempo pré-estabelecidos e é determinada a área sob a curva obtida a partir das leituras.

2.2.1. Ensaios de antibióticos empregando microplacas

Ensaios de avaliação da atividade bacteriostática, bactericida e bacteriolítica de antibióticos tem sido realizados empregando sistemas de microplacas com leitura cinética da densidade óptica, fluorescência e bioluminescência (LEHTINEN et al., 2006; SMITH et al., 2008). Estes ensaios têm como objetivo principal avaliar as atividades de diferentes antibióticos frente a cepas microbianas isoladas de situações clínicas.

Os sistemas de microplacas ainda têm sido empregados na avaliação da atividade microbiológica de fluidos biológicos (HOLOWACHUK et al. 2003) e na detecção de resíduo de antibióticos em alimentos (LAMAR & PETZ, 2007). Estes ensaios são realizados empregando modo de leitura cinético com determinação da área sob a curva de crescimento microbiano.

Numa nova abordagem, o ensaio turbidimétrico para avaliação de antibióticos pode ser realizado pelo emprego de microplacas. Esta abordagem permite que o ensaio seja realizado numa única microplaca com 96 orifícios, dispensando o uso de diversos tubos de ensaio. O ensaio de microplacas demanda uma quantidade significativamente reduzida de materiais como soluções e meios de cultura. As leituras de absorbância são realizadas em espectrofotômetro não dedicado. Os banhos-maria necessários para o ensaio turbidimétrico convencional são dispensados no ensaio em microplacas, uma vez que a incubação é realizada no próprio espectrofotômetro (BRADY & KATZ, 1991). Estes ensaios empregam leitura da densidade óptica após um determinado tempo de incubação (modo de leitura de ponto final).

2.3. Validação de métodos analíticos

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, pela validação, que os métodos de ensaio efetivamente conduzam a resultados confiáveis e adequados, considerando-se a aplicação e nível de qualidade pertinente. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (RE 899, 2003; PINTO et al., 2003 e ICH, 1996).

Há diversas definições para o termo validação de métodos analíticos. Algumas destas estão expressas a seguir:

- "A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados" (RE 899, 2003).
- "Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer" (ICH, 1996).
- "Processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer" (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Aspecto imprescindível para execução do ensaio de doseamento de antibiótico, qualquer que seja a técnica empregada (em placas ou em tubos), consiste na validação (PINTO et al., 2003). Na validação do doseamento de antibióticos devem ser aplicados todos os conceitos inerentes a estrutura laboratorial, considerando-se pessoal e instalação, de maneira a dar sustentabilidade aos parâmetros de exatidão, precisão,

especificidade, entre outros (PINTO et al., 2003). Deve também ser considerada a validação do processo extrativo, quando aplicável, além do ensaio e automação, quando pertinentes (PINTO et al., 2003).

A validação total deve ser realizada antes da implementação de um método analítico e/ou bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos, e validações parciais quando ocorrerem modificações do método validado. As etapas de validação parcial podem variar desde uma pequena determinação, como a exatidão e precisão intra-ensaio, até atingir a proximidade de uma validação total. Para proceder à validação de um método é importante que todos os equipamentos e materiais estejam devidamente calibrados e os analistas adequadamente treinados e qualificados. Deve-se utilizar substâncias químicas de referência e/ou padrões biológicos oficializados pela Farmacopéia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RE 899, 2003).

Os testes são classificados em 4 categorias, conforme a Tabela 1 (RE 899, 2003).

Tabela 1. Classificação dos métodos analíticos.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução e liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Para cada categoria é exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 2 (RE 899, 2003).

Tabela 2. Conjunto de testes exigidos para validação de métodos analíticos.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quanti- tativo	Ensaio Limite		
Especificidade	SIM	SIM	SIM	*	SIM
Linearidade	SIM	SIM	NÃO	*	NÃO
Intervalo ou faixa	SIM	SIM	*	*	NÃO
Precisão Repetibilidade	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Intermediária	**	**	NÃO	**	NÃO
Limite de detecção	NÃO	NÃO	SIM	*	NÃO
Limite de quantificação	NÃO	SIM	NÃO	*	NÃO
Exatidão	SIM	SIM	*	*	NÃO
Robustez	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

O teste de doseamento de antibióticos, empregado na determinação da potência de matérias-primas ou do princípio ativo em produtos farmacêuticos, é considerado como de categoria 1. Assim, os parâmetros necessários para a validação do método analítico são: especificidade e seletividade, linearidade, faixa ou intervalo linear,

exatidão e precisão. Considerando ainda que o método microbiológico também pode ser aplicado na determinação de resíduos de antibióticos (por exemplo, presente em alimentos, etc.) devem ser avaliados os limites de detecção e quantificação (RE 899, 2003; PINTO et al., 2003; SWARTZ & KRULL, 2003; ICH, 1996 e WOOD, 1999).

2.3.1. Planejamento e documentação da validação

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e qualificados. Da mesma forma, o analista que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo, ter conhecimento suficiente sobre o trabalho e ser capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo.

No planejamento e execução da validação, sugere-se uma seqüência de trabalho como a que se segue (SWARTZ & KRULL, 2003 e WOOD, 1999):

- Definir a aplicação, objetivo e escopo do método;
- Definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
- Desenvolver um procedimento operacional para validação;
- Definir os experimentos de validação;
- Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;

- Executar os experimentos preliminares de validação;
- Ajustar os parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário;
- Executar experimentos completos de validação;
- Preparar um procedimento operacional para execução do método, na rotina;
- Definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc), e
- Definir tipo e frequência de verificações de controle da qualidade analítica para a rotina.

Uma vez cumpridas todas as etapas do processo de validação, é importante documentar os procedimentos de forma que o método possa ser implementado de maneira clara e sem ambigüidades. A documentação apropriada auxilia na aplicação consistente do método. Isto porque durante o processo de validação, assume-se que uma vez implantado o método, ele será sempre executado conforme descrito; caso contrário o desempenho real do método não irá corresponder àquele previsto nos dados de validação. Portanto, a documentação deve minimizar o risco de variação acidental no método.

É preferível que, ao se escrever um método de ensaio, as informações sejam descritas, tanto quanto possível, na ordem em que o usuário vai precisar delas. Não se pode assumir que todos irão entender como funciona o método com a mesma profundidade do técnico que o desenvolveu e documentou.

Os métodos documentados formam uma parte importante do sistema da qualidade do laboratório e devem estar sujeitos a um controle eficaz de documentos, assegurando desse modo que somente métodos e procedimentos validados sejam utilizados. O método documentado deve informar quando foi autorizado para uso e se está completo.

O procedimento deve ser revisado, de acordo com a periodicidade estabelecida para revisão dos documentos do sistema da qualidade ou quando ocorrer qualquer modificação significativa no método. A sistemática de controle de documentos do laboratório deve permitir a retirada de circulação dos documentos obsoletos e emissão de métodos revisados. As alterações devem ser realizadas somente por pessoas autorizadas.

Convém que um procedimento de ensaio seja coerente, claro, correto e tão completo quanto necessário, dentro dos limites estabelecidos pelo seu campo de aplicação. Um formato padronizado assegura que nenhum ponto importante tenha sido esquecido, que as informações a serem incluídas no procedimento sejam fornecidas sempre na mesma ordem e que qualquer item desejado possa ser encontrado rapidamente.

2.3.1. Parâmetros de validação

Enquanto no segmento analítico de ensaios físico-químicos os parâmetros de validação foram precocemente desenvolvidos e aplicados, nos ensaios biológicos, e em particular nos doseamentos microbiológicos de antibióticos, houve letargia até que se definissem critérios, ainda tímidos, para tanto. O doseamento microbiológico de antibióticos é, fundamentalmente, um método físico-químico no qual um microrganismo é utilizado como revelador. Desta forma, grande parte dos parâmetros de validação aplicados aos ensaios físico-químicos são pertinentes ao doseamento microbiológico de antibióticos. Entretanto, vale destacar que os critérios de aceitação adotados devem considerar a maior variabilidade inerente aos ensaios biológicos em geral.

2.3.1.1. Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (RE 899, 2003; PINTO et al., 2003 e ICH, 1996).

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito frente aos demais, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar na estruturação dos testes e propiciar soluções para os problemas encontrados. A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo. Uma vez conhecidos, estes problemas podem ser superados pela adição de padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação, ou detecção.

Testes de especificidade necessitam de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se definam todos os componentes indicados para teste. Assim sendo, o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de

degradação ou metabólitos e reagentes em branco devem todos ser analisados. Às vezes se faz necessário expor todos os componentes e a matriz a condições extremas (calor, ácido, álcali, oxidação, radiação UV/Visível, luz fluorescente) para determinar possíveis produtos de degradação (INMETRO, 2003).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de especificidade. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da sua concentração.

Se a matriz sem o analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição padrão. Isto é feito preparando-se dois grupos de amostras (com e sem a matriz da amostra) que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Se as duas curvas de regressão linear forem paralelas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito.

2.3.1.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear

A linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RE 899, 2003). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma

residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (RE 899, 2003). Se não houver relação linear, pode ser realizada transformação matemática (RE 899, 2003; PINTO et al., 2003 e ICH, 1996).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (SWARTZ & KRULL, 2003 e WOOD, 1999).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $Y = aX + b$, onde Y é a resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.), X é a concentração da solução, a é a inclinação da curva de calibração (sensibilidade) e b é a interseção com o eixo y (quando $x = 0$).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto a reta pode ser considerada como modelo matemático adequado. Para ensaios físico-químicos, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser de 0,99. Para ensaios biológicos ou microbiológicos, um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido.

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função adequada da concentração do analito na amostra.

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. Este intervalo é estabelecido pela

confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (RE 899, 2003).

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (RE 899, 2003 e ICH, 1996).

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos valores fornecidos pelos controles negativos (ou brancos). Esse limite inferior deve, portanto, ser igual ou maior do que o limite de quantificação do método. As etapas de diluição e concentração devem ser praticadas sem o risco de introduzir erros sistemáticos. A variância dos valores informados deve preferencialmente ser independente da concentração. Esta independência deve ser verificada por um teste estatístico para a linearidade.

Em geral, serão necessários vários pontos de calibração para determinar a faixa de trabalho. A faixa de trabalho e a faixa linear podem variar para cada tipo de amostra, devido ao efeito das interferências provenientes da matriz.

2.3.1.3. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra e que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (RE 899, 2003 e ICH, 1996).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. Para a validação de um método analítico, é no geral suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito passa a tornar-se problemática, ou seja, "Branco + 3s" ou "0 + 3s" (sendo s o desvio padrão) (INMETRO, 2003).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor "Branco + 10s" ou "0 + 10s" (INMETRO, 2003). Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se as exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias (RE 899, 2003 e ICH, 1996).

2.3.1.4. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo com relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) (RE 899, 2003; PINTO et al., 2003; THOMPSON, 1982 e ICH, 1996).

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado / valor esperado) (SWARTZ & KRULL, 2003 e WOOD, 1999). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, comparação de métodos, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (WOOD, 1999).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao

limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma presente na amostra (RE 899, 2003 e ICH, 1996). Analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável podem ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2003).

A exatidão também pode ser avaliada quanto a 2 tipos de tendência (CAULCUTT & BODDY, 1983):

- a) Tendência fixa ou absoluta: ocorre quando há um desvio sistemático e constante. A correção da tendência fixa ou absoluta é feita pela subtração do valor do resultado analítico - valor do desvio.
- b) Tendência relativa: corresponde a uma inclinação negativa ou positiva na relação entre resultado analítico determinado experimentalmente vs. concentração teórica contida na amostra ensaiada. A correção da tendência relativa é feita multiplicando-se o resultado analítico ao fator de correção determinado.

Um método pode apresentar simultaneamente os dois tipos de tendência. Neste caso a correção pode ser feita multiplicando-se o resultado analítico ao fator de correção determinado e pela subtração do desvio absoluto.

A análise de regressão linear simples pode ser empregada para avaliar a existência de tendência fixa ou relativa em método analíticos. A avaliação é feita plotando os resultados experimentais da recuperação do analito vs. concentração teórica da amostra. Os coeficientes angular e linear e o erro padrão são determinados. Avalia-se a existência de tendência fixa ou absoluta através da significância entre o coeficiente linear e o valor 0. Quando não há diferença significativa entre o coeficiente linear e o valor 0 conclui-se que o método não apresenta tendência fixa ou absoluta. Da mesma forma, a tendência relativa é avaliada

através da significância da diferença entre o coeficiente angular em relação ao valor 1. A inexistência de diferença significativa entre o coeficiente angular e o valor 1 indica que o método não apresenta tendência relativa (CAULCUTT & BODDY, 1983). Outros modelos de regressão também podem ser empregado para a avaliação da exatidão (THOMPSON, 1982).

2.3.1.5. Precisão

É a avaliação da proximidade entre resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (RE 899, 2003; PINTO et al., 2003 e ICH, 1996).

É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão. Ambas, repetitividade e reprodutibilidade, são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. O desvio padrão relativo pode ser mais útil neste caso, tendo em vista ser normalizado com base na concentração, sendo portanto

praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta siga níveis compatíveis de grandeza.

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, a seguir (RE 899, 2003 e ICH, 1996):

- Mesmo laboratório;
- Mesmo analista;
- Mesmo equipamento e;
- Repetições em curto espaço de tempo (mesmo dia).

Pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (RE 899, 2003 e ICH, 1996):

- Diferentes laboratórios;
- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos e;
- Repetições em longo espaço de tempo (dias diferentes).

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando este busca a verificação do desempenho dos seus métodos no nível interlaboratorial.

2.4. Aminoglicosídeos e apramicina

2.4.1. Antibióticos Aminoglicosídeos

Os antibióticos aminoglicosídeos são compostos orgânicos com baixo peso molecular, hidrossolúveis, polares e básicos com pK_a entre 7,5 e 8, geralmente utilizados na forma de sulfato (VEYSIER & BRYSKIER, 1999). Caracterizam-se por conterem dois ou mais aminoaçúcares unidos por uma ligação glicosídica ao núcleo de hexose, que geralmente se encontra em posição central, também chamado de aminociclitol. Os aminoglicosídeos terapeuticamente usados contêm geralmente 1,3-diaminociclitol ou 1,4-diaminociclitol (GOODMAN & GILMAN, 2006).

São divididos em dois grupos de acordo com o aminociclitol: estreptamina e 2-desoxistreptamina. O grupo desoxistreptamina, o maior, é também dividido em 2 subgrupos de acordo com o número e a posição dos substituintes no núcleo desoxistreptamina. Os subgrupos mais conhecidos e caracterizados são (a) neomicinas e paromomicinas, no qual os substituintes estão em posições adjacentes (posições 4 e 5) e (b) gentamicinas e canamicinas, no qual os substituintes estão em posições não-adjacentes (posições 4 e 6) do núcleo aminociclitol. O grupo da estreptamina contém estreptomicina e diidroestreptomicina (ISOHERRANEN & SOBACK, 1999; VEYSIER & BRYSKIER, 1999).

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas rápidos, agindo particularmente contra as bactérias aeróbicas gram-negativas. Eles são fracamente ativos ou inativos contra anaeróbicos, estreptococos e pneumococos. Sua combinação com beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e antibióticos polipeptídicos é sinérgica. Caracterizam-

se também por apresentarem efeito pós-antibiótico, que é a persistência de uma atividade bactericida residual após a queda da concentração sérica abaixo da concentração inibitória mínima. Considerando-se essas propriedades combinadas à sua toxicidade, tem-se a justificativa para a eficácia dos esquemas de dose única diária dos aminoglicosídeos (GOODMAN & GILMAN, 2006 e VEYSIER & BRYSKIER, 1999).

O seu modo de ação consiste principalmente na inibição da síntese protéica e redução da fidelidade de tradução do mRNA no ribossomo bacteriano. A resistência microbiana, geralmente mediada e transferida por plasmídios, relaciona-se à sua inativação por enzimas microbianas específicas e vem se tornando um problema crescente nesta classe de antibióticos (GOODMAN & GILMAN, 2006 e VEYSIER & BRYSKIER, 1999).

A farmacocinética entre os diferentes membros da classe é comparável: nenhuma absorção no tubo digestivo, fraca ou inexistente ligação protéica no plasma, meias-vidas de eliminação similares (2 a 3 hs), não atravessam a barreira hematoencefálica, podem penetrar o humor vítreo ocular ou atingir concentrações elevadas dos líquidos articular e pleural. São eliminados essencialmente na forma ativa (50 a 60% da dose), não metabolizada por filtração glomerular associada à reabsorção tubular (VEYSIER & BRYSKIER, 1999).

2.4.2. Apramicina

A apramicina é um antibiótico aminoglicosídeo pertencente ao grupo dos aminociclitóis, produzida pelo *Streptomyces tenebrarius*. É um composto derivado da nebramicina, um antibiótico complexo também produzido pela mesma cepa de

microrganismo, cujo primeiro relato se deu em 1968 por Stark, Hoehn & Knox (PERZYNSKI et al., 1979; O'CONNOR et al., 1976; WALTON, 1978, TATSUTA et al., 1984). A tobramicina, outro aminoglicosídeo, também é derivada do complexo da nebramicina. Inicialmente, acreditava-se que sua estrutura fosse bastante similar à da tobramicina e demais antibióticos do grupo da canamicina, apresentando uma desoxistreptamina 4,6-dissubstituída (PERZYNSKI et al., 1979; O'CONNOR et al., 1976; WALTON, 1978, TATSUTA et al., 1984), entretanto após exame detalhado, envolvendo análises degradativas, sintéticas e espectroscopias, verificou-se que a mesma possui uma estrutura incomum, sendo suas principais características a presença de um núcleo 4-amino-4-desoxi-D-glicose, uma ligação glicosídica 1-1' e uma octadiose que forma um rígido sistema bicíclico (O'CONNOR et al., 1976). A estrutura proposta foi confirmada por estudo de difração com raio X (Figura 1).

Figura 1. Estrutura química da apramicina.

A presença de um açúcar bicíclico pirano-pirano e uma desoxiestreptamina monossobstituída tornam a apramicina um aminoglicosídeo de estrutura única. Além da estrutura diferenciada, a apramicina difere dos demais aminoglicosídeos em outros aspectos: apresenta substituição glicosídica da 2-desoxiestreptamina somente na posição 4, enquanto nos demais membros do grupo aminoglicosídeos o sítio de ligação

decodificador (responsável pela atividade antibacteriana) pode apresentar modelos de diss substituição nas posições 4 e 5 ou nas posições 4 e 6. Seu efeito primário é inibir a elongação da cadeia protéica pelo bloqueio da translocação ribossômica, em contraste com os aminoglicosídeos com 2-desoxiestreptamina diss substituídos, os quais induzem a erros durante a translocação (HERMANN et al., 2007).

Como os demais antibióticos aminoglicosídeos, a apramicina é um composto polar, hidrofílico, pouco solúvel em álcool, insolúvel em acetona e éter, não-volátil. Também não possui grupos cromóforos em sua estrutura. O sulfato de apramicina, forma sob a qual é empregada na terapêutica veterinária, é um pó amarelado e amorfo. (MARTINDALE, 2007).

A apramicina é um inibidor extremamente potente da síntese protéica bacteriana, sendo que o seu efeito primário consiste no bloqueio da translocação, ou seja, na inibição da elongação da cadeia protéica, sendo aparente mesmo em baixas concentrações do fármaco (HERMANN et al., 2007). Ainda induz a erro de leitura irreversível durante a translocação, sendo este efeito proporcional à concentração do fármaco (PERZYNSKI et al., 1979).

Como os demais antibióticos aminoglicosídeos, a apramicina não é absorvida no trato gastrointestinal, tem baixa ligação às proteínas plasmáticas e é eliminada na forma inalterada pelas fezes e, em maior proporção, pela filtração glomerular. Estudos realizados com radiomarcadores evidenciaram que, nos porcos, há uma tendência do acúmulo de apramicina no rim. Apresenta nefrotoxicidade como efeito indesejável do seu uso e isso se constitui em aspecto de preocupação, sobretudo, quando se considera que o gado será destinado ao abate e consumo humano, e que poderá conter resíduos do fármaco.

Ao contrário de outros fármacos aminoglicosídeos, a apramicina é empregada somente na medicina veterinária sob a forma de solução injetável, premix para rações

ou como pó solúvel para administração oral. É empregada contra infecções causadas por microrganismos gram-negativos, com finalidade profilática e promotora do crescimento, embora esta última aplicação seja proibida em alguns países. Ainda é utilizada no tratamento de colisepticemia causada por cepas sensíveis de *Escherichia coli* e salmoneloses causadas por *Salmonella* sp em aves domésticas (BRADY & KATZ, 1992).

A principal indicação da apramicina é para o tratamento de colibacilose porcina (um tipo de diarreia causada por *Escherichia coli* que acomete principalmente os leitões que acabaram de ser desmamados) e de disenteria suína causada por cepas sensíveis de *Brachyspira hyodysenteriae*. Também é utilizada no gado bovino para o tratamento de colibacilose, salmonelose e enterite bacteriana causadas por cepas sensíveis de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp em bezerros. Em todos esses casos o tratamento deve ser suspenso 28 dias antes do abate dos animais para consumo humano.

2.4.3. Métodos de Determinação de Antibióticos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são um grupo heterogêneo de antibióticos caracterizado por um largo espectro de atividade e toxicidade. Considerável esforço tem sido atribuído à análise de seu conteúdo, seja em preparações farmacêuticas, seja no soro ou urina durante seu monitoramento terapêutico ou ainda no controle de seus resíduos em tecidos animais destinados ao consumo humano. Para que essa tarefa possa ser cumprida com êxito, os métodos utilizados devem ser precisos, exatos, sensíveis e robustos. Contudo, as suas características químicas de alta polaridade,

hidrossolubilidade, baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos dificultam o desenvolvimento de métodos aplicáveis (STEAD, 2000; ISOHERRANEN & SOBACK, 1999).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido empregada com sucesso nas determinações de aminoglicosídeos, seja em análises de resíduos em alimentos de origem animal, em análises quantitativas de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas provenientes de monitoramento terapêutico, bem como em estudos de estabilidade e também no doseamento de aminoglicosídeos em preparações farmacêuticas (STEAD, 2000; ISOHERRANEN & SOBACK, 1999). Devido as características físico-químicas dos aminoglicosídeos, estes pode ser separados em colunas de troca iônica ou em colunas de fase reversa empregando técnica de pareamento iônico. A técnica de fase reversa com pareamento iônico é a mais utilizada e geralmente preferida em relação à troca iônica, pois proporciona maior eficiência, maior facilidade de controle sobre a seletividade e a resolução e também maior estabilidade e reprodutibilidade do sistema cromatográfico (STEAD, 2000; SOLTÉS, 1999).

A ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos na estrutura dos aminoglicosídeos torna necessário o emprego de reagentes de derivatização, que proporcionem detecção por UV ou fluorescência, dependendo do reagente utilizado (STEAD, 2000; ISOHERRANEN & SOBACK, 1999). Além da detecção por UV e por fluorescência proporcionadas pela derivatização, há ainda o emprego de outros tipos de detecção nos métodos cromatográficos, como a detecção amperométrica (MEGOULAS & KOUPPARIS, 2005) e de nebulização da amostra e espalhamento de luz (SERRANO & SILVA, 2006; LOVERING et al. 1984). Apesar das vantagens e popularização do emprego da CLAE em fase reversa com pareamento iônico, há

métodos que utilizam cromatografia em troca iônica associada à detecção por quimioluminescência (POLTA et. al., 1985).

2.4.4. Métodos de Determinação de Apramicina

O ensaio microbiológico turbidimétrico é a metodologia oficial para determinação do potênia de apramicina em matéria-prima e nas apresentações farmacêuticas disponíveis, descrita na Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008). O método recomenda o emprego *Salmonella Cholerasuis* como inóculo, temperatura de incubação de 37°C e sulfato de apramicina como substância padrão de referência. As soluções padrões e amostras são preparadas empregando-se tampão fosfato pH 8,0 como diluente. O meio de cultura empregado é composto por dextrose, triptona e extrato de levedura (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008).

Recentemente os métodos químicos e físico-químicos, particularmente a cromatografia líquida de alta eficiência, tem se destacando e se tornando alternativa interessante para a análise dos antibióticos por apresentar características como precisão, alto poder de resolução e rapidez na obtenção dos resultados, permitindo a avaliação da pureza de antibióticos quanto à presença de substâncias relacionadas e produtos de degradação (YAMAMOTO, 1999; JOSHI, 2002]. Entretanto, em situações nas quais o antibiótico não pode ser definido e/ou quantificado em termos de suas propriedades químicas ou físico-químicas, o ensaio microbiológico permanece como o método de escolha para determinação da potência (HEWITT, 1977).

Com a finalidade de estudar mecanismos de resistência à apramicina e outros aminoglicosídeos frente a enzimas relacionadas a esse processo, foi proposto método de identificação de três enzimas acetiladoras de aminoglicosídeos através da determinação dos produtos de reação das mesmas com os aminoglicosídeos testados (SWEENEY & COLEMAN, 1998). O método empregou cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pré-coluna com o-ftalaldeído e detecção por UV. Desenvolveu-se ainda método de separação dos fatores da nebramicina, entre os quais a apramicina e a tobramicina, empregando cromatografia líquida com detecção amperométrica anódica pulsada (POLTA et al., 1985).

Em 1998, relatou-se método de determinação de apramicina em tecidos renais suínos empregando cromatografia líquida de alta eficiência e derivatização pré-coluna automatizada com OPA, além de detecção por fluorescência (SWEENEY & COLEMAN, 1998). Um procedimento simples, seletivo e sensível foi proposto para a determinação de resíduos de nove aminoglicosídeos no leite bovino, entre eles, a apramicina (BOGIALLI et al., 2005). O método consistiu na extração dos aminoglicosídeos através da dispersão da matriz em fase sólida utilizando-se água aquecida a 70°C e, a seguir, injeção da amostra em um sistema de cromatografia líquida equipado com um detector de massa.

Baseados no trabalho de Sweeney & Coleman, em 1998, foi desenvolvido método para determinação de apramicina em alimentos de uso veterinário, com extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência, com derivatização pré-coluna empregando-se o-ftalaldeído e detecção por fluorescência (ZHANG et al., 2007).

Em 2008, foi desenvolvido método para determinação simultânea de resíduos de 13 aminoglicosídeos, incluindo a apramicina, em alimentos de origem animal por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por

eletrospray. O novo método foi validado e demonstrou boa performance quanto à recuperação, precisão, linearidade, especificidade, estabilidade e limites de detecção e quantificação nas diferentes matrizes (ZHU et al., 2008).

Além da cromatografia líquida de alta eficiência, a espectrofotometria também pode ser empregada na determinação de apramicina, tobramicina e canamicina em formulações farmacêuticas (BONTCHEV et al., 1984). O método baseia-se na formação de um íon-par entre o antibiótico protonado e a forma aniônica do azul de bromotimol em meio levemente ácido. O íon-par formado é extraído do clorofórmio e sua absorbância é medida a 430 nm. O método espectrofotométrico apresentou boa correlação com o método microbiológico oficial.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho desenvolver método para a dosagem microbiológica de apramicina empregando microplacas e modo de leitura cinético. Validar o método desenvolvido através da avaliação dos parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, faixa ou intervalo linear, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

Ainda é objetivo deste trabalho estudar aspectos de influência das condições experimentais na dosagem microbiológica de apramicina empregando microplacas e modo de leitura cinético, possibilitando as vantagens do método microbiológico atrelado a vantagens como a agilidade na obtenção de resultados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Meio de cultura

4.1.1.1. Caldo de triptona-soja

Foi utilizado meio de cultura caldo de triptona-soja (Oxoid, Cambrigde), com composição conforme descrita a seguir:

- Digesto pancreática de caseína	17,0 g
- Digesto papaínica de soja	3,0 g
- Cloreto de sódio	5,0 g
- Fosfato monobásico	2,5 g
- Glicose	2,5 g
- Água	1000 ml

Após dissolução do meio de cultura, este teve seu pH ajustado entre 7,1 e 7,5 com ácido clorídrico 6,0 M ou hidróxido de sódio 6,0 M e a seguir foi esterilizado em autoclave a 125 °C por 30 minutos.

4.1.1.2. Agar De triptona-soja

Foi utilizado meio de cultura agar de triptona-soja (Oxoid, Cambrigde), com composição conforme descrita a seguir:

- Triptona	15,0 g
- Peptona de soja	5,0 g
- Cloreto de sódio	5,0g
- Agar	15,0 g
- Água	1000 ml

Após dissolução do meio de cultura, este teve seu pH ajustado entre 7,1 e 7,5 com ácido clorídrico 6,0 M ou hidróxido de sódio 6,0 M e a seguir esterilizado em autoclave a 125 °C por 30 minutos.

4.1.2. Substância química de referência

A substância química de trabalho sulfato de apramicina (lote RS0192, potência 873 µg/mg) empregada nos ensaios gentilmente foi fornecida pelo laboratório Eli Lilly de Brasil Ltda. (Brasil, São Paulo).

4.1.3. Amostras

Foram ensaiadas amostras do produto comercial Apralan® Solúvel (pó para solução oral) fornecidas pelo laboratório Eli Lilly do Brasil Ltda. (Brasil, São Paulo).

4.1.4. Microrganismo-teste

O microrganismo-teste utilizado nos ensaios foi a *Escherichia coli* (ATCC 8739), fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz (Brasil, São Paulo).

4.2. Métodos

Este trabalho foi dividido em duas etapas: (a) determinação das condições experimentais e (b) validação do método analítico.

4.2.1. Determinação das condições experimentais

4.2.1.1. Preparação das soluções padrão

Foram preparadas soluções de sulfato de apramicina em concentrações de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 8, 4, 2 e 1 µg/ml. Empregou-se como diluente o caldo de triptona-soja.

4.2.1.2. Preparação do microrganismo-teste

Culturas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram mantidas em superfície inclinada de meio de cultura agar de triptona-soja.

Transferiu-se alíquotas de cultura-mãe de não mais de 24 horas, incubada em temperatura de 32 a 35 °C, para frasco contendo 100 ml de meio de cultura caldo de triptona-soja. O frasco contendo meio de cultura inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) foi incubado nas mesmas condições durante não mais que 24 horas.

A suspensão obtida deste último crescimento, contendo cerca de 10^8 UFC/ml, foi utilizada como inóculo. Quantidades apropriadas de meio de cultura caldo de triptona-soja foram inoculados em proporções de 1, 3 e 5%.

4.2.1.3. Preparação das microplacas

Alíquotas de 100 µl das soluções de sulfato de apramicina, nas concentrações de 1 a 100 µg/ml, foram transferidas para uma microplaca. Após, foram transferidas alíquotas de 100 µl de meio de cultura caldo de triptona-soja inoculados com *Escherichia coli* (ATCC 8739) nas proporções de 1, 3 e 5%. Foram empregados controles negativos (CN) e controles positivos (CP). A Figura 2 apresenta, de forma esquemática, a distribuição das soluções de sulfato de apramicina nas microplacas.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	CN	CN	40	40	CN	CN	40	40	CN	CN	40	40
B	1	1	50	50	1	1	50	50	1	1	50	50
C	2	2	60	60	2	2	60	60	2	2	60	60
D	4	4	70	70	4	4	70	70	4	4	70	70
E	8	8	80	80	8	8	80	80	8	8	80	80
F	10	10	90	90	10	10	90	90	10	10	90	90
G	20	20	100	100	20	20	100	100	20	20	100	100
H	30	30	CP	CP	30	30	CP	CP	30	30	CP	CP

Caldo De triptona-soja
inoculado em proporção
de 1%

Caldo De triptona-soja
inoculado em proporção
de 3%

Caldo De triptona-soja
inoculado em proporção
de 5%

Figura 2. Esquema de distribuição das soluções de sulfato de apramicina, nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90 e 100 µg/ml, controles negativos (CN) e controles positivos (CP) e da distribuição dos meios de cultura caldo de triptona-soja inoculados em proporções de 1, 3 e 5%.

4.2.1.4. Condições de incubação e leitura

Equipamento marca BioTek, modelo Elx808 (USA, Winooski) foi empregado para a incubação e leitura das microplacas. A incubação foi realizada a temperatura de 37 ± 1 °C por período de 8 horas. Foram realizadas medições das absorbâncias no comprimento de onda de 630 nm, em intervalos de 5 minutos.

4.2.2. Validação do método analítico

Após a determinação das condições que apresentam melhor curva dose-resposta, o método desenvolvido foi validado, através da avaliação dos parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, faixa ou intervalo linear, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

Na etapa de validação, alíquotas de 100 µl das soluções de padrão de sulfato de apramicina (nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/ml) e das soluções das amostras (nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 µg/ml), foram transferidas para uma microplaca. Após, foram transferidas alíquotas de 100 µl de meio de cultura caldo de triptona-soja inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5%. Foram empregados controles negativos (CN) e controles positivos (CP). A Figura 3 apresenta, de forma esquemática, a distribuição das soluções de sulfato de apramicina nas microplacas.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	CN	CN	A10	A10	CN	CN	B10	B10	CN	CN	C10	C10
B	P5	P5	A15	A15	P5	P5	B15	B15	P5	P5	C15	C15
C	P10	P10	A20	A20	P10	P10	B20	B20	P10	P10	C20	C20
D	P15	P15	A25	A25	P15	P15	B25	B25	P15	P15	C25	C25
E	P20	P20	A30	A30	P20	P20	B30	B30	P20	P20	C30	C30
F	P25	P25	CP	CP	P25	P25	CP	CP	P25	P25	CP	CP
G	P30	P30	-	-	P30	P30	-	-	P30	P30	-	-
H	P35	P35	-	-	P35	P35	-	-	P35	P35	-	-

Figura 3. Esquema de distribuição das soluções de padrão de sulfato de apramicina nas concentrações de 5 (P5), 10 (P10), 15 (P15), 20 (P20), 25 (P25), 30 (P30) e 35 (P35) µg/ml, das soluções das amostras nas concentrações de 10 (A10, B10 e C10), 15 (A15, B15 e C15), 20 (A20, B20 e C20), 25 (A25, B25 e C25) e 30 (A30, B30 e C30) µg/ml, controles negativos (CN) e controles positivos (CP) e da distribuição dos meios de cultura caldo de tripton-soja inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5%.

4.2.2.1. Especificidade e seletividade

Considerando particularmente a dosagem microbiológica de antibióticos, vale destacar que a interação antibiótico/microrganismo-padrão confere especificidade e/ou seletividade inerente ao ensaio microbiológico (KAVANAGH, 1972).

4.2.2.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear

Foram preparadas 3 curvas padrão com soluções de apramicina nas concentrados de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/ml. A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear pelo coeficiente de correlação. Considerou-se que o método apresenta linearidade satisfatória quando o coeficiente de correlação (r) é maior ou igual a 0,90.

4.2.2.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados através do estudo de linearidade, empregando as formulas: $LD = \frac{3 \times sa}{b}$ e $LQ = \frac{10 \times sa}{b}$, onde **sa** é o desvio padrão do coeficiente linear das 3 curvas padrão e **b** é o coeficiente angular médio das 3 curvas padrão.

4.2.2.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através da determinação da concentração de amostras simuladas contendo quantidades conhecidas de apramicina. As concentrações determinadas experimentalmente foram plotadas contra as concentrações teóricas. O método foi considerado exato, ou seja, não apresentando tendência fixa e tendência

relativa se os intervalos de confiança para os coeficientes linear e angular incluem, respectivamente, os valores 0 e 1.

4.2.2.5. Precisão

A precisão foi avaliada através da determinação do desvio padrão relativo em diferentes concentrações. O desvio padrão foi determinado através da fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{(n-1)(k-1)}}, \text{ onde } x \text{ é o resultado de cada determinação, } n \text{ é o número de}$$

determinações em cada concentração e k é o número de concentração avaliadas. Devido a alta variabilidade, inerente ao ensaio microbiológico, valores desvio padrão relativo de até 15% foram considerados satisfatórios.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os ensaios microbiológicos turbidimétricos podem ser classificados em duas categorias, tendo por base o tipo de resposta: (a) resposta tudo ou nada (semi-quantitativo) ou (b) resposta gradual (quantitativo).

Nos métodos semi-quantitativos convencionais, a resposta é baseada na presença ou ausência de crescimento microbiano, evidenciado por aparecimento visível de turbidez (MAY et al., 1947), intensidade de luminescência (RAKE et al., 1942), mudança de coloração devida a alteração de pH (FLEMING, 1942; FLEMING, 1947; FIELDING, 1947 e VALENTINE & JOHNS, 1949) ou presença de hemólise (RAKE & JONES, 1943 e FLEMING 1944). Este tipo de ensaio é particularmente útil em situações em que a quantidade de antibiótico presente na amostra abrange uma faixa ampla de concentrações, entretanto, apresenta limitações quanto a baixa precisão.

O método semi-quantitativo pode ser realizado em microplacas, sendo a resposta avaliada pela ocorrência (positiva) ou não (negativa) de determinado incremento da densidade óptica. O emprego de microplacas aplicado aos ensaios semi-quantitativos apresentam vantagens quanto a quantidade reduzida de material envolvido no teste, possibilidade de detecção da resposta (positiva ou negativa) de forma objetiva e facilidade operacional (incubação e leitura realizadas no mesmo equipamento). Este trabalho não abrangeu o emprego de microplacas para ensaios semi-quantitativos.

Considerando o emprego de microplacas aplicado ao ensaio microbiológico turbidimétrico quantitativo (resposta gradual), os dados podem ser processados de três maneiras diferentes:

a) Absorbância *vs.* Logaritmo da Concentração de Apramicina;

Este método é semelhante ao tradicional em tubos. As leituras de absorbância são plotadas com o logaritmo da concentração de apramicina (Figuras 4, 5 e 6) para cada intervalo de tempo avaliado (60, 120, 180, 240 e 300 minutos). Diferentemente do método tradicional, as leituras finais de absorbância são corrigidas com as leituras iniciais. Esta correção permite eliminar a interferência de amostras com coloração (PINTO et al., 2003).

Figura 4. Gráfico de absorvância (A) vs. Logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 1% como inoculo após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação.

Figura 5. Gráfico de absorvância (A) vs. Logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 3% como inóculo após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação.

Figura 6. Gráfico de absorvância (A) vs. Logaritmo da concentração de apramicina (µg/mL) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de incubação.

b) Tempo de Reação *vs.* Logaritmo da Concentração de Apramicina;

O tempo de reação é o tempo necessário para que o crescimento atinja uma determinada diferença de absorbância. Foram avaliadas curvas do "tempo de reação *vs.* concentração de apramicina", "tempo de reação *vs.* logaritmo da concentração de apramicina", "logaritmo do tempo de reação *vs.* concentração de apramicina" e "logaritmo do tempo de reação *vs.* logaritmo da concentração de apramicina". A curva do "logaritmo do tempo de reação *vs.* logaritmo da concentração de apramicina" apresentou melhor ajuste ao modelo linear, sendo o logaritmo do tempo de reação diretamente proporcional ao logaritmo da concentração de apramicina. Foram avaliadas diferenças de absorbância de 25 mAU, 50 mAU e 75 mAU, empregando proporções de inóculo de 3% e 5% (Figura 7).

Figura 7. Gráfico do logaritmo do tempo de reação (minutos) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) nas proporções de 3% e 5% como inóculo e diferenças de absorvância de 25 mAU, 50 mAU e 75 mAU.

c) Área sob a Curva vs. Logaritmo da Concentração de Apramicina.

O modo de leitura cinético permite que seja determinada uma curva de crescimento microbiano para cada uma das 96 amostras da microplaca. Para cada curva de crescimento microbiano foi determinada a área sob a curva (ASC) do início da incubação até o tempo de 300 minutos. As curvas da ASC vs. Logaritmo da concentração de apramicina obtidas empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) como inóculo nas proporções de 1%, 3% e 5% (Figura 8) apresentaram paralelismo na faixa de concentração de apramicina entre 20 e 40 µg/mL.

Figura 8. Gráfico da área sob a curva (ASC) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) nas proporções de 1%, 3% e 5% como inóculo.

5.1. Determinação das condições experimentais

As condições experimentais foram determinadas considerando os parâmetros que apresentaram melhor curva dose-resposta. Foram avaliadas soluções com concentrações de apramicina na faixa de 1 a 100 µg/mL, empregando meio de cultura caldo de triptona-soja e microrganismo-teste *Escherichia coli* (ATCC 8739) nas proporções de 1%, 3% e 5%. A faixa de concentração de apramicina entre 5 e 40 µg/mL apresentou resposta mais adequada para as proporções de inóculo de 1%, 3% e 5%.

Após avaliação preliminar das condições de melhor curva dose-resposta, foram realizados ensaios complementares para validação da metodologia. Foram avaliadas soluções de apramicina em 7 concentrações (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/ml), empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) como inóculo na proporção de 5% em meio de cultura caldo de triptona-soja. A microplaca contendo as soluções de apramicina foi incubada por 180 minutos, com leituras a cada 30 minutos (Figura 9).

Figura 9. Gráfico de crescimento microbiano em meio de cultura caldo de caseína-soja inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5%, contendo apramicina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/ml.

As curvas de crescimento microbiana em meio de cultura caldo de triptona-soja inoculado na proporção de 5%, contendo apramicina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/ml, demonstram que a cinética de crescimento da *Escherichia coli* (ATCC 8739) é alterada de forma que o antibiótico reduz a velocidade de crescimento do microrganismo-teste. As inclinações das curvas de crescimento da *Escherichia coli* (ATCC 8739), na fase *log*, permitem concluir que em concentrações mais altas de apramicina a velocidade de crescimento microbiano é menor, de acordo com os princípios do ensaio turbidimétrico (KAVANAGH, 1972; COOPER, 1963 e PINTO et al., 2003). Também é possível avaliar que a fase *lag* do crescimento da *Escherichia coli* (ATCC 8739) não sofre alteração quando na presença de diferentes concentrações de apramicina.

O período de incubação envolvido nos ensaios turbidimétricos está diretamente relacionado com o tempo necessário para a visualização do crescimento microbiano. Nesta abordagem, a otimização do período de incubação pode ser obtido: (a) pela utilização de meios de cultura com composição rica, que permite o crescimento microbiano rápido (COOPER, 1963 e KAVANAGH, 1972); (b) e pela utilização de cultura microbiana recente preparada em meio de cultura idêntico ao empregado no ensaio, com a finalidade de reduzir a fase *lag* (JOSLYN & GALBRAITH, 1950; KAVANAGH, 1972 e PINTO et al., 2003); e (c) o emprego de alta concentração de microrganismo utilizado como inóculo (FOSTER & WOODRUFF, 1943 e KAVANAGH, 1972). Considerando estas abordagens, o inóculo de *Escherichia coli* (ATCC 8739) foi preparado em meio de cultura idêntico ao empregado no ensaio, meio caldo de triptona-soja. Este meio de cultura, de composição rica em nutrientes, associado a alta quantidade de microrganismos empregado como inóculo (proporção de 5%), permitiu crescimento microbiano rápido e, conseqüentemente, tempos reduzidos para obtenção da turbidez necessária para leitura.

Embora o emprego de grande quantidade de microrganismo como inóculo promove redução do tempo necessário para obtenção da resposta, este recurso acarreta em diminuição da sensibilidade do método (FOSTER & WOODRUFF, 1943). A interação entre microrganismo-teste e antibiótico altera a cinética de crescimento reduzindo a velocidade de crescimento de forma uniforme, entretanto, para concentrações mais elevadas do antibiótico o crescimento é alterado de forma não uniforme (JOSLYN & GALBRAITH, 1950 e KAVANAGH, 1972). Os resultados obtidos com o ensaio em microplaca empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo são compatíveis aos encontrados na literatura.

Os métodos turbidimétricos com longos períodos de incubação demandam o emprego de meios de cultura e soluções-teste atendendo as condições de esterilidade. Ensaio com períodos de incubação mais curtos dispensam a esterilidade das soluções-teste (BOND & DAVIES, 1948). Esta situação é evidente quando se diferencia o doseamento de antibiótico e de fatores de crescimento, em que tipicamente os tempos de incubação maiores tornam sempre necessário o atributo de esterilidade. Entretanto, é importante destacar a necessidade de ausência de contaminação microbiana grosseira, particularmente por microrganismo não sensível ao antibiótico avaliado, que pode proporcionar turvação no meio de cultura de forma a interferir no ensaio.

A curva dose-resposta é parte fundamental no ensaio turbidimétrico, sendo causa comum de erro, seja por motivos teóricos ou práticos. A curva dose resposta significa a relação entre a turbidez resultante do crescimento microbiano e a concentração do antibiótico (KAVANAGH, 1972). O crescimento microbiano é afetado pela presença do antibiótico quanto ao tempo de geração e o tempo da fase *lag*. O tempo de geração é zero e o período da fase *lag* é infinito quando o microrganismo está morto.

Considerando que as condições de incubação (temperatura, pH, composição do meio de cultura) são constantes e idênticas e que o tempo de geração e o período da fase *lag* são funções da concentração do antibiótico, o crescimento microbiano ocorre de forma diferenciada para as diferentes concentrações do antibiótico. Assim, a inclinação da curva dose-resposta aumenta com o aumento do tempo de incubação, facilitando as leituras das amostras do antibiótico (KAVANAGH, 1963 e KAVANAGH, 1972). Os resultados obtidos com o ensaio em microplaca empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo correspondem a esta situação (figura 10).

As curvas-resposta obtidas com períodos mais longos de incubação (120, 150 e 180 minutos) apresentam maior inclinação àquelas obtidas com períodos mais curtos (30, 60 e 90 minutos). Considerando os períodos de 150 e 180 minutos de incubação, a faixa ou intervalo linear é limitada para as concentrações mais baixas de antibiótico (5 a 20 µg/ml). Embora esta condição apresente maior sensibilidade, o tempo para obtenção das respostas é maior. A curva-resposta obtida com período de incubação de 120 minutos apresentou melhor relação custo-benefício: faixa ou intervalo linear é ampla (5 a 35 µg/ml) e a inclinação é satisfatório.

Figura 10. Gráfico de absorvância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação.

A condução térmica desigual representa um problema prático durante o período de incubação do ensaio turbidimétrico convencional (PINTO et al., 2003). Esta situação é minimizada no ensaio empregando microplacas, uma vez que a quantidade de soluções empregadas (cerca de 200 μ l) permite melhor condução térmica durante o período de incubação. Ainda vale destacar a versatilidade das leitoras de microplacas, que possibilitam que a incubação da microplaca seja realizada próprio espectrofotômetro (BRADY & KATZ, 1991).

No ensaio turbidimétrico convencional, outra preocupação diz respeito a sedimentação das bactérias no fundo do tubo, onde a quantidade de oxigênio é limitada e pode interferir no crescimento microbiano. A incubação sob agitação, periódica ou constante, é utilizada com a finalidade de eliminar este problema (McMAHAN, 1944; BOND & DAVIES, 1948; KAVANAGH, 1963 e PINTO et al., 2003). Atualmente, as leitoras de microplacas dispõem de mecanismos de agitação periódica das microplacas, de forma a minimizar a sedimentação das bactérias no fundo da microplaca. Além disso, a quantidade de soluções empregadas no ensaio em microplacas (cerca de 200 μ l) minimizam as diferenças da quantidade de oxigênio entre a superfície e o fundo do microtubo.

Um fator limitante do ensaio turbidimétrico convencional, particularmente para amostras de fluídos biológicos e exsudatos (amostras sanguíneas, fluído cerebroespinhal e urina), é a necessidade de grande quantidade de amostra em solução (RAMMELKAMP, 1942; FLEMING, 1944; FLEMING, 1947 e FIELDING, 1947). Esta questão é minimizada no ensaio empregando microplacas, uma vez que a quantidade de amostra empregada é de cerca de 100 μ l para cada réplica.

Ao longo do desenvolvimento metodológico do ensaio turbidimétrico convencional, adotou-se a utilização de tubos padronizados (JOSLYN, 1944) e interrupção do crescimento microbiano através da colocação dos tubos em banho de

água quente (McMAHAN, 1944) Tais modificações foram adotadas com a finalidade de reduzir o trabalho envolvido nas leituras da turvação (dispensa a transferência das suspensões para cubetas próprias para leitura em espectrofotômetro) e minizar os erros devido ao intervalo entre as primeiras leituras e as últimas (proveniente do crescimento microbiano não interrompido). O ensaio empregando microplacas dispensa estes cuidados, uma vez que as leituras são realizadas na própria microplaca de forma rápida.

Uma desvantagem inerente ao ensaio turbidimétrico convencional diz respeito a interferência na leitura fotométrica e na coloração da amostra (LOY & WRIGHT, 1959; KAVANAGH, 1963 e PINTO et al., 2003). Esta interferência é eliminada no ensaio empregando leitura cinética, através da correção das absorbâncias pela leitura inicial.

Atualmente, os equipamentos fotométricos são dotados de softwares que permitem a leitura e cálculo de resultados de forma automatizada. A interpolação de dados da amostra através de um computador em sistema on-line permite redução significativa de trabalho e tempo envolvidos no processamento dos dados, além de reduzir a ocorrência de erros de transferência de dados e de cálculos.

O ensaio microbiológico turbidimétrico convencional, descrito na Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008), é a metodologia oficial para determinação do potencial de apramicina. O método recomenda o emprego *Salmonella Choleraesuis* como microorganismo-teste, temperatura de incubação de 37°C e sulfato de apramicina como substância padrão de referência. O meio de cultura empregado é composto por dextrose, triptona e extrato de levedura (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008). O ensaio empregando microplacas apresenta vantagens em relação ao ensaio turbidimétrico convencional quanto a quantidade de material envolvido no teste, tempo

de incubação necessário para obtenção das respostas e facilidade operacional (incubação e leituras realizadas no mesmo equipamento).

Além do ensaio turbidimétrico convencional, a determinação da potência de apramicina pode ser realizada pelo método de difusão em agar (ensaio em placas), empregando sistema de bicamada com *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) como microrganismo-teste e soluções padrão e amostras nas concentrações de 1 a 4 µg/ml (de acordo com nossos resultados ainda não publicados). Embora o método de difusão em agar tenha apresentado maior sensibilidade em relação ao ensaio empregando microplacas, o período de incubação é de cerca de 18 horas.

Os métodos químicos e físico-químicos, particularmente a cromatografia líquida de alta eficiência, têm sido empregados para avaliação de antibióticos. Estes métodos destacam-se por apresentarem características como alta precisão, possibilidade de automação e rapidez na obtenção de resultados, especialmente em comparação com os ensaios microbiológicos (YAMAMOTO, 1999 e JOSHI, 2002). Entretanto, em situações nas quais o antibiótico não pode ser quantificado por suas propriedades químicas e físico-químicas, o ensaio microbiológico permanece como método de escolha. Apesar de desvantagens em relação aos métodos químicos e físico-químicos (baixa precisão, possibilidade limitada de automação e maior tempo envolvido para obtenção de resultados), os ensaios microbiológicos destacam-se pela capacidade de avaliar a atividade (relevância terapêutica) dos antibióticos (HEWITT, 1977 e PINTO et al., 2003).

As características químicas dos aminoglicosídeos, particularmente da apramicina, dificultam o desenvolvimento de métodos químicos e físico-químicos aplicáveis. A ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos na estrutura dos aminoglicosídeos torna necessário o emprego de técnicas de derivatização (STEAD, 2000 e ISOHERRANEN & SOBACK, 1999). Considerando o emprego de métodos

físico-químicos na avaliação de amostras de fluídos biológicos e exsudatos (amostras sanguíneas, fluído cerebroespinal e urina), em que a quantidade de antibiótico é baixa, um fator limitante é a sensibilidade do ensaio. Métodos cromatográficos que utilizam detecção por fluorescência são mais sensíveis e, portanto indicados para este tipo de amostras. Para situações em que se espera maior quantidade de antibiótico presente nas amostras, a cromatografia líquida empregando detecção por absorção no ultravioleta pode ser interessante, particularmente por se tratar de técnica mais comum e relativamente menos dispendiosa.

Estudo da otimização das condições de derivatização dos grupos amino presentes na apramicina com o-ftaldeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol, empregando detecção por fluorescência, ou ácido mercaptoacético, empregando detecção por ultravioleta, mostraram que a utilização do segundo apresenta maior estabilidade em relação ao primeiro. Os resultados ainda permitem verificar que a proporção ideal de OPA/apramicina é de 5:1. O método por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando derivatização com OPA e ácido mercaptoacético e detecção no ultravioleta, apresentou boa correlação com o método turbidimétrico convencional (de acordo com nossos resultados ainda não publicados).

Método espectrofotométrico, baseado na formação de íon-par entre a apramicina e a forma aniônica do azul de bromotimol, também apresenta boa correlação com o método microbiológico oficial (BONTCHEV et al., 1984).

5.2. Validação do método analítico

O método foi validado através da avaliação dos parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, faixa ou intervalo linear, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão, para três modos de leitura: (a) leitura de ponto final, (b) leitura cinética - tempo de reação e (c) leitura cinética - área sob a curva.

5.2.1. Absorbância vs. Logaritmo da Concentração de Apramicina

5.2.1.1. Especificidade e seletividade

O ensaio turbidimétrico para avaliação de antibióticos é baseado na interação entre o microrganismo-teste e o antibiótico e no significado da medida da turbidez. A interação entre microrganismo-teste e antibiótico ocorre de forma que o antibiótico inibe o crescimento microbiano. Desta forma, a turbidez resultante do crescimento microbiano é inversamente proporcional à concentração do antibiótico presente no meio de cultura (KAVANAGH, 1972). O microrganismo-teste deve ser sensível ao antibiótico avaliado e deve crescer no meio de cultura líquido de forma diferenciada em função da concentração do antibiótico (COOPER, 1963; FALK, 1953 e LOY & WRIGHT, 1959).

A interação entre microrganismo-teste e antibiótico confere especificidade ao ensaio turbidimétrico, uma vez que a resposta (turbidez) é produzida apenas pelo antibiótico. Ainda que a amostra contenha substâncias com atividade antimicrobiana, a interação entre microrganismo-teste e antibiótico ocorre de forma a permitir distinguir a resposta do antibiótico.

5.2.1.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear

O método de leitura de ponto final empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação apresentou linearidade satisfatória, com equações de reta $Y = 264,4 - 150,8X$; $Y = 275,1 - 153,8X$ e $Y = 270,7 - 151,5X$ e coeficiente de correlação 0,996; 0,996 e 0,993, para as curvas 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Gráfico de absorvância (A) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação.

5.2.1.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para o método de leitura de ponto final empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação foram de 0,1 µg/ml e 0,4 µg/ml, respectivamente.

5.2.1.4. Exatidão

O método de leitura de ponto final empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação apresentou exatidão adequada (98,5%), não apresentando tendência fixa e tendência relativa (Figura 12).

Figura 12. Gráfico de concentrações de amostras simuladas determinadas experimentalmente através do método de leitura de ponto final (empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação) vs. concentrações teóricas das amostras simuladas.

5.2.1.5. Precisão

O método de leitura de ponto final empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação apresentou precisão adequada (6,0%). Foram avaliadas 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes, totalizando 15 ensaios independentes (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação de 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes através do método de leitura de ponto final, empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação

Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental da amostra A (µg/ml)	Concentração experimental da amostra B (µg/ml)	Concentração experimental da amostra C (µg/ml)	Concentração experimental média (µg/ml)
10,0	10,0	9,1	9,4	9,5
15,0	15,8	13,7	15,0	14,8
20,0	22,1	20,1	21,9	21,4
25,0	26,4	24,0	24,7	25,0
30,0	30,4	27,9	28,9	29,1

5.2.2. Tempo de reação vs. Logaritmo da Concentração de Apramicina

5.2.2.1. Especificidade e seletividade

As mesmas considerações feitas quanto a especificidade e seletividade para o método de ponto final se aplicam ao método cinético - tempo de reação, uma vez que os princípios do ensaio são os mesmos, apenas sendo alterada a forma de relacionar a resposta (tempo de reação ao invés de absorbância) com a concentração do antibiótico.

5.2.2.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear

O método de leitura de cinética - tempo de reação - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absorbância de 25 mAU apresentou linearidade satisfatória, com equações de reta $Y = 1,52 + 0,219X$, $Y = 1,52 + 0,197X$ e $Y = 1,46 + 0,198X$ e coeficiente de correlação 0,771; 0,862 e 0,953, para as curvas 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 13).

Figura 13. Gráfico de tempo de reação vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absobância de 25 mAU.

5.2.2.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para o método de leitura cinética - tempo de reação - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absorbância de 25 mAU foram de 0,5 µg/ml e 1,7 µg/ml, respectivamente.

5.2.2.4. Exatidão

O método de leitura cinética - área sob a curva - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo e diferença de absorbância de 25 mAU apresentou exatidão adequada (102,3%), não apresentando tendência fixa e tendência relativa (Figura 14).

Figura 14. Gráfico de concentrações de amostras simuladas determinadas experimentalmente através do método de leitura cinética - área sob a curva (empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inoculo e diferença de absorbância de 25 mAU) vs. concentrações teóricas das amostras simuladas.

5.2.2.5. Precisão

O método de leitura cinética - tempo de reação - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inoculo e diferença de absobância de 25 mAU apresentou baixa precisão (32,6%). Foram avaliadas 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes, totalizando 15 ensaios independentes (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação de 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes através do método de leitura cinético - tempo de reação, empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inoculo e diferença de absobância de 25 mAU

Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental da amostra A (µg/ml)	Concentração experimental da amostra B (µg/ml)	Concentração experimental da amostra C (µg/ml)	Concentração experimental média (µg/ml)
10,0	15,8	12,3	4,5	10,8
15,0	17,9	11,1	7,5	12,2
20,0	22,5	22,2	16,8	20,5
25,0	26,9	26,7	17,9	23,8
30,0	37,6	32,6	21,7	30,6

5.2.3. Área sob a Curva vs. Logaritmo da Concentração de Apramicina

5.2.3.1. Especificidade e seletividade

As mesmas considerações feitas quanto a especificidade e seletividade para o método de ponto final se aplicam ao método cinético - área sob a curva, uma vez que os princípios do ensaio são os mesmos, apenas sendo alterada a forma de relacionar a resposta (área sob a curva ao invés de absorbância) com a concentração do antibiótico.

5.2.3.2. Linearidade, faixa ou intervalo linear

O método de leitura de cinética - área sob a curva - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação apresentou linearidade satisfatória, com equações de reta $Y = 8832 - 4408X$; $Y = 10181 - 5000X$ e $Y = 11000 - 5408X$ e coeficiente de correlação 0,991; 0,982 e 0,992, para as curvas 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 15).

Figura 15. Gráfico de área sob a curva (ASC) vs. logaritmo da concentração de apramicina ($\mu\text{g/mL}$) empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação.

5.2.3.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para o método de leitura cinética - área sob a curva - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação foram de 0,7 µg/ml e 2,2 µg/ml, respectivamente.

5.2.3.4. Exatidão

O método de leitura cinética - área sob a curva - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação apresentou exatidão adequada (103,4%), não apresentando tendência fixa e tendência relativa (Figura 16).

Figura 16. Gráfico de concentrações de amostras simuladas determinadas experimentalmente através do método de leitura cinética - área sob a curva (empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação) vs. concentrações teóricas das amostras simuladas.

5.2.3.5. Precisão

O método de leitura cinética - área sob a curva - empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inoculo após 120 minutos de incubação apresentou precisão adequada (11,7%). Foram avaliadas 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes, totalizando 15 ensaios independentes (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação de 3 amostras simuladas em 5 concentrações diferentes através do método de leitura cinético - área sob a curva, empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inoculo após 120 minutos de incubação

Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental da amostra A (µg/ml)	Concentração experimental da amostra B (µg/ml)	Concentração experimental da amostra C (µg/ml)	Concentração experimental média (µg/ml)
10,0	11,2	10,2	8,3	9,9
15,0	15,6	12,4	12,3	13,4
20,0	22,4	20,9	20,2	21,2
25,0	26,0	25,9	22,8	24,9
30,0	33,1	30,5	26,5	30,0

5.3. Comparação dos métodos de leitura de ponto final e leitura cinética

A validação do método em microplacas empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) como inóculo abrangeu a avaliação dos parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, faixa ou intervalo linear, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Para os três modos de leitura (leitura de ponto final, leitura cinética - "tempo de reação" e leitura cinética - "área sob a curva") as respostas relativas ao crescimento microbiano na presença do antibiótico foram o mesmo, entretanto, tratados de maneiras distintas. Os resultados das validações dos métodos empregando leitura de ponto final, leitura cinética - "tempo de reação" - e leitura cinética - "área sob a curva" - estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação dos resultados das validações dos métodos empregando leitura de ponto final, leitura cinética - "tempo de reação" - e leitura cinética - "área sob a curva"

Parâmetro	Leitura de ponto final	Leitura cinética - "tempo de reação"	Leitura cinética - "área sob a curva"
Especificidade e Seletividade	Microrganismo-teste sensível ao antibiótico, confere especificidade e seletividade ao método	Microrganismo-teste sensível ao antibiótico, confere especificidade e seletividade ao método	Microrganismo-teste sensível ao antibiótico, confere especificidade e seletividade ao método
Linearidade, faixa ou intervalo linear	Curva 1: $r^2 = 0,996$ $Y = 264,4 - 150,8X$ Curva 2: $r^2 = 0,996$ $Y = 275,1 - 153,8X$ Curva 3: $r^2 = 0,993$ $Y = 270,7 - 151,5X$ faixa ou intervalo linear: 5 a 35 µg/ml	Curva 1: $r^2 = 0,771$ $Y = 1,52 + 0,219X$ Curva 2: $r^2 = 0,862$ $Y = 1,52 + 0,197X$ Curva 3: $r^2 = 0,953$ $Y = 1,26 + 0,198X$ faixa ou intervalo linear: 5 a 35 µg/ml	Curva 1: $r^2 = 0,991$ $Y = 8832 - 4408X$ Curva 2: $r^2 = 0,982$ $Y = 10181 - 5000X$ Curva 3: $r^2 = 0,992$ $Y = 11000 - 5408X$ faixa ou intervalo linear: 5 a 35 µg/ml
Limite de detecção e quantificação	LD = 0,1 µg/ml LQ = 0,4 µg/ml	LD = 0,5 µg/ml LQ = 1,7 µg/ml	LD = 0,7 µg/ml LQ = 2,2 µg/ml
Exatidão	98,5% Não apresenta tendência fixa e tendência relativa	102,3% Não apresenta tendência fixa e tendência relativa	103,4% Não apresenta tendência fixa e tendência relativa
Precisão	DPR = 6,0%	DPR = 32,6%	DPR = 11,7%

O ensaio empregando leitura de ponto final apresentou melhores resultados quanto aos parâmetros de validação avaliados em relação aos ensaios com modo de leitura cinética ("tempo de reação" e "área sob a curva"). Mesmo quando o antibiótico é avaliado pelo emprego do ensaio de ponto final, a realização de leituras das respostas em intervalos de tempo estabelecidos é interessante, particularmente para situações de desenvolvimento de método analítico, uma vez que permite que cada tempo de leitura se configure num ensaio de ponto final.

O ensaio com modo de leitura cinética baseado no "tempo de reação" embora apresente vantagem quanto ao tempo reduzido para realização obtenção das respostas, demonstrou baixa precisão (32,6%) e linearidade limitada (r^2 entre 0,771 e 0,953). Ainda assim, este tipo de ensaio pode ser interessante em situações em que a quantidade de antibiótico presente na amostra abrange uma faixa ampla de concentrações, sendo empregado como ensaio de diluição seriada.

A aplicação do ensaio com modo de leitura cinética baseado na "área sob a curva" mostra-se interessante pois a resposta é baseada na curva de crescimento microbiano em determinado período de tempo, não somente na absorbância resultante do crescimento microbiano num determinado momento (ponto final). As curvas de crescimento possibilita avaliação mais consistente, permitindo estabelecer como ocorre a interação entre microrganismo-teste e antibiótico: o antibiótico reduz o tempo de geração e/ou prolonga o tempo da fase *lag*. Estas informações são interessantes particularmente para o estudo de novos antibióticos e outras substâncias com atividade antimicrobiana.

5.3.1. Comparação do ensaio em microplacas com outros métodos

Alguns aspectos gerais fundamentais devem ser considerados para a escolha de um determinado método: (a) custo dos equipamentos e reagentes necessários, (b) tempo envolvido na execução, (c) número de amostras a serem testadas simultaneamente e (d) possibilidade de automação do método. Ainda devem ser considerados os aspectos técnicos inerentes ao método: (a) especificidade e seletividade, (b) linearidade e faixa ou intervalo linear, (c) exatidão, (d) limite de detecção e quantificação, (e) exatidão e (f) precisão.

Nesta abordagem, é importante relacionar vantagens e desvantagens do ensaio em microplaca em comparação com outros ensaios (Tabela 7). Assim, o ensaio em microplaca empregando *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5% como inóculo após 120 minutos de incubação foi comparado com os métodos microbiológico de difusão em agar e cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 7. Comparação entre os métodos empregando leitura de ponto final, método de difusão em agar e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.

Parâmetro	Leitura de ponto final	Método de difusão em agar	Cromatografia líquida de alta eficiência
Faixa de trabalho	5 a 35 µg/ml	1 a 4 µg/ml	20 a 40 µg/ml
Precisão	DPR = 6,0%	DPR = 6,0%	DPR = 1,1%
Tempo médio para realização do ensaio	5 horas (3 horas de execução + 2 horas de incubação)	21 horas (3 horas de execução + 18 horas de incubação)	5 horas (3 horas de execução + 2 horas de corrida cromatográfica)
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Relevância terapêutica - Maior rapidez - Facilidade operacional 	<ul style="list-style-type: none"> - Relevância terapêutica - Maior sensibilidade - Não necessita equipamento específico 	<ul style="list-style-type: none"> - Maior precisão - Reprodutibilidade - Maior rapidez
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Necessita equipamento específico - Menor precisão 	<ul style="list-style-type: none"> - Demora do ensaio - Menor precisão 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessita equipamento específico - Não avalia atividade

Ambos os ensaios microbiológicos, em microplaca e de difusão em agar, permitem avaliação da atividade do antibiótico frente a microrganismo-teste sensível. Esta característica é particularmente interessante em casos em que há suspeita de ineficácia ou perda da atividade do antibiótico. O ensaio em microplaca apresenta vantagens em relação ao método de difusão em agar quanto a facilidade operacional, a maior rapidez para obtenção das respostas, a possibilidade de análise simultânea de grande número de amostras e menor quantidade de reagentes e meios de cultura envolvida no ensaio. O custo elevado, associado à necessidade de equipamento para incubação e leitura de microplacas, é a principal desvantagem do ensaio em microplaca em relação ao método de difusão em agar.

Em comparação com o método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, a principal vantagem dos ensaios microbiológicos, seja em microplacas ou por difusão em agar, diz respeito a avaliação da atividade do antibiótico frente a microrganismo-teste sensível. Outra vantagem do ensaio em microplaca em relação ao método físico-químico é a possibilidade de análise simultânea de grande número de amostras sem que o tempo envolvido na realização do teste seja alterado. A menor precisão e menor reprodutibilidade podem ser destacadas como desvantagem do ensaio em microplaca em relação ao método por cromatografia líquida de alta eficiência.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As condições ideais para a dosagem microbiológica de apramicina em microplacas e modo de leitura cinética abrangem curva-padrão com concentrações entre 5 e 35 µg/ml, emprego de meio de cultura caldo de triptona-soja inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) na proporção de 5%, o período de incubação de 2 horas.
- O método em microplacas empregando leitura de ponto final apresentou especificidade e seletividade adequadas, linearidade na faixa de 5 a 35 µg/ml, limite de detecção e quantificação de 0,1 e 0,4 µg/ml, respectivamente, exatidão (recuperação = 98,5%) e precisão (DPR = 6,0%) satisfatórias. Este método apresentou melhores resultados em comparações aos métodos empregando leitura cinética.
- As principais vantagens do método em microplacas são: (a) avaliação da atividade do antibiótico frente a microrganismo-teste sensível, (b) facilidade operacional, (c) maior rapidez para obtenção das respostas, (d) possibilidade de análise simultânea de grande número de amostras, (e) menor quantidade de reagentes e meios de cultura envolvida no ensaio e (f) emprego de equipamento único para incubação e leitura das respostas.
- Dentre as desvantagens do método em microplacas destacam-se: (a) custo elevado associado à necessidade de equipamento para incubação e leitura de microplacas e (b) menor precisão e menor reprodutibilidade em relação aos métodos físico-químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.P., DUTHIE, E.S. Effect of pH of the medium on activity of streptomycin and penicillin. *Lancet*, v. 1, p. 455-459, 1946.

BAMBA, H. et al. Assay for susceptibility of *Helicobacter pylori* to antibiotics using 96-well flat-bottom microplate and microplate reader. *Rinsho Kensa*, v. 41, n. 1, p. 101-106, 1997.

BARRET, J. M. et al. Evaluation of DNA repair inhibition by antitumor or antibiotic drugs using a chemiluminescence microplate assay. *Carcinogenesis*, v. 18, n. 12, p. 2441-2445, 1997.

BERRIDGE, J., BARRET, J. A rapid turbidimetric method for the assay of antibiotics. *Nature*, v. 167, n. 448, 1951.

BERRIDGE, N.J., BARRET, J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, v. 6, p. 14-20, 1952.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; CORCIA, A.; LAGANÁ, A.; MELE, M.; NAZZARI, M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067, p. 93-100, 2005.

BONTCHEV, P. R.; PAPAZOVA, P.; CONFINO, M.; DIMOVA, D. Spectrophotometric method for determination of tobramycin, apramycin and kanamycin in formulations. *Mikrochimica Acta*, v. 3, n. 5-6, p. 459-465, 1984.

BOND, C.R., DAVIES, O.L. The microbiological assay of penicillin by the turbidimetric method, using *Staphylococcus aureus*. *Analyst*, v. 73, p. 251-254, 1948.

BORISEVICH, V. et al. A highly sensitive and versatile virus titration assay in the 96-well microplate format. *Journal of Virological Methods*, v. 147, n. 2, p. 197-205, 2008.

BRADY, M. S.; KATZ, S. E. Turbidimetric assay for tetracyclines in feeds using a microtiter plate system. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 74, p. 465-470, 1991.

BRADY, M.S.; KATZ, S.E. Incidence of Residues in Food Animal Origin. In: AGARWAL, K.V. *Analysis of Antibiotic/ Drug Residues in Food Products of Animal Origin*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1992. p. 5-19.

BRASIL, Resolução RE no. 899 de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002.

BRITISH Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2008, p. A323-A329.

BRITISH pharmacopoeia (Veterinary). London: Her Majesty's Stationery Office, 2008. p. 38-40; p.122-125.

BURTON, E. et al. A microplate spectrofluorimetric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 34, n. 1, p. 1-4, 2007.

CAULCUTT, R., BODDY, R. *Statistics for analytical chemists*. London: Chapman & Hall, 1983. 253p.

CHAMBERS, H. F. Aminoglicosídeos. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, cap. 45, p. 1039-1054.

CHAMBERS, H. F. Princípios gerais de terapia antimicrobiana. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, cap. 42, p. 983-997.

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

FALK, C.R. Adaptation of antibiotic assay methods for routine use. Am. J. Public Health, v. 43, p. 419-425, 1953.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988, pt. 1, p. V.5.2.17.-V.5.2.17-15

FIELDING, J. A simple method of estimating penicillin and other bacteriostatics. Br. Med. J., p. 136-137, 1947.

FLEMING, A. Estimation of penicillin in serum use of glucose, phenol red, and serum water. Lancet, v. 252, n. 6448, p. 401-402, 1947.

FLEMING, A. In vitro tests of penicillin potency. Lancet, v. 242, n. 6199, p. 732-733, 1942.

FLEMING, A. Micromethods of estimating penicillin in blood serum. Lancet, v. 247, n. 6324, p. 620-621, 1944.

FOSTER, J.W., WILKER, B.L. Microbiological aspects of penicillin. II. Turbidimetric studies on penicillin inhibition. *J. Bacteriol.*, v. 46, n. 1, p. 377-389, 1943.

FOSTER, J.W., WOODRUFF, H.B. Microbiological aspects of penicillin. I. Methods of assay. *J. Bacteriol.*, v. 46, p. 187-202, 1943.

FOSTER, W.J. Quantitative estimation of penicillin. *J. Biol. Chem.*, v. 144, p. 285-286, 1942.

GAVIN, J.J. Analytical microbiology III. Turbidimetric methods. *Appl. Microbiol.*, v. 5, p. 235-243, 1957.

GOODMAN & GILMAN *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: Ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, p. 1039-1042.

HERMANN, T.; TERESHKO, V.; SKRIPKIN, E.; PATEL, D.J. Apramycin recognition by human ribosomal decoding site. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 38, p. 193-198, 2007.

HEWITT, W. *Microbiological assay*. Orlando: Academic Press, 1977, p. 17-68, 136-150, 214-242.

HOBBY, G.L., MEYER, K., CHAFFE, E. Activity of penicillin in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 50, n. 2, p. 277-280, 1942.

HOLLOWACHUK, S. A. et al. A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, p. 441-446, 2003.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - DOQ-CGCRE-008 Revisão 01 - Março/2003 - Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - Rio de Janeiro, 2003, 35p.

ISOHERRANEN N.; SOBACK S. Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of AOAC International*, 82(5), Set-Out 1999, p. 1017-1045.

JOSHI, S. HPLC Separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 795-809, 2002.

JOSLYN, D.A. Penicillin assay. Outline of four-hour turbidimetric method. *Science*, v. 99, p. 21-22, 1944.

JOSLYN, D.A., GALBRAITH, M. A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *J. Bacteriol.*, v. 59, p. 711-716, 1950.

KAVANAGH, F. Automated system for analytical microbiology V. Calibrations lines for antibiotics. *J. Pharm. Sci.*, v. 64, n. 5, p. 844-850, 1975.

KAVANAGH, F. Dilution methods of antibiotic assays. In: KAVANAGH, F. *Analytical microbiology*. 1 ed. New York: Academic Press, 1963. cap. 3, p. 125-140.

KAVANAGH, F. Elements of photometric assaying. In: KAVANAGH, F. *Analytical microbiology*. 1 ed. New York: Academic Press, 1963. cap. 4, p. 141-217.

KAVANAGH, F. Photometric assaying. In: KAVANAGH, F. *Analytical microbiology volume II*. 1 ed. New York: Academic Press, 1972. cap. 3, p. 43-121.

LAMAR, J. ; PETZ, M. Development of a receptor microplate assay for detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Analytica Chimica Acta*, v. 586, n. 1-2, p. 296-303, 2007.

LEE, S.W., FOLEY, E.J., EPSTEIN, J.A., WALLACE, J.H.Ir. Improvements in the turbidimetric assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, v. 152, p. 485-486, 1944.

LETHINEN, J. et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, n. 3, p. 381-389, 2006.

LOVERING, A. M.; WHITE, L. O.; REEVES, D. S. Identification of aminoglycoside - acetylating enzymes by high pressure liquid chromatographic determination of their reaction products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 10-12, 1984.

LOY, H.W., WRIGHT, W.W. Microbiological assay of amino acids, vitamins and antibiotics. Application of tube methods. *Anal. Chem.*, v. 31. n. 6, p. 971-974, 1959.

MARTINDALE: THE COMPLETE DRUG REFERENCE, 35.ed. London: Ed. Pharmaceutical Press, 2007, p. 182.

MAY, J.R., VOUREKA, A.E., FLEMING, A. Some problems in the titration of streptomycin. *Br. Med. J.*, v. 1, p. 627-630, 1947.

MAYO, L. A.; CURNUTTE, J. T. Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 567-575, 1990.

McMAHAN, J.R. A new automated system for microbiological assays. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, v. 130, n. 2, p. 680-685, 1965.

McMAHAN, J.R. An improved short time turbidimetric assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, v. 153, p. 249-158, 1944.

MEGOULAS, N.C.; KOUPPARIS, M.A. Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma and urine. *Anal. Bioanal. Chemistry*, v. 382, p. 290-296, 2005.

O'CONNOR S., LAM, L.K.T., JONES, N.D., O.CHANEY, M. Apramycin, a unique aminocyclitol antibiotic. *J. Org. Chem.*, vol. 41, n. 12, 1976, p. 2087.

PERZYNSKI, S.; CANNON M.; CUNDLIFE E.; CHAHWALA S.B.; DAVIES J. Effects of apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic on bacterial protein synthesis. *European Journal of Biochemistry*, v. 99, n. 3, p. 623-628, 1979.

PETTIT, R. K. et al. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 7, p. 2612-2617, 2005.

PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T. Dosagem microbiológica de antibióticos e fatores de crescimentos. In: PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003, cap. 8, p. 259-287.

PLATT, T.B., GENTILE, J., GEORGE, M.J. An automated turbidimetric system antibiotic for assay. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 2, n.130, p. 664-671, 1965.

POLTA, J.A.; JOHNSON, D.C.; MERKEL, K.E. Liquid chromatographic separation of aminoglycosides with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography*, v.324, p.407-414, 1985.

RAKE, G., JONES, H. A rapid method for estimation of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 54, p. 189-190, 1943.

RAKE, G., MACKEE, C.M., JONES, H. A rapid test for the activity of certain antibiotic substances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 51, n. 2, p. 273-274, 1942.

RAMMELKAMP, C.H. A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exsudates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 51, n. 1, p. 95-97, 1942.

RIPPERE, R.A. Some principles of microbiological turbidimetric assay of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 62, n. 4, p. 951-956, 1979.

SERRANO, J.M.; SILVA, M. Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, v.1117, p.176-183, 2006.

SMITH, S. M. et al. An enhanced miniaturized assay for antimicrobial prospecting. *Journal of Microbiological Methods*, v. 72, p. 103-106, 2008.

SOLTÉS, L. Aminoglycoside antibiotics - Two decades of their HPLC Bionalysis. *Biomedical Chromatography*, v. 13, 1999, p. 3-10.

STEAD, D. A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography B*, v. 747, p. 69-93, 2000.

SWARTZ, M.; KRULL, IRA. Validation of Bionalytical Methods - Highlights of FDA's Guidance. Validation Viewpoint. v.21, n.2, p.136-142, 2003.

SWEENEY, D. J.; COLEMAN, M. R. Determination of apramycin in swine kidney tissue by liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of AOAC International, v. 81, n. 6, p. 1141-1145, 1998.

TAMURA, H. et al. A new kinetic automated microplate assay of endotoxin and (1→3)-β-D-glucan. Igaku no Ayumi, v. 166, n. 12, p. 811-812, 1993.

TAMURA, H. et al. A new sensitive microplate assay of plasma endotoxin. Journal of Clinical Laboratory Analysis, v. 6, n. 4, p. 232-238, 1992.

TAMURA, H. et al. Methodological and clinical evaluation of a microplate assay of endotoxin in whole blood sample. Igaku no Ayumi, v. 38, n. 12, p. 1341-1346, 1990.

TAMURA, H. et al. Sensitive microplate method for plasma endotoxin assay. Igaku no Ayumi, v. 158, n. 4, p. 227-228, 1991.

TATSUTA, K.; AKIMOTO, K.; TAKAHASHI, H.; HAMATSU, T.; ANNAKA, M.; KINOSHITA, M. Total synthesis of aminoglycoside antibiotics, apramycin and saccharocin (KA-5685). The Chemical Society of Japan, v. 57, p. 529-538, 1984.

THOMPSON, M. Regression methods in the comparison of accuracy. Analyst, v. 107, p. 1169-1180, 1982.

UNITED States Pharmacopeia. 32 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2009, p. XX-XX.

VALENTINE, F.C.O., JOHNS, R.G.S. A suggested method for the titration of certain antibiotics. *Lancet*, v. 257, p. 1033-1034, 1949.

VALIDATION analytical procedures In: *Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities*, 1996.

VEYSSIER, P.; BRYSKIER, A. Aminocyclitol Aminoglycosides. In: BRYSKIER, A. *Antimicrobial Agents - Antibacterials and Antifungals*. Washington DC: ASM Press, 1999, cap.16, p.453-457.

WALTON, J. R. Apramycin, a new aminocyclitol antibiotic. I. In vitro microbiological studies. *The Journal of antimicrobiological chemotherapy*, v. 4, n. 4, p. 309-313, 1978.

WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, p. 624-632, 1999.

YAMAMOTO, C.H. Aspectos da qualidade da tetraciclina em preparações farmacêuticas sólidas. Correlação entre os métodos de dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência e turbidimétrico. São Paulo, 1999, 277p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ZHANG, L., WANG, Z., CHANG, B., YANG, W. Determination of Apramycin in Animal Feeds by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization and Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, v. 90(4), 2007, p. 885-891.

ZHONG, G.; SMITH, G. P. Kinetic microplate assay of titrating microbial cells. *BioTechniques*, v. 16, n. 5, p. 838-839, 1994.

ZHU, W.; YANG, J.; WEI, W.; LIU, Y.; ZHUANG, S. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography - eletrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *Journal of Chromatography A*, 1207, p. 29-37, 2008.