

**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 gentamicina por difusão em agar –  
proposta de delineamento experimental

Felipe Rebello Lourenço

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Tit. Terezinha de J. Andreoli Pinto

São Paulo  
2006

Felipe Rebello Lourenço

Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em agar –  
proposta de delineamento experimental

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, 18 de dezembro de 2006.

Aos meus pais *Luiz* e *Marisa*, a quem devo a existência, a formação e orientação de vida.

Aos meus irmãos *Guilherme* e *Juliana*, pela compreensão e amizade.

À minha avó, minhas tias e meus primos, pelo carinho e apoio.

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

À Profa. Tit. *Terezinha de Jesus Andreoli Pinto*,  
pela dedicação, orientação e exemplo.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade na efetivação do curso e obtenção do título.

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

Às Profas. Dras. *Telma Mary Kaneko* e *Mitsuko Taba Ohara* do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Às farmacêuticas *Rosa Noriko Yamamoto*, *Janice Campos de Azevedo* e *Fernanda dos Santos Scaramel* pelo auxílio técnico na execução deste trabalho.

À Sra. *Marly Neves Assunção*, Sra. *Cleide Maria de Oliveira Amaral*, Sra. *Sueli Alves Gouvêia*, Sra. *Gláucia Cândido Martins da Silva*, Sra. *Diane Cândido da Silva* e Sr. *Thiago Almeida Gonçalves* pela amizade e apoio.

Ao Dr. *Carlos Hugo Domenech* pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

Aos colegas *Juliano de Moraes Ferreira Silva*, *Débora Cristina de Oliveira* e *Michelle Rigamonti Boscariol* pelo auxílio e apoio.

A todos que colaboraram na execução deste trabalho.

## **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em agar – proposta de delineamento experimental**

A gentamicina é um complexo antibiótico de largo espectro, produzido por actinomicetos do gênero *Micromonospora* e classificado entre os antibióticos aminoglicosídeos, utilizado no tratamento de infecções graves, devidas a microrganismos Gram-negativos. Alterações da sua atividade antimicrobiana, não demonstradas pelos ensaios químicos, podem ser avaliadas pelos ensaios microbiológicos. O objetivo deste trabalho foi comparar os delineamentos experimentais 5 x 1, 2 x 2 e 3 x 1, avaliando-se os parâmetros de validação de especificidade, linearidade, faixa ou intervalo, precisão e exatidão para cada delineamento experimental em diferentes níveis de concentração, apresentações e lotes. O plano de trabalho constituiu-se na realização de 81 ensaios (em 3 réplicas) de doseamento microbiológico de gentamicina. As concentrações das soluções empregadas foram preparadas numa faixa de 1,0 µg/mL a 5,0 µg/mL, diluídos em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0. O meio utilizado foi o meio antibiótico no. 11, com *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Empregou-se 21 mL de meio como camada base e 4 mL de meio inoculado à 1% como camada superfície. As placas foram incubadas por 16-18 horas à 37 ± 1 °C. Os três delineamentos empregados apresentaram especificidade adequada para análise de creme dermatológico e solução injetável contendo sulfato de gentamicina. Também apresentaram exatidão e linearidade no intervalo avaliado. Os delineamentos não apresentaram diferença significativa quanto a precisão. Os resultados foram comparados através da determinação de índices de capacidade do sistema de medição. A análise estatística demonstrou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos delineamentos 5 x 1, 2 x 2 e 3 x 1, sendo equivalentes e intercambiáveis.

Palavras-chave: Doseamento Microbiológico, Sulfato de Gentamicina, Validação de Método, Delineamento Experimental

## **Microbiological assay of gentamicin sulfate by agar diffusion – proposal of experimental design**

Gentamicin is a broad-spectrum antibiotic complex produced by actinomycetes belonging to *Micromonospora* genus and classified among aminoglycoside antibiotics, used in the treatment of serious infections derived from Gram-negative microorganisms. Alterations of their antimicrobial activity not shown in chemical assays can be evaluated through microbiological assays. The aim of this work was to compare 5 x 1, 2 x 2 and 3 x 1 experimental designs, evaluating validation parameters of specificity, linearity, range, precision, and accuracy for each experimental design in different levels of concentration, presentation, and lots. It consisted of 81 assays (in 3 replicas) of gentamicin microbiological dosage. The concentrations of the solutions used were employed in a range from 1.0 µg/ml to 5.0 µg/ml, diluted in phosphate buffer 0.1 M pH 8.0. Antibiotic medium number 11 was used, with *Staphylococcus epidermis* (ATCC 12228). 21ml of medium were used as base layer and 4 ml of medium inoculated at 1% were used as surface layer. The plates were incubated for 16-18 hours at  $37 \pm 1^\circ$  C. The three designs employed showed adequate specificity for analysis of dermatological cream and injectable solution containing gentamicin sulphate. They also showed accuracy and linearity in the range evaluated, but not a significant difference concerning precision. The results were compared by means of the determination of the rates of measurement system capacity. The statistical analysis demonstrated that there is no significant difference among the results obtained through 5 x 1, 2 x 2, and 3 x 1, being these equivalent and interchangeable.

Key-words: Microbiological Assay, Gentamicin Sulfate, Method Validation, Experimental Design

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>001</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>007</b>
<b>2.1. Ensaio de antibióticos em tubos</b>	<b>008</b>
<b>2.1.1. Método de diluição seriada</b>	<b>008</b>
<b>2.1.2. Método turbidimétrico</b>	<b>013</b>
<b>2.2. Método de difusão em agar</b>	<b>019</b>
<b>2.2.1. Teoria da difusão</b>	<b>019</b>
<b>2.2.2. Fatores de interferência no doseamento de antibióticos</b>	<b>026</b>
<b>2.2.2.1. Meios de Cultura</b>	<b>026</b>
<b>2.2.2.2. Microrganismo-teste e preparação do inóculo</b>	<b>028</b>
<b>2.2.2.3. Reservatórios e volume dispensado de solução-teste</b>	<b>030</b>
<b>2.2.2.4. Pré-difusão e Pré-incubação</b>	<b>034</b>
<b>2.2.2.5. pH</b>	<b>036</b>
<b>2.2.2.6. Espessura e uniformidade do agar</b>	<b>038</b>
<b>2.2.2.7. Tempo e temperatura de incubação</b>	<b>040</b>
<b>2.2.2.8. Distribuição do inóculo nas placas de Petri</b>	<b>040</b>
<b>2.2.2.9. Formação de halos duplos</b>	<b>041</b>
<b>2.2.2.10. Dispositivos para leitura da resposta biológica</b>	<b>042</b>
<b>2.2.2.11. Outros fatores de interferência</b>	<b>043</b>



<b><u>2.2.3. Misturas de antibióticos</u></b>	<b><u>045</u></b>
<b><u>2.2.4. Métodos alternativos / automatizados / rápidos</u></b>	<b><u>047</u></b>
<b><u>2.3. Delineamentos experimentais</u></b>	<b><u>055</u></b>
<b><u>2.3.1. Tipos de delineamentos</u></b>	<b><u>055</u></b>
<b><u>2.3.1.1. Ensaio balanceado ou fatorial (2 x 2)</u></b>	<b><u>058</u></b>
<b><u>2.3.1.2. Ensaio balanceado ou fatorial (3 x 3)</u></b>	<b><u>059</u></b>
<b><u>2.3.1.3. Ensaio com interpolação em curva padrão (5 x 1)</u></b>	<b><u>060</u></b>
<b><u>2.3.1.4. Ensaio em placas grandes</u></b>	<b><u>062</u></b>
<b><u>2.3.1.5. Outros delineamentos</u></b>	<b><u>065</u></b>
<b><u>2.4. Validação de métodos analíticos</u></b>	<b><u>065</u></b>
<b><u>2.4.1. Planejamento da validação</u></b>	<b><u>069</u></b>
<b><u>2.4.2. Documentação de métodos validados</u></b>	<b><u>070</u></b>
<b><u>2.4.3. Parâmetros de validação</u></b>	<b><u>072</u></b>
<b><u>2.4.3.1. Especificidade e seletividade</u></b>	<b><u>072</u></b>
<b><u>2.4.3.1.1. Testes de especificidade</u></b>	<b><u>073</u></b>
<b><u>2.4.3.1.2. Testes de seletividade</u></b>	<b><u>074</u></b>
<b><u>2.4.3.2. Intervalo ou faixa linear de trabalho</u></b>	<b><u>076</u></b>
<b><u>2.4.3.2.1. Escolha da faixa de trabalho</u></b>	<b><u>077</u></b>
<b><u>2.4.3.3. Linearidade</u></b>	<b><u>079</u></b>
<b><u>2.4.3.3.1. Sensibilidade</u></b>	<b><u>081</u></b>
<b><u>2.4.3.4. Limite de detecção</u></b>	<b><u>081</u></b>
<b><u>2.4.3.5. Limite de quantificação</u></b>	<b><u>082</u></b>
<b><u>2.4.3.6. Exatidão e tendência</u></b>	<b><u>083</u></b>
<b><u>2.4.3.6.1. Materiais de referência certificado</u></b>	<b><u>084</u></b>
<b><u>2.4.3.6.2. Comparação de métodos</u></b>	<b><u>085</u></b>

<u>2.4.3.6.3. Recuperação</u>	<u>085</u>
<u>2.4.3.6.4. Tipos de tendência</u>	<u>086</u>
<u>2.4.3.7. Precisão</u>	<u>090</u>
<u>2.4.3.7.1. Repetitividade</u>	<u>091</u>
<u>2.4.3.7.2. Reprodutibilidade</u>	<u>092</u>
<u>2.4.3.7.3. Precisão intermediária</u>	<u>092</u>
<u>2.4.3.7.4. Comparação da precisão entre métodos</u>	<u>093</u>
<u>2.4.3.8. Robustez</u>	<u>094</u>
<u>2.5. Aspectos gerais sobre gentamicina</u>	<u>095</u>
<u>2.5.1. Gentamicina</u>	<u>095</u>
<u>2.5.2. Métodos microbiológicos</u>	<u>096</u>
<u>2.5.3. Métodos físico-químicos</u>	<u>098</u>
<u>3. OBJETIVO</u>	<u>100</u>
<u>4. MATERIAL E MÉTODO</u>	<u>102</u>
<u>4.1 Material</u>	<u>103</u>
<u>4.1.1. Soluções diluentes e meios de cultura</u>	<u>103</u>
<u>4.1.1.1. Caldo de caseína-soja</u>	<u>103</u>
<u>4.1.1.2. Tampão fosfato 0,1 M pH 8</u>	<u>104</u>
<u>4.1.1.3. Meio antibiótico n° 1</u>	<u>104</u>
<u>4.1.1.4. Meio antibiótico n° 11</u>	<u>105</u>
<u>4.1.2. Padrão de sulfato de gentamicina</u>	<u>105</u>
<u>4.1.3. Amostras de sulfato de gentamicina</u>	<u>106</u>

4.1.3.1. Matéria-prima	106
4.1.3.2. Solução injetável	107
4.1.3.3. Creme dermatológico	108
4.1.4. Microrganismo-teste	108
<b>4.2. Método</b>	<b>109</b>
4.2.1. Plano de trabalho	109
4.2.2. Preparação das amostras de sulfato de gentamicina	111
4.2.2.1. Matéria-prima	111
4.2.2.2. Solução injetável	111
4.2.2.3. Creme dermatológico	112
4.2.3. Preparação das soluções antibióticas	112
4.2.3.1. Delineamento 2 x 2	112
4.2.3.1.1. Padrão de gentamicina	112
4.2.3.1.2. Matéria-prima	113
4.2.3.1.3. Solução injetável	113
4.2.3.1.4. Creme dermatológico	114
4.2.3.2. Delineamento 5 x 1	114
4.2.3.2.1. Padrão de gentamicina	114
4.2.3.2.2. Matéria-prima	115
4.2.3.2.3. Solução injetável	115
4.2.3.2.4. Creme dermatológico	116
4.2.3.3. Delineamento 3 x 1	116
4.2.3.3.1. Padrão de gentamicina	116
4.2.3.3.2. Matéria-prima	117
4.2.3.3.3. Solução injetável	117

<u>4.2.3.3.4. Creme dermatológico</u>	<u>117</u>
<u>4.2.4. Preparação da suspensão microbiana</u>	<u>118</u>
<u>4.2.5. Preparação das placas com meio basal e inoculado</u>	<u>118</u>
<u>4.2.6. Delineamentos Experimentais empregados</u>	<u>118</u>
<u>4.2.6.1. Delineamento 2 x 2</u>	<u>119</u>
<u>4.2.6.2. Delineamento 5 x 1</u>	<u>120</u>
<u>4.2.6.3. Delineamento 3 x 1</u>	<u>121</u>
<u>4.2.7. Incubação das placas</u>	<u>122</u>
<u>4.2.8. Leitura da resposta biológica</u>	<u>122</u>
<u>4.2.9. Determinação da potência de gentamicina</u>	<u>124</u>
<u>4.2.9.1. Delineamento 2 x 2</u>	<u>123</u>
<u>4.2.9.2. Delineamento 5 x 1</u>	<u>124</u>
<u>4.2.9.3. Delineamento 3 x 1</u>	<u>125</u>
<u>4.2.10. Avaliação dos parâmetros de validação do método analítico</u>	<u>126</u>
<u>4.2.10.1. Avaliação da especificidade</u>	<u>127</u>
<u>4.2.10.2. Avaliação da exatidão</u>	<u>127</u>
<u>4.2.10.3. Avaliação da precisão</u>	<u>128</u>
<u>4.2.10.4. Avaliação da linearidade e faixa linear</u>	<u>129</u>
<u>4.2.11. Comparação entre os diferentes delineamentos</u>	<u>129</u>
<u>4.2.12. Comparação entre as diferentes apresentações</u>	<u>130</u>
<u>4.2.13. Comparação entre os diferentes níveis de concentração</u>	<u>130</u>
<u>4.2.14. Comparação entre os diferentes lotes da preparação</u>	<u>131</u>

<b>5. RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>132</b>
---------------------------------	------------

---

<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>176</b>
---------------------	------------

---

<b>7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>179</b>
------------------------------------	------------

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b><u>Tabela 1. Classificação dos métodos analíticos.</u></b>	<b><u>068</u></b>
<b><u>Tabela 2. Conjunto de testes exigidos para validação de métodos analíticos.</u></b>	<b><u>068</u></b>
<b><u>Tabela 3. Intervalo recomendado para cada tipo de ensaio.</u></b>	<b><u>077</u></b>
<b><u>Tabela 4. Resultados do doseamento microbiológico de matéria-prima de gentamicina pelo delineamento 2 x 2.</u></b>	<b><u>140</u></b>
<b><u>Tabela 5. Resultados do doseamento microbiológico de solução injetável de gentamicina pelo delineamento 2 x 2.</u></b>	<b><u>141</u></b>
<b><u>Tabela 6. Resultados do doseamento microbiológico de creme dermatológico de gentamicina pelo delineamento 2 x 2.</u></b>	<b><u>142</u></b>
<b><u>Tabela 7. Resultados do doseamento microbiológico de matéria-prima de gentamicina pelo delineamento 5 x 1.</u></b>	<b><u>143</u></b>
<b><u>Tabela 8. Resultados do doseamento microbiológico de solução injetável de gentamicina pelo delineamento 5 x 1.</u></b>	<b><u>144</u></b>
<b><u>Tabela 9. Resultados do doseamento microbiológico de creme dermatológico de gentamicina pelo delineamento 5 x 1.</u></b>	<b><u>145</u></b>

**Tabela 10. Resultados do doseamento microbiológico de matéria-prima de gentamicina pelo delineamento 3 x 1. 146**

---

**Tabela 11. Resultados do doseamento microbiológico de solução injetável de gentamicina pelo delineamento 3 x 1. 147**

---

**Tabela 12. Resultados do doseamento microbiológico de creme dermatológico de gentamicina pelo delineamento 3 x 1. 148**

---

**Tabela 13. Validade dos doseamentos microbiológicos de sulfato de gentamicina pelo delineamento 2 x 2 em diferentes amostras. 150**

---

**Tabela 14. Validade dos doseamentos microbiológicos de sulfato de gentamicina pelo delineamento 5 x 1 em diferentes amostras. 152**

---

**Tabela 15. Validade dos doseamentos microbiológicos sulfato de gentamicina pelo delineamento 3 x 1 em diferentes amostras. 153**

---

**Tabela 16. Diâmetro dos halos de soluções de matéria-prima e matéria-prima + placebo. 156**

---

**Tabela 17. Resultados do teste de especificidade para creme dermatológico de sulfato de gentamicina. 157**

---

**Tabela 18. Resultados do teste de especificidade para solução injetável de sulfato de gentamicina.** **158**

---

**Tabela 19. Índices de capacidade dos efeitos de diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração.** **174**

---

**Tabela 20. Índices de capacidade das interações de diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração.** **174**

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b><u>Figura 1. Método com tendência fixa.</u></b>	<b><u>088</u></b>
<b><u>Figura 2. Método com tendência relativa.</u></b>	<b><u>088</u></b>
<b><u>Figura 3. Método com tendência fixa e relativa.</u></b>	<b><u>089</u></b>
<b><u>Figura 4. Método sem tendência.</u></b>	<b><u>089</u></b>
<b><u>Figura 5. Estrutura química do complexo gentamicina C.</u></b>	<b><u>095</u></b>
<b><u>Figura 6. Plano de trabalho para doseamento microbiológico de sulfato de gentamicina.</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>Figura 7. Esquema de distribuição das soluções-teste empregado no delineamento 2 x 2.</u></b>	<b><u>119</u></b>
<b><u>Figura 8. Esquema de distribuição das soluções-teste empregado no delineamento 5 x 1.</u></b>	<b><u>120</u></b>
<b><u>Figura 9. Esquema de distribuição das soluções-teste empregado no delineamento 3 x 1.</u></b>	<b><u>121</u></b>
<b><u>Figura 10. Placas do doseamento microbiológico de gentamicina pelo delineamento 3 x 1 antes (esquerda) e depois (direita) do período de incubação.</u></b>	<b><u>122</u></b>
<b><u>Figura 11. Dispositivo para leitura de halos Eli Lilly Antibiotic Zone Reader®.</u></b>	<b><u>123</u></b>

**Figura 12. Gráfico dos resultados da avaliação da exatidão para o delineamento 2 x 2. 161**

**Figura 13. Gráfico dos resultados da avaliação da associação entre concentração e precisão para o delineamento 2 x 2. 163**

**Figura 14. Gráfico dos resultados da avaliação da exatidão para o delineamento 5 x 1. 165**

**Figura 15. Gráfico dos resultados da avaliação da associação entre concentração e precisão para o delineamento 5 x 1. 167**

**Figura 16. Gráfico dos resultados da avaliação da exatidão para o delineamento 3 x 1. 169**

**Figura 17. Gráfico dos resultados da avaliação da associação entre concentração e precisão para o delineamento 3 x 1. 171**

**Figura 18. Comparação da precisão do delineamentos 2 x 2, 5 x 1 e 3 x 1. 172**

**Figura 19. Gráficos de efeitos dos diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração 175**

**Figura 20. Gráficos das interações dos diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração 175**

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

No estudo dos antimicrobianos e no tratamento das doenças infecciosas, os conceitos de sensibilidade e resistência bacteriana se fundamentam na correlação entre a concentração inibitória mínima (CIM) e os níveis plasmáticos alcançados com o antimicrobiano administrado <sup>79</sup>.

Para se obter concentrações plasmáticas que se caracterizem com atividade biocida ou biostática é necessário que a potência do antimicrobiano esteja adequada nas preparações farmacêuticas que serão administradas ao paciente, cuja infecção se deseja combater. Nesse aspecto, é crescente a preocupação com a qualidade dos medicamentos, sejam os inovadores, genéricos ou similares, a bioequivalência e a estabilidade das formulações <sup>120</sup>.

A quantificação microbiológica de substâncias ativas demanda sempre no emprego de uma avaliação comparativa frente a um padrão biológico de referência. Pode ser empregado um ensaio microbiológico ou direto, ou ainda, microbiológico ou indireto <sup>146</sup>.

Métodos microbiológicos para determinação da potência dos antibióticos são indicados para substâncias ou preparações, em que o seu teor não pode ser determinado por métodos físico-químicos <sup>146</sup>. Este tipo de ensaio tem grande importância na determinação de atividade de antibióticos empregados em associação e cuja potência não pode ser determinada em termos de composição química <sup>93</sup>.

A atividade (potência) de antibióticos pode ser demonstrada sob condições adequadas através de seu efeito inibitório sobre o crescimento microbiano. Uma redução na atividade antimicrobiana pode revelar alterações sutis, não demonstráveis por métodos químicos <sup>191</sup>.

Além disso, os ensaios biológicos não requerem equipamentos especializados nem solventes de alta toxicidade <sup>163</sup>. Deste modo, testes microbiológicos ou biológicos são, geralmente, os métodos de escolha para eliminar dúvidas a respeito de uma possível perda de atividade <sup>191</sup>.

Os dois métodos biológicos mais comumente utilizados para o doseamento de antibióticos são o método de difusão em agar e o método turbidimétrico <sup>146 e 191</sup>.

Tanto o método turbidimétrico como o de difusão em agar estão presentes em compêndios oficiais, tendo constado inicialmente em 1955, na USP 15 <sup>142</sup>. Ao longo de cinco décadas, através de diversas edições de diferentes farmacopéias, os métodos têm sofrido algumas alterações, embora o fundamento seja o mesmo. Tais modificações comumente dizem respeito à natureza do diluente, espécie microbiana e inóculo, concentração da curva-padrão e composição do meio de cultura <sup>204 e 205</sup>.

O método turbidimétrico depende da inibição do crescimento de uma cultura microbiana em uma solução uniforme do antibiótico em meio fluido, o qual deve ser favorável ao crescimento microbiano rápido quando da ausência do antibiótico <sup>191</sup>. Este método considera a relação entre a proporção de crescimento de uma população microbiana no meio líquido e a concentração da substância ensaiada, sendo mais utilizado para dosagem de vitaminas e aminoácidos <sup>146</sup>.

Já o método de difusão em agar depende da difusão do antibiótico através de uma camada de agar solidificado em uma extensão tal que o crescimento do microrganismo seja totalmente inibido em uma área ou zona ao redor do reservatório contendo solução do antibiótico <sup>191</sup>. Neste ensaio, correlaciona-se o tamanho da zona de inibição com a dose da substância ensaiada. Este é o método mais amplamente utilizado para determinação de

potência de antibióticos <sup>146</sup>. O método de difusão emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de mono ou bicamada, através do qual a substância-teste se difunde. A solução-teste é aplicada sobre a superfície deste meio, em uma área restrita, e as placas são então incubadas: o crescimento do microrganismo ocorre respeitando, porém, áreas onde tenha ocorrido a difusão do antibiótico, gerando contraste e resultando na chamada zona de inibição de crescimento. Tal fenômeno origina toda a teoria que fundamenta o método de difusão.

Os ensaios biológicos são procedimentos destinados a avaliar a potência de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopêicas utilizando reagentes biológicos, tais como microrganismos, animais, fluidos e órgãos isolados de animais <sup>62</sup>.

A característica dos reativos biológicos é a sua variabilidade. Enquanto os reativos físico-químicos podem ser definidos e padronizados para fornecerem resultados idênticos em todos os laboratórios, é impossível definir totalmente os reagentes biológicos, apesar dos esforços de entidades internacionais neste sentido. Essa variabilidade inerente aos reativos biológicos torna imprescindível: a) o emprego de padrões de referência adequados para se obter potências relativas e b) o emprego de métodos estatísticos para delineamentos experimentais e análise dos resultados <sup>62</sup>.

Os compêndios oficiais e farmacopéias incluem ensaios de doseamento microbiológico de antibióticos. No entanto, não há um consenso quanto aos delineamentos experimentais. Os delineamentos balanceados 3 x 3 e 2 x 2 são adotados pelas farmacopéias brasileira <sup>61 a 63</sup> e britânica <sup>27 a 34</sup>, enquanto que a farmacopéia americana <sup>181 a 191</sup> apresenta o delineamento 5 x 1 para o doseamento de antibióticos. É fundamental que se utilize um delineamento experimental adequado quanto aos critérios de linearidade,

precisão e exatidão dos resultados analíticos. É interessante adotar um planejamento experimental que, sem esforço adicional, forneça melhores resultados e permita indicação quanto à validade do ensaio. Entre os fatores a considerar na seleção do delineamento estão o número e a natureza das amostras, e o nível de confiabilidade exigido dos resultados.

O ensaio 2 x 2, conhecido como simétrico ou balanceado, é um delineamento simples e eficiente que emprega duas doses do padrão e duas da amostra, com razão idêntica entre as doses nas duas preparações. Cada placa inclui todas as quatro doses, de forma que o número de réplicas é igual ao número de placas. O ensaio 5 x 1, conhecido como ensaio com interpolação em curva padrão, é um delineamento com uma curva padrão de cinco concentrações. Cada placa inclui duas doses, em posições alternadas, sendo que em todas as placas uma das concentrações é a de referência (concentração central da curva padrão) e a outra é uma das quatro concentrações do padrão ou aquela correspondente à dose da amostra de potência desconhecida (dose nominal equivalente à da referência do padrão). Ambos os delineamentos apresentam vantagens e desvantagens.

A validação do método analítico é sempre fundamental para garantir a qualidade dos resultados. Dentre os parâmetros de validação de métodos analíticos pode-se destacar a linearidade, a exatidão e a precisão como sendo os principais a serem avaliados.

Pelo exposto, pode-se observar que a determinação da potência dos antimicrobianos é de suma importância no controle e na garantia da qualidade das preparações farmacêuticas e, portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados no doseamento desses fármacos.

A associação das características positivas dos delineamentos 2 x 2 e 5 x 1 seria de interesse considerável, uma vez que poderia resultar em melhoria dos parâmetros de

validação, gerando resultados mais seguros e confiáveis. Desta forma, justifica-se a comparação entre os diferentes tipos de delineamentos, conforme proposto por este projeto, assim como o desenvolvimento de delineamento alternativo que reúna as características necessárias para garantir resultados analíticos seguros e confiáveis.



# **REVISÃO DE LITERATURA**

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Ensaio de antibióticos 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 aquela série similar realizada em paralelo contendo concentração conhecida do antibiótico.

RAMMELKAMP<sup>153</sup> ressaltou, em 1942, 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. Assim, propôs 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. Foram empregados 0,2 a 0,9 mL de amostra para o teste, com teor de penicilina de cerca de 0,0039 unidades Florey. HOBBY e colaboradores<sup>94</sup> realizaram estudo comparativo deste método com o de difusão Oxford, tendo encontrado erro semelhante para ambos. Foi apresentada como desvantagem do método em placas a 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. Método de diluição em meio sólido foi também descrito <sup>73</sup>, misturando 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.

Na determinação do ácido aspergílico, o teste convencional de diluição em tubos, utilizando o *Streptococcus pyogenes* cepa C203, exigiu para execução cerca de 18 horas <sup>125</sup>. Este foi substituído por método rápido desenvolvido por RAKE e colaboradores <sup>152</sup>. Estes utilizaram *Photobacterium fischieri*, cepa proveniente da *National Collection of Type Cultures* (NCTC) <sup>152</sup> 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 e JONES <sup>151</sup>, em 1943, descreveram procedimento para método de diluição com um microrganismo hemolítico. Foram obtidos resultados satisfatórios empregando *Streptococcus pyogenes*, com leitura em 60 a 90 minutos de teste.

Método titulométrico, com técnica de diluição foi descrito por FLEMING <sup>67</sup> em 1942, tendo sido utilizada a glicose no meio de cultura para compatibilizar o crescimento do *Staphylococcus aureus* na presença de indicador de Andrade. A viragem deste indicador é devida à presença de ácido. O autor sugeriu 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.

O mesmo autor, em 1943, descreveu micrométodo com finalidade de determinação da atividade da penicilina em amostras sangüíneas proveniente de pacientes, disponíveis em

quantidades mínimas; utilizando lâmina como dispositivo para contato da amostra com o *Staphylococcus aureus*. No entanto, em 1944, o próprio FLEMING <sup>68</sup> publicou trabalho substituindo tal microrganismo por *Streptococcus hemoliticus*, e utilizando o sangue como indicador de crescimento, sendo que o crescimento microbiano foi detectado pela presença de hemólise; este procedimento forneceu ponto final mais definido. Outra alteração foi proposta, também, por FLEMING <sup>66</sup> que empregou tubo capilar, evitando o trabalho na preparação das lâminas. O meio de cultura constou de mistura de glicose, vermelho fenol e soro, que após incubação, possibilitou detectar o crescimento do estreptococo pelo aparecimento de precipitado de cor amarela intensa. A diferenciação entre capilares com ausência de crescimento 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. Além de amostras sangüíneas, fluído cerebrospinal e urina foram ensaiados pelo método descrito por FIELDING <sup>64</sup>. O procedimento envolveu a fermentação da glicose em meio de soro aquoso inoculado com *Staphylococcus* cepa Oxford colocado em tubos capilares vedados, sendo observado 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 requerimento de pequena quantidade de amostra, e apresentar facilidade de observação do ponto final, além de exigir pouca manipulação e permitir suficiente exatidão para propósitos clínicos.

ABRAHAM e DUTHIE <sup>1</sup>, em 1946, mostraram que substâncias ácidas, como a penicilina, eram mais ativas em meio ácido, e que substâncias alcalinas, como a estreptomicina, em meio alcalino. Assim, no método de diluição, a formação de ácido durante a incubação tornou a penicilina mais ativa, fazendo com que a viragem fosse pouco

nítida. Por outro lado, a estreptomicina tomou-se menos ativa em meio ácido, proporcionando ponto final de viragem nítido.

Na avaliação quantitativa da estreptomicina, MAY e colaboradores <sup>124</sup>, em 1947, estudaram a influência do meio de cultura, das condições ambientais, 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 através de 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; neste caso, por envolver fermentação da glicose do meio ocorre a precipitação. 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*. No ensaio da estreptomicina, quando em condição de anaerobiose exigem alta concentração de estreptomicina para inibição do crescimento, oposto ao *Streptococcus* que não sofre influência da condição de anaerobiose.

Diferentes meios de cultura líquido foram testados com estreptococo hemolítico, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, bacilo de Friedlander e outros; foram observadas diferenças marcantes, 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, inoculado 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. Neste trabalho foi destacado o erro inerente à técnica, devido à utilização de uma única pipeta capilar na diluição e homogeneização das soluções-teste. Assim, foi recomendada a execução das diluições em 5 ou 6 etapas para evitar o erro cumulativo de uma para outra.

Outro recurso titulométrico foi conseguido através da determinação de amônia liberada a partir de uréia quando o microrganismo-teste é produtor da urease. Neste caso, o *Staphylococcus aureus* cepa Oxford foi proposto por VALENTINE e JOHNS <sup>192</sup>. O vermelho fenol, presente no meio de cultura, passa para coloração amarela quando o pH atinge valor da ordem de 8,3.

Método rápido com meio contendo azul de metileno foi desenvolvido inicialmente com a finalidade de detecção qualitativa de microrganismos no leite, o qual foi usado a seguir por REID e BREWER <sup>156</sup> para ensaios quantitativos da penicilina e estreptomicina.

Método descrito por BERRIDGE e BARRETT <sup>17</sup>, utilizando o *Streptococcus agalactiae*, requereu 30 minutos de incubação quando o inóculo se encontrava 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, operada manualmente, fatores que possibilitaram o preparo de 7 diluições seriadas para cada conjunto, na razão de 1 conjunto por minuto.

FALK <sup>60</sup>, em 1953, descreveu procedimentos para laboratório da rede oficial de saúde, objetivando colaborar no 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. O autor recomendou 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.

Para o ensaio de nisina, várias técnicas para o teste de diluição em tubos foram previamente descritas por BERRIDGE e BARRETT <sup>18</sup> em 1952. O procedimento foi alterado quanto à medida da resposta em densidade óptica e envolvendo período de aproximadamente 30 minutos de incubação; os autores efetuaram a determinação da penicilina, estreptomicina, aureomicina e gramicidina.

### **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 concentrações muito próximas do 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.

O método turbidimétrico foi inicialmente descrito por FOSTER em 1942 <sup>74</sup>. O autor constatou 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, reduzindo posteriormente para 4.

A técnica de 4 horas, estabelecida por FOSTER e WOODRUFF <sup>73</sup>, foi necessária para 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 tal potência por breve período, decaindo a seguir. Neste tipo de análise, alta concentração de microrganismo era utilizado 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. O autores recomendaram o emprego de microrganismo com crescimento rápido, como *Bacillus adhaerans*, que possuía sensibilidade à penicilina equivalente ao *Staphylococcus aureus* cepa H.

McMAHAN <sup>126</sup> apresentou um método, de 3 a 4 horas de incubação, com procedimento semelhante ao ensaio turbidimétrico proposto por FOSTER <sup>74</sup>. Ele estudou as variáveis envolvidas no teste, e concluiu que os resultados apresentavam precisão satisfatória. Pelo estudo comparativo, o autor obteve precisão maior em relação ao teste de diluição em tubos, mas semelhante ao de difusão. Quanto ao aspecto de custo, McMAHAN <sup>126</sup> concluiu que o teste turbidimétrico foi relativamente vantajoso. FOSTER e WILKER <sup>71</sup>, em 1943, trabalhando com dosagens de penicilinas, observaram irregularidades na curva de crescimento do *Staphylococcus aureus*, quando da presença de glicose no meio de cultura.



Concluíram que o retardamento no crescimento microbiano na presença de penicilina foi devido ao prolongamento do tempo de geração das bactérias. Contudo, BOND e DAVIES<sup>21</sup> obtiveram resultados conflitantes, em que apesar da glicose, a curva de crescimento se manteve regular.

JOSLYN<sup>99</sup> propôs, em 1944, um 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.

Também, RAKE e JONES<sup>151</sup> propuseram método turbidimétrico com possibilidade de leitura em cerca de 3 a 4 horas, utilizando Streptococcus. LEE e colaboradores<sup>113</sup> obtiveram resultado em tempo de incubação de 90 minutos, empregando cepa de Streptococcus do grupo B de Lancefield, com exatidão adequada para determinação da penicilina.

Os procedimentos técnicos foram também melhorados pelo emprego de dispositivos auxiliares, tomando os métodos estabelecidos mais rápidos. Para isso, JOSLYN<sup>99</sup> introduziu o uso de tubos padronizados em que a turvação poderia ser lida diretamente no aparelho. McMAHAN<sup>126</sup> propôs a utilização de pipetas especiais para rápida e exata medida das soluções-teste, incluindo modificação na técnica para interromper o crescimento dos microrganismos através da colocação de todos os tubos, ao mesmo tempo, em banho de água quente. 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<sup>21 e 126</sup>.

BOND e DAVIES <sup>21</sup> relataram, em 1948, resultados experimentais a respeito dos fatores que influenciam a exatidão do ensaio turbidimétrico. Neste trabalho utilizaram *Staphylococcus aureus* cepa Oxford NCTC 6571 e cepa americana NRRL 313. Propuseram metodologia empregando 3 concentrações do padrão e da amostra. Da relação entre a medida de turvação e o logaritmo da concentração do antibiótico resultava 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. Os autores apresentaram 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, destacaram as vantagens do método turbidimétrico tendo em vista 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. No estudo da estreptomicina realizado por SMITH e colaboradores <sup>166</sup>, a determinação turbidimétrica foi através de utilização de *Shigella paradysenteriae*.

No sentido de desenvolver método que fosse adequado para determinar a potência de antibióticos em preparações experimentais, JOSLYN e GALBRAITH <sup>100</sup> estudaram 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. Segunda

parte do estudo mostrou vantagem na supressão da fase *lag* de crescimento, através da utilização de inóculo jovem. Os autores <sup>100</sup> definiram 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. Com isto foi desenvolvido o método sem padrão, empregando *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Pasteurella bollingeri*, *Proteus* sp., *Salmonella schottmuelleri*, *Salmonella typhosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei* e vários estreptococos. O ensaio turbidimétrico utilizando padrão foi descrito para determinação do cloranfenicol na presença de *Shigella sonnei*.

GAVIN <sup>83</sup> publicou 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 qualitativo, 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%.

Neste mesmo período, em 1959, LOY e WRIGHT <sup>119</sup> publicaram revisão incluindo vantagens e desvantagens do ensaio turbidimétrico. O estudo, incluindo desenvolvimento e aplicação da metodologia, 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. Os autores destacaram 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.

PLATT e colaboradores <sup>148</sup> mencionaram limitação do método de ensaio turbidimétrico automático, quanto à detecção do dióxido de carbono, devido a sua utilização ser restrita aos microrganismos capazes de produzir alta taxa de dióxido de carbono sob as condições de análise. O 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 para encerrar o ensaio.

McMAHAN <sup>125</sup> em 1965 estabeleceu 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.

KAVANAGH <sup>104</sup> demonstrou que a automação nas etapas críticas do ensaio turbidimétrico 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.

RIPPERE <sup>159</sup> destacou a exatidão e precisão do método turbidimétrico em relação ao de difusão. Validou o procedimento, cuja inclinação da curva padrão foi considerada adequada, na faixa de absorvância entre 0,4 a 1,2. O autor destacou a importância da seleção do espectrofotômetro usado para medir o crescimento bacteriano com a finalidade de assegurar medidas exatas.

## **2.2. Método de difusão em agar**

### **2.2.1. Teoria da difusão**

O ensaio por difusão, desenvolvido para antibióticos é, fundamentalmente, um método físico-químico no qual um microrganismo é utilizado como revelador. Muitas variações observadas são causadas pela negligência dos aspectos físico-químicos e não por variações biológicas <sup>146 e 45</sup>.

Trata-se de um método indireto e gradual que consiste basicamente no preparo de placas contendo meio de cultura sólido previamente inoculado com microrganismo sensível e distribuído em placas. A solução teste é aplicada sobre a superfície deste meio, em uma área restrita, e as placas são então incubadas. O crescimento do microrganismo ocorre respeitando, porém, áreas onde tenha ocorrido a difusão do antibiótico, gerando contraste e resultando na chamada zona de inibição de crescimento <sup>146</sup>.

Os estudos envolvendo ensaios de difusão para antibióticos eram inicialmente restritos, não permitindo extrapolações abrangentes aos novos antibióticos que surgiam. Assim, justificava a investigação dos fatores de interferência sobre zonas de inibição e tratamento teórico quanto à inclinação das curvas dose-resposta. Este enfoque iniciou-se com COOPER e WOODMAN <sup>48</sup> em 1946, que estudando a teoria de difusão em agar utilizaram solução de cristal violeta em tubos. A curva construída da relação entre distância de difusão e o tempo conduziu à reta. Os autores pesquisaram a difusão de antissépticos e da penicilina através do agar e, quando utilizado o cilindro como reservatório da solução-teste encontraram boa correlação entre o diâmetro da zona de inibição de crescimento estabelecido teoricamente e aquele obtido na prática. Contudo, a fórmula derivada para o estudo considerou a difusão linear e não radial, admitindo ser a concentração do antibiótico constante nos cilindros durante as primeiras 8 horas. No entanto, os estudos de RAGHEB <sup>150</sup> demonstraram haver relação direta entre o volume da solução no cilindro e a distância de difusão, quando se considera uma determinada concentração. Foi incluída na equação o termo que explicaria a influência da espessura da camada de agar.

No estudo de HUMPHREY e LIGHTBOWN <sup>96</sup> considerou-se a difusão radial do antibiótico em placas de Petri, a partir de recipientes colocados na superfície do meio de cultura, bem como a espessura da camada de agar. A concentração do antibiótico ao redor do depósito, onde colocado, pode ser expressa teoricamente por equação envolvendo a concentração inicial e a uma dada distância, a espessura da camada de agar, a constante de difusão e o tempo envolvido. Os autores mostraram que a distância de difusão ao quadrado estava relacionada com o logaritmo da espessura do agar. Quando camadas do meio com espessura menor que 1 cm foram utilizadas, o tamanho das zonas de inibição de

crescimento apresentava menor sensibilidade a variações deste elemento. A validade desta equação foi confirmada pela medida da constante de difusão da penicilina, estreptomicina e aureomicina e da concentração crítica dessas substâncias para inibir os microrganismos-teste; foram determinados, também, os valores do tamanho do halo de inibição de crescimento após variar o período de difusão. O fator determinante na inclinação da curva dose-resposta é a constante de difusão do antibiótico, bem como o tempo, pois quando prolongado, poderia aumentar a inclinação.

COOPER e WOODMAN <sup>48</sup>, com a equação proposta para estudo da difusão, relacionaram o diâmetro da zona de inibição a certos parâmetros usados para estudar a influência das variações técnicas dos ensaios. Estudaram o tempo de pré-difusão, densidade do inóculo em relação a sua influência sobre o tamanho dos halos, composição e espessura do meio de cultura. A equação de Cooper foi utilizada para demonstrar a grandeza do erro devido a variações dos parâmetros da própria equação. Esta equação é aplicável a métodos de disco de papel, cilindros e reservatórios como furo no gel, assim como na difusão linear em tubos da qual foi derivada.

A constante de difusão do antibiótico no meio de cultura foi estabelecida por FRIEDMAN e KRAEMER <sup>76</sup> através de dados obtidos experimentalmente. Porém, no trabalho de HUMPHREY e LIGHTBOWN <sup>96</sup> foi verificado que a expressão teórica de FRIEDMAN e KRAEMER <sup>76</sup> estava incorreta, quando a validade da equação foi testada pelo estudo da distância de difusão esperada para vários antibióticos, a diferentes períodos de pré-difusão.

A concentração crítica foi medida como sendo a concentração mínima capaz de inibir o crescimento da população microbiana em questão. Segundo HEWITT <sup>93</sup> a concentração crítica é 4 vezes maior em relação à concentração mínima inibitória.

O tempo crítico, isto é, o tempo de incubação no qual o tamanho dos halos são definidos, é dependente da fase *lag* de crescimento e do tempo de geração do microrganismo, sendo portanto dependente também da temperatura e do tamanho do inóculo inicial. Por outro lado, a concentração do antibiótico não interfere no tempo crítico <sup>93</sup>. Assim, concentração crítica e população crítica são decisivas na definição da posição do limite da zona de inibição de crescimento. Esta zona, então, é influenciada pela difusão do antibiótico ou pelo tempo necessário para alcançar a população crítica. Dados experimentais mostraram concordância com a teoria de difusão, exceto quando o período de incubação é reduzido.

A necessidade do dimensionamento das zonas de inibição conduz à exigência de inóculo com população microbiana homogênea, proporcionando população crítica constante definida e sem tendência à lise. Assim, através da equação estabelecida foi possível, embora com exatidão reduzida, a determinação teórica dos valores de diâmetro para diferentes concentrações do antibiótico, assim como do tempo de difusão envolvido e cálculo da constante de difusão.

Num estudo similar ao de COOPER e WOODMAN <sup>48</sup>, BRADY e KATZ <sup>23</sup> consideraram a constituição do meio, volume do cilindro, espessura de agar e temperatura de incubação como sendo fatores que determinam a otimização do ensaio. Utilizando clortetraciclina e *Bacillus cereus*, quando a temperatura de incubação e nível de nutrientes no meio de cultura foram inferiores aos normalmente utilizados, as zonas de inibição foram



maiores. A espessura do agar foi o fator que mais influenciou a variabilidade da resposta, pois quanto mais fina a camada, maior o efeito do volume contido no cilindro sobre a distância de difusão. O conteúdo dos cilindros, desde que integralmente preenchidos com a solução, pouco influenciou a inclinação da curva dose-resposta. A linearidade da resposta, no entanto, foi pouco influenciada pelos fatores citados.

A revisão apresentada por FINN <sup>65</sup> relatou na teoria de difusão e sua aplicação em análise de antibiótico tendo por finalidade a detecção de erros ou anomalias de natureza técnica. O autor distinguiu 2 tipos de ensaio, pois num deles a difusão da substância dependia da sua concentração e noutro, da quantidade difundida da mesma. A curva padrão construída para o segundo tipo foi baseada no quadrado do tamanho da zona de inibição de crescimento. Foram apresentados métodos de ensaio por difusão linear em tubos ou canais, difusão radial com reservatórios das soluções-teste, cavidades, furos no gel ou filtros de papel. O método de difusão linear, apesar de ser mais simples, não foi indicado para utilização rotineira por apresentar resultados inadequados em relação aos métodos de difusão radial.

GAVIN em 1957 <sup>82</sup>, em sua revisão sobre métodos analíticos por difusão para determinação de antibióticos e vitaminas, definiu através dos vários trabalhos publicados, ensaios com 2 tipos de difusão comumente utilizados. O primeiro foi o de difusão linear com a apresentação de suas desvantagens, sendo limitante para o ensaio de antibióticos; o segundo foi a difusão radial, aplicável para todos os casos.

HEATLEY <sup>89</sup> que precedeu FINN <sup>65</sup>, dividiu as metodologias em 2 grupos, sendo que num deles a zona de inibição de crescimento ou exibição de crescimento depende da concentração da substância-teste e outro, no qual a resposta depende do volume da solução.

Foram descritos detalhadamente procedimentos para colocação das soluções-teste nas placas semeadas, isto é, seja através de cilindros ou furos no gel, cujos recursos foram classificados como dependentes da concentração da solução-teste. Métodos, cujo suporte da solução-teste é o disco de papel de filtro ou sob a forma de gotas, foram considerados dependentes da quantidade da substância testada em cada unidade de suporte. Em comparação com o método de cilindros, o de discos de papel é menos sensível para baixas concentrações da solução-teste.

O estudo teórico-prático da difusão aplicada à análise de substâncias medicamentosas foi efetuado por KAVANAGH <sup>106</sup>. Ele apresentou estudo sobre a equação de Cooper, relacionando o diâmetro das zonas de inibição a diversos parâmetros. As variantes estudadas foram espessura do agar, temperatura, composição do meio, sendo que foram estabelecidos como fatores de influência mais importantes o tempo de pré-difusão e a concentração da carga bacteriana. Neste caso foi destacado o estudo de HUMPHREY e LIGHTBOWN <sup>96</sup> sobre a influência da espessura da camada do agar. Os erros inerentes a ensaios com pré-difusão ocorrem devido a variabilidade da resposta dos diferentes reservatórios das soluções em cada placa e diferença no tempo de pré-difusão entre placas.

WU e colaboradores <sup>202</sup> estudaram a equação de Cooper através da determinação da medida da distância de difusão radial, a vários tempos, da clorhexidina. Desenvolveram modelo matemático, aplicando os conceitos de concentração crítica e tempo crítico para emprego prático, de acordo com a equação de Cooper. A teoria de COOPER e WOODMAN <sup>48</sup> baseou-se na difusão linear, sendo que MITCHISON e SPICER <sup>130</sup> e HUMPHREY e LIGHTBOWN <sup>96</sup> determinaram 4 equações semelhantes. Todas apresentaram desvantagens por considerar a difusão do antibiótico através de meio de

cultura homogêneo, desprezando a partição entre as fases líquida e sólida, respectivamente da solução e do agar. Ainda assim, a conclusão dos autores foi de que as equações desenvolvidas proporcionam base teórica para a equação de Cooper, apresentando-se vantajosas devido à praticidade de sua forma simplificada.

Em 1960, HARRIS <sup>87</sup> também publicou revisão de trabalhos exaltando o emprego de métodos de ensaio microbiológico de antibióticos, vitaminas e aminoácidos em vários tipos de materiais, com a indicação das vantagens e desvantagens dos métodos de diluição seriada, turbidimétrico e de difusão em placas. Alertou para possíveis alterações na precisão dos resultados dos ensaios quando a curva dose-resposta traçada visualmente desviasse da verdadeira relação dose-resposta. Um estudo mais preciso foi realizado por DEUTSCHBERGER e KIRSHBAUM <sup>54</sup> em 1959, empregando cálculo do quadrado mínimo ou linha de regressão, levando em consideração as faixas de concentração adequadas das soluções do padrão, recomendaram que as concentrações das soluções-teste devem ser diluídas na mesma razão do padrão e que o número de observações seja o mesmo para cada ponto. Seus cálculos conduziram aos valores do ponto mais alto e mais baixo da reta de melhor ajuste da curva dose-resposta.

## **2.2.2. Fatores de interferência no doseamento de antibióticos**

### **2.2.2.1. Meios de Cultura**

Dentre os fatores que influenciam o ensaio microbiológico está o meio de cultura. Há uma série de exigências químicas e físicas para o crescimento microbiano, como fontes de carbono e nitrogênio, pH e temperatura. Para alguns dos microrganismos usados em doseamento de antibióticos é suficiente um meio de cultura simples, enquanto outros exigem suplementos. Os meios de cultura são no geral adquiridos na forma desidratada, de diferentes produtores <sup>146</sup>.

Assim, FREEMAN e colaboradores <sup>75</sup> estudaram cerca de 1.000 libras dos meios de cultura antibiótico números 1, 2, 3, 5, 8, 11 e 19, perfazendo o total de 100.000 amostras testadas anualmente. Para isto, cada lote, antes de sua liberação ao mercado, foi submetido a série de triagens para investigar obediência às exigências estabelecidas quanto aos fatores biológicos e físicos, em paralelo aos meios de cultura controle. O estudo envolveu procedimentos iniciando com registros do número do lote do meio, datas da preparação, pesagens e medidas efetuadas, tempo e temperatura de autoclavação e condições de estocagem. Foram anotados, também, o tempo de incubação das placas, tamanho dos halos de inibição de crescimento, grau de turvação, inclinação da reta-padrão, diluições das soluções-teste, técnicas de diluição com a manutenção e calibração dos equipamentos. A confirmação da esterilidade, da capacidade promotora de crescimento e o ajuste de pH foram considerados fatores importantes para garantir a adequação do meio de cultura. O

estudo também evidenciou que a qualidade do meio interfere na sensibilidade, assim como na reprodutibilidade dos ensaios.

O meio de cultura considerado ideal deve ter cor padronizada, ser de fácil manipulação e não apresentar formação de espuma. De 1973 a 1976 foram testados 31 lotes de meio de cultura. Destes, apenas 15 foram aceitáveis, sendo que 12 não apresentaram sensibilidade dose-resposta e 7 com fatores de crescimento inaceitáveis. Falta de reprodutibilidade causou rejeição de 4 lotes, dentre os quais 2 tiveram como causa fatores físico-químicos, viscosidade, dificuldade de manuseio, pH impróprio e falta de contraste nas zonas de inibição de crescimento. Inadequacidade de 3 lotes a um ou mais antibióticos testados levou à reprovação dos mesmos. Desta forma, 8 tiveram falhas em várias categorias.

Em 1946, WELCH e colaboradores <sup>199</sup> relataram o estudo colaborativo para estabelecer o Padrão de trabalho da penicilina a partir de padrão primário, com a participação de vários laboratórios produtores, comandado pela FDA. Foi relatada a dificuldade na determinação da penicilina, por se apresentar como composto de combinação de várias substâncias, com diferentes atividades biológicas. A composição do meio de cultura foi relatada como principal fator de influência nos resultados, particularmente quando foi utilizada glicose, tanto na camada basal como na camada semeada. Apesar disto, os autores relataram o estudo referente à padronização de 3 sais de penicilina G através de 15 laboratórios. Assim, a penicilina G cristalina sódica foi adotada como padrão de trabalho com a potência de 1667 U/mg. Anos depois, BRADY e KATZ <sup>23</sup> evidenciaram que a quantidade de nutrientes presente no meio de cultura influencia no diâmetro do halo em razão inversamente proporcional.

### 2.2.2.2. Microrganismo-teste e preparação do inóculo

Os microrganismos são freqüentemente fornecidos na forma liofilizada, contidos em ampolas seladas, exigindo a recuperação em meio líquido rico, e diversas subculturas para retomar as características fisiológicas normais. Deverão, então, ser mantidos com repiques de manutenção, em freqüência geralmente mensal <sup>146</sup>.

Os microrganismos, no geral bactérias, utilizados para ensaio podem ser formadores de esporos ou não. No primeiro caso existe a vantagem da estabilidade das suspensões de esporos a 4 °C por tempos longos (meses a anos). Também há o fato de requererem menos tempo, pois evita a preparação da cultura no dia anterior, sendo utilizados de imediato <sup>146</sup>.

Ensaio com espécies não esporulantes como *Staphylococcus epidermidis* ou *Micrococcus luteus* exigem que as culturas sejam, no dia anterior ao do ensaio, transferidas para superfície inclinada de meio de cultura em tubos, e lavadas, após incubação, para fornecer a suspensão a ser empregada no teste. Esta suspensão pode ser mantida sob refrigeração por até seis semanas, dependendo da espécie do microrganismo <sup>146</sup>.

FOSTER e WOODRUFF <sup>72</sup> sugeriram a substituição do *Staphylococcus aureus* cepa H por *Bacillus subtilis*, uma vez que o primeiro, na presença de penicilina apresentava lise espontânea, ocasionando pouco contraste na zona de inibição de crescimento. Outra vantagem residia no fato de permitir a inoculação dos esporos na temperatura que evitasse a solidificação rápida do meio de cultura. Por sua vez, como envolve germinação de esporos, a distância de difusão do antibiótico era maior que no caso do *Staphylococcus aureus*, resultando também em halos maiores.

O inóculo microbiano deve ser padronizado antes do uso. Ao se iniciar a aplicação de uma metodologia, a padronização do inóculo, de modo a proporcionar seu emprego com segurança, deverá incluir um teste prévio, empregando distintas concentrações de inóculo e diferentes concentrações do antibiótico a ser ensaiado. Alíquotas da suspensão microbiana são adicionadas ao agar fundido, mantido a cerca de 50 °C, em volumes finais de 10 mL. Após homogeneização o agar é rapidamente vertido sobre as placas de Petri, as quais são colocadas para solidificar em uma superfície plana <sup>146</sup>.

GAVIN <sup>81</sup> avaliou os requisitos para o microrganismo ideal a ser empregado na dosagem de antibióticos. Dentre os fatores avaliados estiveram o tipo de resposta do microrganismo, o tipo de microrganismo empregado e as condições de cultura. O autor destacou a necessidade de sensibilidade do microrganismo e a especificidade da resposta em relação à substância avaliada. BOWMAN <sup>22</sup> relacionou os microrganismos empregados na avaliação de diversos antibióticos.

REILLY e SOBERS <sup>157</sup>, em 1952, estudaram a possibilidade do uso de agar simples para camada basal. Para isso empregou 15 mL de meio basal e após sua solidificação, 10 mL de meio nutriente inoculado com microrganismo adequado para cada antibiótico. O diâmetro das zonas de inibição produzido pela estreptomicina, ametofterina e antibiótico 1377, colocados nas placas através de discos de papel, foi medido e comparado. As zonas de inibição produzidas nas placas com agar simples mostraram-se mais claras e definidas, particularmente para ametofterina. O ácido pteroilglutâmico, um de seus constituintes é um antimetabólito competidor da ametofterina, interage com elementos do meio nutriente acarretando baixa difusão no meio basal, além da redução da atividade biológica, portanto

conduzindo a halos de inibição reduzidos. Um estudo paralelo mostrou aumento do tamanho dos halos de inibição de crescimento quando o volume de camada superficial foi reduzido à metade, o que se constitui em vantagem na utilização do agar simples; além disto, é mais econômico e aumenta a sensibilidade do ensaio em situações com interferência dos constituintes do meio sobre o efeito inibitório do antibiótico.

### **2.2.2.3. Reservatórios e volume dispensado de solução-teste**

ABRAHAM e colaboradores <sup>2</sup>, em 1930, estudaram dispositivos de transferência das soluções sobre a superfície do meio de cultura inoculado, trabalhando com cilindros de vidro ou porcelana Vítreo. O fundamento da difusão em meio de cultura sólido deu origem, posteriormente, ao designado método de Oxford. A metodologia recebeu críticas quanto à dispersão e incerteza da resposta <sup>72</sup>.

FLEMING <sup>67</sup>, em 1942, propôs melhoria metodológica, passando a dispensar as soluções-teste de padrão e amostra em sulcos no meio de cultura e inóculo na forma de estrias. Contornava-se, assim, a interferência de material particulado presente nas amostras, como no caso do sangue.

Outra evolução metodológica decorreu de estudos de FOSTER e WOODRUFF <sup>72</sup>, pois em vez de derramar a suspensão aquosa do microrganismo sobre o meio já solidificado, efetuava a inoculação do germe no gel ainda fluido para posterior transferência à placa de Petri.

Como curiosidade, pode-se citar que o fenômeno da difusão do antibiótico levou RAPER e colaboradores <sup>154</sup> a reportarem método de detecção de cepas de *Penicillium*



*notatum* produtoras de penicilina. A metodologia emprega forma de transferência peculiar, retirando pedaços de agar de colônias de *Penicillium* e colocando-os sobre placas semeadas com *Micrococcus pyogenes*, com observação de zonas de inibição ao redor dos mesmos.

Retomando ao mecanismo de dispensação do antibiótico para ensaios convencionais, simultaneamente VINCENT e VINCENT <sup>195</sup> e SHERWOOD e colaboradores <sup>162</sup> propuseram, no método de Oxford, a substituição dos pequenos cilindros por discos de papel de filtro. Estes eram saturados com solução de penicilina, como reservatório de antibiótico a ser difundido no meio inoculado, reduzindo o trabalho e tempo envolvidos no teste, além de facilitar a manipulação das placas. Os autores observaram que a zona de inibição de crescimento em volta dos discos foi mais consistente e mais sensível a variações da concentração da penicilina em relação ao método anterior. Vários outros trabalhos <sup>56 e 162</sup> indicaram resultados satisfatórios em testes com discos de papel, incluindo descrição do procedimento, cálculos e estudo dos fatores interferentes.

A determinação quantitativa da estreptomicina com o *Bacillus subtilis* como microrganismo-teste, descrita por LOO e colaboradores <sup>118</sup> em 1945, evidenciou vantagens da técnica com discos de papel em comparação com cilindros, além das citadas anteriormente. Permitiu a aplicação da técnica em amostras diluídas em solvente orgânico e a manipulação das placas sem precauções especiais. No entanto, os autores determinaram um ponto crítico para o uso dos discos de papel, que foi a necessidade de aplicação rápida e em quantidade constante das soluções-teste nos mesmos. Estudo de BEER e SHERWOOD <sup>15</sup> demonstrou que os discos de papel apresentam grande uniformidade de quantidades absorvidas de solução. Também foram descritas técnicas transferência através de alçadas da solução-teste <sup>162</sup> ou técnicas de embeber os discos estéreis nas soluções antes de serem

colocados nas placas<sup>56 e 195</sup>. PATRICK e colaboradores<sup>140</sup> compararam resultados obtidos no uso do método de diluição em tubos com o método de difusão em placas para teste de sensibilidade de antibióticos. Testes individuais e realizados em dias consecutivos evidenciaram reprodutibilidade na leitura do diâmetro das zonas de inibição de crescimento.

O método de cilindros em placas, proposto por ABRAHAM e colaboradores<sup>2</sup> e SCHIMIDT e MOYER<sup>161</sup>, forneceu resultados independentes do volume de solução, o que se constitui em vantagem no ensaio de grande quantidade de amostras. Contudo, fatores como a ausência de formação de zonas tão nítidas quanto as produzidas pelo disco de papel, além da ocasional deficiência de contato do cilindro com a superfície do agar e conseqüente formação de halos deficientes representaram desvantagem para a técnica de cilindros.

LOO e colaboradores<sup>118</sup> indicaram como ponto crítico da técnica de discos de papel a necessidade de distribuição de volume constante de 0,1 mL através de pipeta graduada, tomando o procedimento lento, trabalhoso e redundando em erros sistemáticos. Assim, DAVIS e McGUIRE<sup>50</sup> descreveram um dispositivo automático para enchimento e esvaziamento de pipetas, aumentando a velocidade das operações de ensaio de rotina, sendo que a média de distribuição das soluções-teste foi de 8 discos por minuto. Tendo em vista a demanda de tempo requerido para a distribuição dos cilindros nas posições pré-definidas das placas em relação ao procedimento geral, REEVES e SCHIMIDT<sup>155</sup>, em 1945, desenvolveram dispositivo para a dispensação de cilindros que tornou esta operação 4 vezes mais rápida em relação à técnica manual, possibilitando a colocação dos cilindros em posições exatamente iguais.

Dentre muitas publicações, SCHIMIDT e MOYER <sup>161</sup> e HAYES <sup>88</sup>, respectivamente, em 1944 e 1945, descreveram detalhadamente os procedimentos analíticos da técnica de cilindros em placas, relacionando os fatores que afetam o teste, quando do uso do dispositivo de REEVES e SCHIMIDT <sup>155</sup>. No trabalho de HAYES <sup>88</sup> destaque foi dado ao estudo da influência da espessura da camada de agar na definição e clareza dos halos de inibição de crescimento. SNELL e LEWIS <sup>167</sup> em 1959 alertaram quanto a cuidado na utilização de cilindros de aço inoxidável, indicados no método oficial da *Food and Drug Administration* (FDA). Cinco dos 7 antibióticos testados mostraram perda de potência resultante do contato das soluções-teste com cilindros de aço inoxidável. A determinação quantitativa da estreptomicina empregando papel de filtro fornecido por *Schleicher e Schuell*<sup>®</sup>, pela técnica de difusão em placas tendo o *Bacillus subtilis* como microrganismo-teste, foi discutido por LOO e colaboradores <sup>118</sup>.

KAVANAGH <sup>105</sup> sugeriu o enchimento dos cilindros em série crescente de concentrações. No entanto, este procedimento implica em difusão do antibiótico antes do início de incubação.

BEER e SHERWOOD <sup>15</sup> propuseram modificações no método de Oxford, empregando discos de papel de aproximadamente 1 cm de diâmetro como reservatórios para as soluções de antibióticos. Uma das vantagens da utilização de discos de papel é a facilidade na aplicação das soluções de antibióticos nas placas de Petri. Também foi relatado que discos de papel com o mesmo tamanho absorvem quantidades das soluções surpreendentemente uniformes.

Em 1988, RAGHEB <sup>150</sup> avaliou a influência do volume de solução por cilindro na determinação da potência de antibióticos pelo método de difusão. Foram avaliados os

tamanhos do halo de inibição de cilindros contendo 100, 200 e 300  $\mu\text{L}$  de solução comparativamente com cilindros com 200  $\mu\text{L}$  de solução padrão. Para 9 dos antibióticos avaliados obteve-se recuperação ótima quando foram empregados volumes iguais da solução padrão e amostra. No emprego de 300  $\mu\text{L}$  por cilindro, evidenciou uma tendência positiva de cerca de 50%. Observou-se também uma tendência negativa de cerca de 25% quando empregou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução no cilindro.

Em 2004, VITAL e colaboradores<sup>196</sup> compararam o emprego de discos de papel e cilindros de aço inoxidável na quantificação de 123 medicamentos contendo nistatina, eritromicina, gentamicina e neomicina. O estudo concluiu que, para os antibióticos avaliados, a análise da atividade antimicrobiana pela técnica dos discos de papel pode substituir a técnica dos cilindros de aço inoxidável.

#### **2.2.2.4. Pré-difusão e Pré-incubação**

Conceitos relevantes com relação à teoria de formação da zona de inibição do crescimento microbiano serão importantes para o entendimento de alguns dos fatores de interferência e serão descritos a seguir<sup>146 e 93</sup>:

- Zona limítrofe: é a zona na qual ainda ocorre a difusão do antibiótico, porém sem que este tenha concentração suficiente para gerar a inibição de crescimento do microrganismo.
- Concentração inicial  $m_0$ : é a concentração do antibiótico no reservatório.
- População de inóculo  $N_0$ : é a população microbiana no momento da inoculação.

- Concentração crítica  $m'$ : é a concentração do antibiótico na posição limítrofe entre crescimento e inibição, que ocorre em um tempo  $T_0$ .
- População crítica  $N'$ : é a população microbiana no tempo  $T_0$  (um maior crescimento desta população  $N'$  resultará em um excesso de microrganismo capaz de absorver completamente o antibiótico impedindo assim, uma maior difusão; entretanto, a difusão do antibiótico durante a fase *lag* do crescimento microbiano resulta em pequenos halos de inibição até mesmo quando um inóculo muito concentrado é utilizado).
- Tempo crítico  $T_0$ : é o período de crescimento do microrganismo até que seja alcançada a população crítica  $N'$ .
- População inibitória  $N''$ : população microbiana que é grande o suficiente para impedir completamente a formação de zonas de inibição de crescimento.

Basicamente, os parâmetros que afetam a formação das zonas de inibição do crescimento são a concentração crítica e a população crítica. Fatores que influenciam a difusão do antibiótico ou o tempo para se atingir a população crítica também afetam o tamanho do halo de inibição<sup>93</sup>.

No trabalho de GOYAN e colaboradores<sup>84</sup> foram citadas a utilização de microrganismos na fase logarítmica de crescimento devido a maior sensibilidade à penicilina. Para isto, foi sugerida a pré-incubação das placas semeadas por 3 horas e 2 horas, respectivamente, para *Staphylococcus aureus*<sup>84</sup> e *Bacillus subtilis* antes de colocar as soluções, seguida de reincubação das placas por igual tempo.

Sendo a velocidade de difusão da substância no agar determinante do tamanho da zona de inibição, GAVIN<sup>82</sup> considerou que somente após a difusão da substância testada,

antes da multiplicação microbiana, ocorre a formação do halo de inibição de crescimento. Assim, zonas de inibição maiores podem ser obtidas alterando a fase *lag* do microrganismo através da refrigeração das placas ou mantendo as placas a temperatura ambiente após a colocação das soluções-teste.

SCHIMIDT e MOVER <sup>161</sup>, utilizando 4 concentrações da penicilina, evidenciaram aumento no tamanho das zonas de inibição de crescimento quando as placas foram refrigeradas durante 1,5 a 7,5 horas. A redução da fase *lag* proporcionou zonas de inibição de crescimento menores. GAVIN <sup>82</sup> ressalta que placas refrigeradas para pré-difusão não devem ser colocadas diretamente na estufa, especialmente nos ensaios em que as placas não podem ser invertidas durante a incubação, conduzindo à condensação na tampa.

Em estudo realizado por YAMADA e colaboradores <sup>203</sup> sobre o tempo de difusão, o período de pré-difusão a 4 °C por 2 horas foi favorável, enquanto que por tempo superior produziu aumento na variação do tamanho da zona de inibição de crescimento. Caso contrário, com a redução do período de pré-difusão, ocorreu a diminuição dos halos de inibição de crescimento com formação de halos duplos.

#### **2.2.2.5. pH**

Estudos realizados demonstraram que o aumento na acidez do meio diminuía a atividade antibacteriana de substâncias básicas enquanto por outro lado, provocava aumento na atividade de substâncias ácidas. O pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas. Foi

recomendada a utilização de diluentes tampão com pH próximo àquele de crescimento ótimo do microrganismo, apesar de a difusão das substâncias variar com o pH <sup>146</sup>.

O efeito do pH do meio na atividade da estreptomicina e penicilina foi estudado por ABRAHAM e DUTHIE <sup>1</sup> através dos métodos de diluição seriada e cilindros em placas. Os autores demonstraram que o aumento na acidez do meio diminuía a atividade antibacteriana de substâncias básicas como a estreptomicina; por outro lado provocava aumento da atividade das substâncias ácidas como a penicilina. FOSTER e WOODRUFF <sup>72</sup> e FOSTER e WILKER <sup>71</sup> relataram que a penicilina foi 3 vezes mais ativa a pH 5,5 comparativamente a pH 7,0 quando ensaiada pelo método em placas, enquanto que sua atividade permaneceu inalterada turbidimetricamente.

Como o crescimento do microrganismo tem como exigência básica o pH da solução-teste, cujo valor da faixa adequada é favorável, também, para atividade e estabilidade das substâncias testadas. Assim, foi recomendada a utilização de solução-teste com pH próximo àquele de crescimento ótimo do microrganismo como condição ideal, embora o tamanho das zonas de inibição de crescimento variem com o pH. Exemplificando, o pH ótimo para a máxima atividade da estreptomicina contra o *Bacillus subtilis* é de cerca de 8,5. No entanto, é considerado elevado para o meio de cultura, sendo recomendado pH de  $7,9 \pm 0,1$  <sup>149</sup>. Este autor estabeleceu que a combinação de pH das soluções-teste e do meio de cultura deve ser definida empiricamente para cada caso.

Estudo realizado por YAMADA e colaboradores <sup>203</sup> investigou condições ótimas de ensaio, considerando o efeito do pH do meio de cultura e diluentes. Os ensaios de

penicilinas, cefalosporinas e derivados macrolídeos não sofreram influência do pH do diluente, embora marcadamente pelo meio de cultura.

#### **2.2.2.6. Espessura e uniformidade do agar**

GAVIN <sup>82</sup> estudou diferentes aspectos da difusão de substâncias no agar e as interferências físicas sobre o fenômeno. Assim, a espessura e uniformidade do agar para uma série de placas é fundamental, o que é conseguido através da seleção de placas com fundo plano, tamanho uniforme e do controle rigoroso do volume de agar transferido para cada uma. Recomendou, ainda, a secagem das placas com meio distribuído para evitar a formação de estrias. O autor destaca a influência da qualidade do agar e da sua origem, bem como a sua concentração sobre o resultado do ensaio. Este mesmo autor <sup>81</sup> publicou, em 1956, discussão envolvendo métodos microbiológicos para determinação de vitaminas, antibióticos em caldo de fermentação ou após a purificação, sendo que ênfase especial à utilização dos microrganismos e o meio de cultura adequados são relatados através de extensa revisão.

Segundo KAVANAGH <sup>105</sup>, a espessura do agar influenciou os resultados quando foi utilizado o meio em sistema de bicamada, provocando erro significativo pela alteração na concentração bacteriana em cada placa. O método FDA não corrige tais erros, que devem ser evitados através de técnica apurada.

BEER e colaboradores <sup>15</sup> demonstraram que o diâmetro dos halos de inibição é inversamente proporcional à espessura do agar e ao tamanho do inóculo. Os coeficientes angulares das curvas do logaritmo da dose *versus* diâmetro dos halos apresentaram



diferenças significativas para diferentes espessuras de agar. O mesmo ocorreu para diferentes tamanhos de inóculos.

Em 1988, MARQUES e colaboradores <sup>121</sup> avaliaram a influência do volume de meio de cultura na sensibilidade do ensaio de neomicina. Foram comparados o método oficial <sup>183</sup> e as alterações propostas por DENNIN e por STAHL e KRATZER. O estudo concluiu que o sistema de bicamada, empregando 10 mL de meio base e 5 mL de meio inoculado, obteve melhores resultados, considerando-se determinações no intervalo de 2 a 32 µg/mL de neomicina base. Segundo MARQUES e colaboradores <sup>121</sup>, embora a farmacopeia recomende inóculo de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) numa proporção de 0,4%, não foi possível reproduzir halos nessa condição. Melhores resultados foram obtidos empregando-se uma proporção de 1% de inóculo.

Em 1979, WOOLFREY e colaboradores <sup>201</sup> estudaram a influência da concavidade das placas de Petri de 5 fornecedores, apresentando deformidades entre 0,5 e 3,0 mm. Evidenciou-se que a diferença na espessura de agar, causada pelas deformidades nas placas de Petri, alteram os diâmetros dos halos de inibição de forma inversamente proporcional.

BRADY e KATZ <sup>23</sup> avaliaram diversos fatores de influência como composição do meio de cultura, temperatura e espessura do agar. Dentre os fatores avaliados a espessura da camada de agar foi o que mais apresentou maior importância. O estudo evidenciou que quanto mais fina a camada de agar, menor é a influência do volume de solução adicionado aos cilindros.

### **2.2.2.7. Tempo e temperatura de incubação**

Sabe-se que a temperatura afeta diretamente o crescimento microbiano, sendo que cada espécie microbiana possui uma temperatura ótima de crescimento. Crescimentos rápidos levam a formação de halos de inibição menores e por isso, uma uniformidade na temperatura de incubação é de grande importância experimental <sup>146 e 93</sup>.

HEATLEY <sup>90</sup> verificou que o *Bacillus subtilis* mostra resultados satisfatórios em 3,5 horas para temperatura de incubação de 37 °C ou em 18 horas de incubação entre 25 °C a 28 °C.

Com relação à influência da variação térmica KAVANAGH <sup>105</sup> constatou que diferença da ordem de 0,1 °C dentro de placa grande causa erros, o que foi minimizado com ensaio de gradiente linear ou com delineamento tipo quadrado latino. O abaixamento na temperatura de incubação causou o aumento do tamanho das zonas de inibição.

BRADY e KATZ <sup>23</sup> estudaram os fatores de influência na otimização do método de dosagem microbiológica por difusão. Os resultados demonstraram que o diâmetro do halo é inversamente proporcional a temperatura de incubação.

### **2.2.2.8. Distribuição do inóculo nas placas de Petri**

Outra variável estudada por GAVIN <sup>82</sup> foi o procedimento relacionado com a distribuição do inóculo nas placas de Petri. Pelo espalhamento da suspensão microbiana sobre o agar, seguida da remoção do excesso, ou pela inoculação do agar em *bulk* assegurando uniformidade da carga microbiana ou pela colocação do meio inoculado sobre

uma camada de agar base, concluiu que a última técnica proporcionou zonas de inibição mais nítidas, porém envolveu maior dispêndio de tempo. Por sua vez, nesta execução, a temperatura recomendada foi de cerca de 50 °C.

Fatores como ordem de distribuição das soluções-teste nos cilindros, uniformidade da temperatura de incubação e espessura do agar afetam diretamente o tempo de geração do microrganismo-teste. Assim, mudança de 10 vezes na quantidade do inóculo pode causar diferença de 3 mm no tamanho do halo, sendo que placas com inóculos menores apresentam maiores zonas de inibição de crescimento. KAVANAGH <sup>105</sup> sugeriu procedimento com finalidade de reduzir os erros, incluindo a incubação das placas em uma única camada em estufa, sem gradiente de temperatura, preparação de todas as placas usadas em um mesmo teste a partir do mesmo frasco com meio inoculado, espalhar o meio nas placas apoiadas em superfície nivelada e colocar as soluções nos reservatórios da placa em tempo inferior a 1 minuto.

#### **2.2.2.9. Formação de halos duplos**

Um dos aspectos problemáticos relacionado ao contraste entre halo de inibição de crescimento e o restante do meio onde existe a massa celular resultante da incubação é o aparecimento de halos duplos devido à diferentes fatores <sup>2, 82, 105 e 114</sup>. ABRAHAM e colaboradores <sup>2</sup> relataram esse fenômeno ao redor dos cilindros contendo penicilina após período de incubação, sem no entanto, esclarecer a origem. Mais tarde, LEES e TOOTILL <sup>114</sup> verificaram que os halos duplos podiam ser causados por cepas mistas, respondendo

diferentemente ao antibiótico testado. Halos duplos apareceram, também ao redor de reservatórios pequenos da solução-teste, que HEWITT<sup>105</sup> esclareceu através da teoria de difusão. Assim, devido ao restrito volume da solução-teste no reservatório, a concentração do antibiótico cai rapidamente ao valor abaixo do original não ocorrendo gradiente, o que possibilita a formação de halos duplos. Entre outros casos, a influência da anaerobiose no meio de cultura em profundidade provoca o aparecimento de halo duplo uma vez que na superfície a distância de difusão revelada pela população microbiana é maior que a profundidade<sup>82</sup>. Em todos os casos, o aparecimento do halo duplo não invalida o ensaio, desde que a leitura seja padronizada para a medida de um dos halos formados e este fenômeno seja comum para padrão e amostra.

#### **2.2.2.10. Dispositivos para leitura da resposta biológica**

Ao longo da evolução metodológica, um aspecto que envolveu vários estudos diz respeito ao recurso de leitura da resposta biológica. Atualmente, são disponíveis diversos dispositivos que permitem a medida precisa do halo de inibição do crescimento microbiano<sup>146</sup>.

WELCH e colaboradores<sup>199</sup> relacionaram os dispositivos para leitura dos halos de inibição de crescimento utilizados para ensaios nos laboratórios da FDA, incluindo os contadores de colônias *Buck*<sup>®</sup><sup>199</sup> e *Quebec*<sup>®</sup>, a tabela de contagem foi substituída por escala milimetrada<sup>51</sup>. Em outros casos havia ampliação, como no caso de aparelho denominado *Peoria*<sup>®</sup>, *Eli Lilly Antibiotic Zone Reader*<sup>®</sup> e *Balopticon*<sup>®</sup>.

Em 1949, DAVIS e colaboradores <sup>52</sup> descreveram a construção de novo aparelho para leitura rápida e exata dos halos. O aparelho foi projetado com sistema óptico, através do qual a imagem ampliada e projetada mostra contraste claramente definido entre zonas de crescimento e inibição, como a lente de vidro é provida de linha de referência lateral possibilita relação com uma escala precisa de medida dos halos. Paralelamente, um sistema mecânico provido de guia para encaixe das placas de Petri com rotação manual das mesmas permite o ajuste da imagem do halo em posição de leitura. O modelo, comercialmente disponível, foi inicialmente produzido por *Fisher Scientific Co* de Pitsburg. Experimentos realizados com a penicilina e estreptomicina, em 180 placas, com 4 zonas cada, quando executada por 2 operadores, resultaram em 600 a 720 medidas por hora. Os autores <sup>51</sup> desenvolveram tabelas, preparadas para possibilitar a conversão da medida do diâmetro em potência de antibióticos. As tabelas foram construídas com 2 concentrações da amostra e 2 do padrão, sendo que a diferença da média dos diâmetros do padrão foi subtraída da média dos diâmetros da amostra, tendo mostrado linearidade em relação ao logaritmo da concentração.

#### **2.2.2.11. Outros fatores de interferência**

Os procedimentos envolvendo ensaios microbiológicos de antibióticos e vitaminas foram detalhadamente discutidos e descritos por KAVANAGH <sup>107</sup>, com objetivo de assegurar exatidão dos testes. O autor considerou os procedimentos turbidimétrico e de difusão em agar, pela técnica semi-automática ou manual, além de equipamentos, materiais

e operações que podem levar a erros. Destacou o trabalho humano como fator limitante, salientando a necessidade de seleção e treinamento cuidadoso dos analistas.

BEER e SHERWOOD<sup>15</sup> também relataram que a uniformidade do volume absorvido pelos discos de papel, a espessura do agar em que o antibiótico difunde, a uniformidade do inóculo e a linearidade da curva do logaritmo da dose *versus* diâmetro dos halos são fatores que contribuem na precisão do doseamento.

Outra questão considerada por GAVIN<sup>82</sup> diz respeito à natureza inibitória ou estimulante sobre o microrganismo-teste, além de hidrossolubilidade e difusibilidade pelo agar. Por sua vez, segundo o mesmo pesquisador, controles rígidos das condições analíticas contribuem para com a precisão dos ensaios, isto é, a perícia do operador, modificação individual do procedimento analítico e o número de discos, cilindros ou reservatórios utilizado para cada diluição. Recomendou, ainda, a utilização de placas grandes, com várias réplicas para cada diluição em dias consecutivos.

Estudando os fatores que interferem nos resultados analíticos, ANDERSON<sup>4</sup> estudou o método de difusão de antibióticos, utilizando bicamada de meio de cultura para teste de sensibilidade. A metodologia apresentou-se favorável pelo contato direto do disco impregnado com solução do antibiótico e o meio inoculado, proporcionando zonas de inibição claras e bem definidas e resultando em leitura exata do diâmetro da zona de inibição. Consequentemente, houve maior exatidão da potência. Nestes meios não houve interferência de fatores nutricionais sobre a difusão livre do antibiótico.

KONDO e ROSTAMIBASHMAN<sup>112</sup> relacionaram os fatores que alteram o contraste das zonas dos halos de inibição de crescimento, através da triagem dos aminoglicosídeos. Assim, foram considerados a sensibilidade do microrganismo-teste para o antibiótico, a

variação dos meios de cultura, o pH do meio, o volume ou espessura do meio, a concentração do inóculo, o volume das soluções-teste contido nos reservatórios, o tempo e temperatura de incubação. Em relação ao meio de cultura os autores <sup>112</sup> indicaram que em pH 7,9 os microrganismos apresentavam maior atividade. Diferentes recursos de aplicação da solução-teste, como discos de papel de filtro, reservatórios em forma de copos e de *Swab*, apresentaram resultados semelhantes na distância de difusão. Meio de cultura em espessura menor leva a maiores halos de inibição de crescimento. Por sua vez, de forma antagônica, aminoglicosídeos apresentam como característica a baixa difusibilidade <sup>112</sup>; para se valorizar o aumento de sensibilidade provocado pelo primeiro efeito, recurso adicional é portanto o da redução de carga microbiana, que também conduz a maiores halos de inibição de crescimento <sup>93</sup>.

### **2.2.3. Misturas de antibióticos**

Em 1954, FRIEDMAN e KIRSHBAUM <sup>77</sup> relataram metodologia para ensaio de mistura de antibióticos. O primeiro trabalho descreveu metodologia para ensaio de neomicina na presença de dihidroestreptomicina, utilizando o *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* resistente a este último. No segundo trabalho, o procedimento para dosagem de bacitracina e penicilina na presença de dihidroestreptomicina foram apresentados. Para isto, cepas de *Micrococcus flavus* foram preparadas para adquirir resistência à dihidroestreptomicina quando do ensaio da bacitracina, e *Sarcina lutea*, para penicilina.

BALANDRANO e VALLE <sup>13</sup> e THOMAS e THOMPSON <sup>175</sup> desenvolveram, também, métodos para o ensaio de preparações farmacêuticas de antibióticos em mistura. O

primeiro grupo desenvolveu técnica para neomicina e espiramicina através da indução de resistência ao *Staphylococcus aureus* a cada um dos antibióticos. THOMAS e TROMPSON<sup>175</sup> estudaram problemas referentes à determinação da potência de cada um dos antibióticos composto por neomicina e polimixina B. Os autores consideraram, a princípio, inadequada a utilização de padrões em mistura por não ser recomendada pelas autoridades oficiais, bem como por envolver pesquisa dispendiosa. No ensaio da polimixina B, a neomicina causa interferência no efeito de inibição de crescimento do microrganismo-teste que deve ser eliminada. Foi proposta a utilização de um agente removedor do antibiótico interferente formado por resinas tratadas, ou remoção do aminoglicosídeo através de antagonista como laurilsulfato, além da alteração das condições de ensaio pela diminuição da atividade do antibiótico e emprego de microrganismo-teste alternativo. A remoção da neomicina não foi satisfatória, no entanto, os resultados levaram a informações sobre as causas, tipo e nível de interferência da neomicina na determinação da polimixina B. Assim, a utilização de mistura de padrões na determinação da atividade em amostras contendo mais de um antibiótico continuou sendo a técnica de escolha.

VERONESE e MARCA<sup>194</sup> descreveram procedimento utilizando a resina de troca iônica para a separação do derivado nitrofurânico da mistura de polimixina B e neomicina, associadas em uma preparação farmacêutica para uso tópico. O derivado nitrofurânico interfere na dosagem da polimixina B e neomicina, sendo empregada para sua remoção uma resina de troca iônica, a *Amberlite IRC 50*. Após a determinação quantitativa total foi feita o cálculo do teor para cada componente da formulação.

A dosagem de associações de dois ou mais antibióticos foi estudada por CANELA e colaboradores<sup>38</sup> em 1971, devido à limitação metodológica em decorrência de substâncias



interferentes. Tabela construída por ARRET e colaboradores <sup>5</sup> indica metodologias para determinação da potência de antibióticos em mistura. Quando existe interferência entre os antibióticos de uma associação foram recomendados diferentes recursos para a análise de cada substância, ou seja: separação dos antibióticos por solventes seletivos, inativação de um dos componentes por métodos físico, químico ou enzimático, utilização de germe resistente a um dos antibióticos e sensível a outro, compensação da falta de um dos antibiótico através da adição de quantidade equivalente do outro.

#### **2.2.4. Métodos alternativos / automatizados / rápidos**

SABATH e colaboradores <sup>160</sup> propuseram metodologia de difusão levemente modificada para testar amostras de soro, uma vez que exige reduzido volume do material-teste para o ensaio, sendo da ordem de 0,08 mL. Os ensaios de gentamicina, canamicina, estreptomicina, neomicina e vancomicina foram facilmente realizados mesmo na presença de penicilinas e cefalosporinas, utilizando *Bacillus subtilis* como microrganismo-teste. O método foi baseado na inativação química da penicilina e cefalosporina com uma J3-lactamase zinco dependente de amplo espectro, denominada de J3-lactamase TI. O erro médio foi de cerca de 11% e os resultados foram obtidos em 1,5 a 3,5 horas com temperatura de incubação de 37 °C. O método mostrou ser rápido, conveniente, de baixo custo e exato.

KABAY <sup>102</sup> em 1971 propôs um método de ensaio rápido, tendo sido testados 14 antibióticos com o mesmo. As placas com *Bacillus stearothermophilus* e cilindros foram

incubadas por 4 horas a 65 °C; os halos foram facilmente medidos a olho nu. O autor comparou este novo método com o convencional recomendado pela *Code of Federal Regulation* (CFR) <sup>43 e 44</sup>, tendo sido detectada diferença na precisão entre os dois.

LIGHTBOWN e colaboradores <sup>117</sup> descreveram equipamento construído para ensaios automáticos com a técnica de difusão mediante furo no gel. Foram efetuados com os mesmos ensaios de rotina no período de 3 a 4 anos para vários antibióticos, evidenciando ausência de falhas operacionais. No entanto, erros sistemáticos não puderam ser eliminados a nível insignificante. Uma variação de 0,05 mm no tamanho dos orifícios de deposição da solução amostra produziu erro aproximado de 2% que, quando convertido em potência, transformou-se em 3%. A liberação de volumes da solução-teste nas placas através de pipetas automáticas causou coeficiente de variação de 1 a 4%. Limites de erro de aproximadamente 2% podem ser obtidos com ensaio através de 6 placas de Petri.

Por considerar o método Oxford e suas modificações muito trabalhosos e demorados, especialmente para laboratórios com recursos precários, ASHESHOV e STRELITZ <sup>6</sup>, em 1945, propuseram técnica de difusão em tubos de ensaio com meio de cultura contendo pouca quantidade de agar, previamente inoculado com *Staphylococcus* ou *Escherichia coli*. Após solidificação na posição vertical foram depositadas soluções do antibiótico. A atividade foi calculada pela comparação da profundidade de inibição de crescimento, permitindo estabelecer reta padrão similar à conseguida por ABRAHAM e colaboradores <sup>2</sup>. Posteriormente, em 1947, dois procedimentos foram descritos para a técnica de difusão unidimensional.

Em 1949, MITCHISON e SPICER <sup>130</sup> descreveram método de dosagem de estreptomicina por difusão em tubos; constataram que a anaerobiose não interfere na atuação da concentração mínima deste antibiótico para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. COOPER e GILLESPIE <sup>46</sup> estudaram os efeitos da temperatura no crescimento e inibição, e COOPER e LINTON <sup>47</sup> compararam resultados de ensaios com tubos e placas de Petri.

Buscando melhorias na metodologia, vários corantes foram testados para revelação dos halos de inibição de crescimento. A técnica de revelação física por impregnação das placas com prata permitiu ensaio rápido, acrescentando apenas 15 minutos após incubação, sendo os resultados concordantes com método padrão de incubação prolongada <sup>84</sup>. DUFRENOY <sup>55</sup> publicou em 1947 a revisão dos métodos de difusão e suas aplicações na dosagem de antibióticos pelo método convencional de incubação de 16 horas, bem como dos rápidos, desenvolvidos até então. Além dos trabalhos mencionados anteriormente, o autor relatou a utilização de reveladores de crescimento bacteriano através de indicadores de oxi-redução, incluindo o índigo cannim, tetróxido de ósmio, ferrocianetos, verde Janus, resazurina e cloreto de trifeniltetrazólio. Um estudo estatístico de dados obtidos a partir de 100 ensaios, efetuados em 3 dias consecutivos, empregando a técnica de 5 pontos, permitiu que uma função quadrática fosse estabelecida entre o logaritmo da concentração e o diâmetro do halo, evidenciando uma relação de linearidade entre o logaritmo da dose e o logaritmo do diâmetro.

Em 1945, ASHESHOV e STRELITZ <sup>6</sup> propuseram um método simplificado para a análise de penicilina. Este método consistia no emprego de tubos com meio de cultura

sólido inoculado, sobre os quais se adicionava as soluções padrão e amostra. Após incubação, media-se a altura da inibição do crescimento microbiano.

Métodos microbiológicos inicialmente desenvolvidos para determinação de antibióticos, sofreram alterações no sentido de melhorar o aspecto técnico-prático, dirigido principalmente no sentido de obter resultados rápidos, mantendo os requisitos envolvidos com precisão e exatidão.

Diferentes princípios foram relacionados por FOSTER e WOODRUFF<sup>73</sup> para medida de atividade da penicilina, entre os quais, redução do azul de metileno, observação microscópica da cessão da motilidade da bactéria, observação microscópica de inibição de crescimento bacteriano e titulação do ácido formado por bactérias lácticas.

Culturas produtoras de estreptomicina e terramicina foram estudadas por HARRIS e RUGER<sup>86</sup>, em 1953, através do teste empregando *plug*, que se consistiu de pedaço de meio de cultura removido do local correspondente ao repique de actinomicetos, após devida incubação. Esses pedaços, colocados na superfície do meio de cultura inoculado com o microrganismo-teste, acusam zonas de inibição de crescimento em função da difusão do antibiótico a partir do *plug*.

Método rápido foi desenvolvido por FAINE e KNIGHT<sup>59</sup>, em 1968, baseado na medida do pH em meio contendo grande carga microbiana. Neste caso, a inibição de crescimento pelo antibiótico reflete proporcionalmente na mudança de pH, cujo dado é correlacionado com a concentração do antibiótico. O período de incubação dos tubos variou de 40 a 90 minutos. Dois métodos foram estabelecidos, ambos acoplados a sistema de processador de dados automático. O primeiro envolveu a medida do pH após 90 minutos de incubação e no outro a medida de pH foi realizada de maneira contínua. O microrganismo

de escolha foi a *Klebsiella aerogenes*, cujo crescimento foi propiciado em meio contendo lactose para induzir atividade enzimática e reduzir a fase *lag* na fermentação durante o teste. Este método proporcionou economia de mão de obra, e de tempo no procedimento analítico. O método foi modificado por WARDELL e colaboradores <sup>198</sup>, em 1971, para abranger maior número de antibióticos. O microrganismo adequado foi *Staphylococcus aureus* ATCC 6571, que produziu queda do pH em 2 unidades rapidamente, mostrando alta sensibilidade aos antibióticos testados. A queda no valor do pH foi devido à fermentação, uma vez que a multiplicação, em paralelo, do microrganismo não ocorre. Assim, quando se adicionou nutrientes ao meio de cultura não houve diminuição no valor de pH. Resultados satisfatórios foram obtidos para o ensaio de benzil-penicilina, ampicilina, cloxacilina, meticilina, carbenicilina, cefaloridina, cefalotina, estreptomicina, gentamicina, frameticina, oxitetraciclina, rifampicina, rifamida e cloranfenicol, com tempo de incubação entre 2 e 4 horas.

NOONE e colaboradores <sup>137</sup> descreveram método rápido similar, utilizando o *Proteus* sp., sensível à gentamicina e canamicina. Estes antibióticos interferem sobre a urease e conseqüentemente sobre a produção de amônia havendo; portanto, mudança no valor de pH. O método tem como objetivo diminuir erro atribuído a valores variáveis de pH e capacidade tamponante do soro do paciente. Sua exatidão foi comparável aos de difusão e de turbidimetria. Assim, a curva padrão relacionando a concentração e valor de pH permite obter a potência da amostra pela interpolação do respectivo dado experimental. Resultados exatos foram conseguidos com faixa de concentração plasmática resultante da dose terapêutica da gentamicina, necessitando somente 3,0 mL do soro. No período de incubação de apenas 2 horas, a interferência de fatores atribuídos à contaminação bacteriana foi

desprezível. O resultado foi obtido em 3 horas, não sendo influenciado pela penicilina ou cefalosporina e tendo a vantagem sobre métodos, como o potenciométrico, por determinar a atividade dos aminoglicosídeos na faixa de pH alcalino. Muitas das atividades metabólicas do microrganismo levam a alteração do valor de pH, sendo associada à solução tampão, causando determinada modificação na condutividade do meio de cultura. Os autores consideraram como principal fonte dessa alteração os componentes da solução tampão. Por isso, OWENS e colaboradores <sup>139</sup> realizaram estudo para determinar os critérios para a seleção apropriada dos componentes da solução tampão no sentido de maximizar a mudança na condutividade associada ao crescimento microbiano, cuja observação do ponto final do teste está associada à mudança de pH.

Método potenciométrico, estudado por SIMPSON e KOBOS <sup>165</sup> para determinação microbiológica de antibióticos, considera a alteração da atividade metabólica do microrganismo em presença do antibiótico, cuja medida pode ser efetuada num tempo bem inferior àquele para estabelecimento do contraste entre crescimento e inibição no meio sólido. Baseia-se na inibição da produção de dióxido de carbono, por exemplo, pela suspensão de *Escherichia coli*. A medida deste metabólito pode ser efetuada com um sensor de gás após 2 horas de incubação.

SIMPSON e KOBOS <sup>164</sup> descreveram o ensaio microbiológico de antibióticos através da potenciometria com sensores do gás amônia. O método foi baseado no efeito inibitório do antibiótico sobre a produção de amônia pela suspensão de *Escherichia coli* em solução nutriente. Quando comparado ao método respirométrico mostrou ser mais sensível.

NAVEH e colaboradores <sup>135</sup> descreveram o ensaio de bioluminescência. Um método sensível, rápido e simples, aplicável para antibióticos inibidores de síntese protéica. A

capacidade do antibiótico em inibir a síntese das enzimas envolvidas no processo de luminescência é determinada utilizando-se variante escura de uma bactéria luminosa que promove rápida indução do sistema luminescente, com certos agentes DNA-intercaladores. A concentração mínima de antibiótico detectável no teste de bioluminescência, após 45 a 60 minutos de incubação, foi de 0,1 µg/mL para estreptomicina, gentamicina, canamicina, lincomicina e cloranfenicol e 0,3 µg/mL para neomicina, clindamicina e espectinomicina. A alta sensibilidade deste bioensaio pode ser atribuída a maior susceptibilidade das proteínas recentemente sintetizadas sob a ação inibitória de diferentes antibióticos.

MYNHEER e colaboradores <sup>131</sup>, buscando superar desvantagens quanto à demora e custo envolvidos nos ensaios convencionais, propuseram método turbidimétrico com placas para microtitulação. Estas placa possuem 96 orifícios com tampas, onde meio de cultura inoculado com o microrganismo-teste e as soluções-teste em concentrações apropriadas são distribuídas aleatoriamente, sendo após inseridas em sacos plásticos hermeticamente fechados e incubadas em estufa a 37 °C por período de 4 a 6 horas. Este método apresenta vantagem de leitura em cerca de 1 minuto, e pode ser facilmente automatizado.

Método de diluição automatizado foi descrito por PLATT e colaboradores <sup>149</sup> empregando o aparelho Autoanalyzer para realizar todas as funções do ensaio turbidimétrico, exceto a pesagem e dissolução da amostra. O método emprega o princípio de diluição contínua para a solução-teste a nível de ensaio e a medida da concentração do antibiótico foi através do tempo necessário para diluição a nível de crescimento constante.

HEWITT <sup>93</sup> descreveu técnica da bioautografia para ensaio de antibióticos e vitaminas em mistura. Esta envolve o princípio da difusão aliado à separação dos componentes da

mistura através de cromatografia em papel. O procedimento inicia-se com a aplicação de soluções da amostra e padrão sobre papel cromatográfico. O cromatograma, desenvolvido em sistema de solvente apropriado, e após a secagem, aplicado sobre meio de cultura inoculado, contido em placas grandes. Nesta etapa o antibiótico separado no cromatograma se difunde no agar e o papel é removido, prosseguindo a metodologia conforme técnica de difusão convencional.

Outra inovação é o método da luciferase, descrito por HUGO e RUSSEL<sup>95</sup> para determinação quantitativa de antibióticos, cujo princípio se baseia na determinação de pequenas quantidades de ATP em cultura de bactéria. O nível de produção do ATP é reduzido por ação inibitória de antibióticos aminoglicosídicos. Neste método, as soluções do padrão e amostra são introduzidas em tubos contendo meio de cultura inoculado e, após incubação por cerca de 90 minutos, o ATP intracelular é medido em luminômetro.

Diferindo das metodologias descritas, aquele envolvendo a utilização de células vegetais foi descrito por MEYER e colaboradores<sup>129</sup> para a determinação da atividade do antibiótico. A observação do ponto final do teste está relacionada com a inibição da função orgânica de determinadas algas. No caso da *Chlamydomonas angulosa* ocorre a inibição da motilidade e da *Spirogyra quimina* mostra inibição da plasmólise, que são observados como ponto final. O autor considerou Também a utilização da raiz da beterraba, *Beta vulgaris rubra*, cuja presença do antibiótico provoca a liberação do pigmento vermelho de antocianina. A vantagem do método consiste no emprego de padrão-biológico com sensibilidade uniforme aos antibióticos e ausência de risco de infecção por não utilizar bactérias patogênicas.



YAMAMOTO e PINTO <sup>205</sup> propuseram um método rápido para avaliação de neomicina, empregando cloreto de trifeniltetrazólio. O princípio do método baseia-se na redução do corante para formazano, permitindo revelação das zonas de inibição de crescimento em 7 horas. Pelo ensaio de algumas especialidade farmacêuticas, tanto pelo método oficial <sup>184</sup> como pelo alternativo, ficou comprovada a aplicabilidade do recurso. Não foi evidenciada diferença significativa entre as curvas dose-resposta obtidas pelos dois métodos.

STEPPE e colaboradores <sup>172</sup> propuseram metodologia empregando técnica de cromatografia micelar eletrocinética para avaliação de cefalexina em suspensão oral. O método foi comparado com os métodos microbiológico por difusão em placas e de cromatografia líquida. Os autores destacaram vantagens do método de cromatografia micelar eletrocinética em relação a simplicidade do procedimento, o baixo custo envolvido e a capacidade do método de avaliar diferentes grupos farmacêuticos em amostras complexas.

## **2.3. Delineamentos experimentais**

### **2.3.1. Tipos de delineamentos**

As potências de amostras desconhecidas podem ser determinadas pela medição da resposta de uma diluição apropriada e leitura contra uma curva padrão <sup>93</sup>.

Devido a muitos fatores externos que podem afetar a resposta, as variações inter-dia fazem necessário que cada teste seja uma comparação direta com um padrão de referência

sob as mesmas condições <sup>146 e 93</sup>. KNUDSEN <sup>110</sup> destacou a necessidade de um planejamento experimental adequado e do emprego de ferramentas estatísticas para a avaliação de ensaios biológicos.

Mesmo que seja perfeitamente válido comparar as respostas das amostras com uma linha de resposta padrão ao mesmo tempo, é muitas vezes preferível usar um delineamento experimental alternativo que forneça: (1) melhores resultados para a mesma quantidade de esforços experimentais e (2) alguma indicação da validade do teste <sup>146 e 93</sup>.

Muitos delineamentos são disponíveis, dos quais apenas um deve ser escolhido, levando em consideração: (1) a natureza das amostras, (2) o número de amostras e (3) a confiabilidade requerida para a resposta <sup>146 e 93</sup>. As características especiais da relação linear entre logaritmo da dose e resposta são <sup>146</sup>:

- A linha de resposta de qualquer outra substância qualitativamente idêntica deve ser paralela à do padrão, de onde se segue que a inclinação deve ser medida não somente do padrão, mas também da amostra.
- É essencial ter pelo menos dois níveis de dose diferentes, para estimar a inclinação da linha de resposta. (Contrastando com respostas lineares aritméticas, em que uma observação e o ponto zero de origem são o suficiente).
- Caso as linhas de resposta da amostra e do padrão não sejam paralelas (descontando variações mínimas devidas a erros experimentais), as potências das soluções de teste demonstrariam ser idênticas no ponto de intersecção. Tal teste deve ser invalidado, com potência estimada da amostra sendo maior que a do padrão acima da intersecção e menor abaixo dela, ou vice versa.

Em 1974, KAVANAGH <sup>106</sup> estudou a influência do tempo de pré-difusão, da temperatura de incubação, da espessura da camada de agar e de fatores biológicos em quatro tipos de ensaios: 1) ensaio com interpolação em curva padrão sem correção, 2) ensaio com interpolação em curva padrão com correção descrita pelo FDA, 3) ensaio balanceado ou simétrico e 4) ensaio em placas grandes. O ensaio por interpolação em curva padrão foi o que apresentou maior susceptibilidade aos fatores estudados, enquanto que o ensaio balanceado foi o menos influenciado pelos mesmos fatores. Os resultados demonstraram que os erros podem ser ainda maiores no ensaio por interpolação em curva padrão quando não se faz a correção descrita pelo FDA. Constatou que 80 a 90 % dos efeitos de variação nos resultados poderiam ser removidos com a aplicação da correção segundo FDA para ensaios de dose única. O ensaio fatorial 2 x 2 apresentou menor sensibilidade a variações dos parâmetros em relação ao de dose única, por ter em cada placa o ensaio completo que pode tecnicamente ser efetuado com rapidez. Ensaios em placas grandes foram sensíveis à variação de tempo de pré-difusão, porém não a outros parâmetros.

FOGLESONG <sup>70</sup> estudou as causas e a grandeza do erro nos ensaios, e estabeleceu critérios para evitá-los. Considerou que a correção dos dados analíticos conforme regulamentos do FDA difere entre amostras e padrão, possibilitando o surgimento de erro. O erro de mais de 24%, resultante dos ensaios, foi evitado corrigindo-se tanto a resposta do padrão como da amostra.

### 2.3.1.1. Ensaio balanceado ou fatorial (2 x 2)

Em 1945, KNUDSEN e RANDALL <sup>111</sup> descreveram um delineamento simples e eficiente para o ensaio de penicilina, empregando duas doses do padrão e duas da amostra, com razão idêntica entre as doses nas duas preparações. É conhecido como ensaio 2 x 2, em que cada placa de Petri inclui todas as quatro doses, de forma que o número de réplicas é igual ao número de placas empregado. O ensaio também é conhecido como simétrico ou balanceado.

SHERWOOD e colaboradores <sup>162</sup> descreveram tal metodologia para análise da penicilina, através de réplicas de 4 placas, sendo que em cada uma foram depositados 4 discos com 2 soluções do padrão e outras 2 da amostra, correspondentes a 2 concentrações. O trabalho apresenta, adicionalmente, equações que permitem cálculo da potência do antibiótico. Procedimento semelhante foi utilizado por KNUDSEN <sup>109</sup>, que empregou métodos estatísticos para determinar a potência do antibiótico e o erro padrão do ensaio. O uso de delineamentos experimentais adequados contribui no aumento da precisão do método, além de fornecer informações quanto a validade dos ensaios. As ferramentas estatísticas permitem avaliar os resultados em termos de potência frente a um padrão de referência e de erro experimental. BLISS <sup>19 e 20</sup> descreveu procedimento semelhante para ensaio da penicilina, incluindo exemplo para cálculo da potência, determinação da inclinação da curva dose-resposta com precisão do ensaio e validação do ensaio através do teste-t para diferenças entre os ensaios realizados em paralelo, indicando o paralelismo das Curvas dose-resposta. Na publicação de 1946 <sup>19</sup> o autor incluiu 2 gráficos na determinação

da potência da amostra de penicilina e o erro padrão, relacionando o resultado de simples cálculo de soma e subtração dos valores de halos de inibição de crescimento.

Em 1956, MIYAMURA <sup>123</sup> apresentou um método para cálculo da potência de antibióticos através do delineamento 2 x 2. O método empregava um conjunto de escalas que permitia a determinar da potência através da interpolação dos valores calculados.

### **2.3.1.2. Ensaio balanceado ou fatorial (3 x 3)**

Em 1978, TARCZA e GARTH <sup>174</sup> apresentaram os procedimentos para determinação da potência através do emprego de três doses de padrão e três de amostra, com razões idênticas, numa mesma placa. O trabalho também considerava a avaliação da validade do ensaio, assim como a determinação de um intervalo de confiança para a potência calculada.

PITTON <sup>147</sup>, em 1966, estabeleceu bases aceitáveis para as dosagens microbiológicas de antibióticos, tendo submetido os dados experimentais a estudo estatístico completo, em que a validade do ensaio pode ser determinada com a análise da linearidade da resposta, curvatura das retas de regressão e paralelismo das retas-padrão. O autor estabeleceu estatisticamente as doses limites recomendadas para o ensaio de 13 antibióticos, bem como a análise da variabilidade dos resultados do doseamento entre diferentes analistas.

### 2.3.1.3. Ensaio com interpolação em curva padrão (5 x 1)

O delineamento com curva padrão de 5 concentrações, descrito inicialmente no *US Code of Federal Regulations*<sup>43 e 44</sup> tem sido usado há muitos anos. Cada placa inclui duas doses, em posições alternadas, cada uma em triplicata. Em todas as placas uma das concentrações é a de referência, que é a concentração central da curva padrão; a outra é uma das quatro concentrações do padrão (1, 2, 4 ou 5), ou a dose da amostra de potência desconhecida, em nível de dose nominal equivalente à da referência do padrão<sup>146 e 93</sup>.

Laboratórios envolvidos na determinação de potência de número grande de amostras de mesma natureza, freqüentemente consideram conveniente testar duas ou mais amostras simultaneamente com o mesmo padrão. Este delineamento estará poupando esforços, pois permite a análise de várias amostras e o maior número de mais níveis de concentração do padrão estará contribuindo para melhor estimativa da inclinação da reta<sup>146</sup>.

Em contraste aos ensaios balanceados, cada placa não se constitui em um ensaio particular, ocasionando a necessidade de um sistema de correção quanto aos desvios entre placas<sup>146 e 93</sup>. Este sistema de correção é incorporado ao delineamento, pois cada ponto de referência se constitui na média de nove medidas, ao se considerar as três réplicas das placas, para uma amostra, e a média de 36 leituras ao se considerar os pontos do padrão, resultante de 12 placas. Primeiramente, deve-se determinar a média de cada uma das quatro concentrações do padrão, da concentração de referência das mesmas placas e de todas as amostras em análise. A correção dos dados será em função da diferença observada entre a média geral do ponto de referência (padrão 3) e a média da triplicata do padrão na placa da

dose em questão (F – fator de correção), cujo valor será somado ou subtraído da média do diâmetro dos halos da concentração ensaiada nestas mesmas placas <sup>146</sup>.

Nas avaliações microbiológicas, quando envolvem o delineamento experimental com traçado da curva dose-resposta, várias concentrações do padrão podem ser empregadas. Depois de desenvolvida a teoria do método de dose única com boa precisão do ensaio, o ponto intermediário não necessariamente deveria ser o ponto de referência, sendo suficientes 2 concentrações para estabelecer a curva padrão <sup>106</sup>. A concentração maior foi o ponto de referência. A amostra foi preparada para possuir concentração intermediária entre as do padrão, a fim de permitir a interpolação de seus dados na obtenção da potência.

FOGLESONG e colaboradores <sup>70</sup> apontaram um possível erro na determinação da potência pelo método descrito pelo FDA. Tal erro seria devido a desvios na linearidade da curva padrão. Buscando reduzir este erro, propuseram um novo procedimento de cálculo incluindo a correção das respostas de padrão e amostras através da resposta da dose de referência. Este procedimento torna-se desnecessário quando é confirmada a linearidade das respostas.

As respostas corrigidas serão empregadas para a construção de uma curva padrão e cálculos subsequentes. O gráfico é construído com os diâmetros do padrão no eixo x, em escala aritmética e a dose em escala logarítmica, no eixo y <sup>146</sup>.

NERI e colaboradores <sup>136</sup> apresentaram, em 1973, os procedimentos para determinação do intervalo de confiança para o método de interpolação em curva padrão. O trabalho também incluiu a programação em FORTRAN para a determinação da potência e seu intervalo de confiança.

#### 2.3.1.4. Ensaio em placas grandes

Um novo recurso foi estabelecido inicialmente por EPSTEIN e colaboradores<sup>63</sup> para simplificar a técnica empregando discos de papel. Foi adotada a utilização de placas grandes ou bandejas de *Pyrex*<sup>®</sup> com dimensões de 6,5 x 10,5 x 2,0 polegadas e 12,5 x 8,0 x 2,0 polegadas. Testes para determinação da penicilina com estas placas mostraram resultados mais adequados frente a placas convencionais. As placas grandes permitiram testar grande número de amostras no mesmo sistema, aumentando a uniformidade da resposta e tomando o método mais rápido. BEADLE e colaboradores<sup>14</sup> construíram placas retangulares de 4,5 x 11,5 polegadas, sendo de aço inoxidável nas laterais e fundo de vidro, tendo capacidade para 40 cilindros arranjados na placa inoculada com auxílio de um guia. A metodologia foi descrita com precisão de resultados, proporcionando erro padrão de 7%. Numa proposta similar, KANTOROWICZ<sup>103</sup> descreveu detalhadamente a construção de placa grande com capacidade para 64 pérolas de vidro. A placa foi construída com ajustes através de parafusos que possibilitavam a desmontagem. Esta placa foi posteriormente utilizada por HUMPHREY e LIGHTBOWN<sup>96</sup> para estudo da teoria da difusão, juntamente com pérolas de vidro uniformes e com capacidade média de transferência de 0,025 mL.

Desenvolveram-se métodos especificamente para controle da produção de antibióticos, caracterizando-se por precisão moderada e erro padrão de cerca de 10%<sup>151</sup>. Consistiram em teste limite, com ensaio simultâneo de 10 a 50 amostras em placas grandes, nas quais o posicionamento das soluções-teste foi estudado para eliminar os efeitos de tempo e geometria. Dois tipos de arranjos foram sugeridos. O *youden square*, quando a mistura das soluções aplicada nas placas era feita unidimensionalmente e aquele em que o



arranjo foi feito nas 2 dimensões, chamado de quadrado latino balanceado. No arranjo *youden square* as amostras formam um retângulo. O número das amostras na horizontal é maior que na vertical. A fila horizontal contém todas as soluções, assegurando que os efeitos de tempo e posicionamento entre filas sejam eliminados. Na coluna, o arranjo balanceado é utilizado e cada solução do ensaio ocorre igualmente em todas as colunas. HENDLIN <sup>91</sup>, no mesmo ano, publicou revisão referente a ensaio microbiológico, considerações teóricas, aplicação, limitações e avanços ocorridos até então.

A variabilidade de resposta a uma solução-teste é decorrente de variações inter e intra placas. O uso de placas grandes para minimizar essas variações foi introduzido por BROWNLEE e colaboradores <sup>35</sup>, em 1948, para ensaios de estreptomicina. Essas placas são de vidro e possuem fundo plano, de forma a permitir a uniformidade da camada de agar. As soluções podem ser aplicadas de forma aleatória em quadrado latino, ou quase quadrado latino (distribuição parcialmente aleatória) <sup>93 e 146</sup>.

A adição de 64 soluções testes, uma por uma na placa, resulta em uma diferença considerável de tempo entre a adição da primeira e a última solução. Isto representa uma diferença no tempo de difusão o que influencia o tamanho da zona de inibição. BROWNLEE e colaboradores <sup>35</sup> descreveram uma maneira de aplicar as soluções através de um delineamento para compensar as diferenças dos tempos de difusão.

LESS e TOOTILL <sup>114 a 116</sup> descreveram o desenvolvimento do uso de placas grandes e deram exemplos da variedade de delineamento para diferentes propósitos <sup>93</sup>.

De acordo com LEES e TOOTILL <sup>114 a 116</sup> há uma outra influência no tamanho da zona em placas grandes. Esta seria a diferença entre as zonas internas e aquelas em que as colunas e linhas estão nas bordas da placa. Cada zona interna é cercada por todos os lados

de zonas de reservatórios de solução padrão ou de solução teste. A difusão da água destes pontos mantém o conteúdo da mistura no centro da placa relativamente maior do que as bordas, onde há a tendência do agar ficar seco. Além disso, se o conteúdo da mistura na borda é menor, a difusão é mais rápida e o tamanho das zonas tendem a ser maior. Esses efeitos são evitados pelo uso de delineamento randomizado. Entretanto a perda do conteúdo da mistura sugere que a tampa não foi bem fechada e, portanto, precauções podem ser tomadas para minimizar essas fontes de erros. Se as placas forem construídas com as bordas de alumínio, o aumento da taxa de transferência de calor para as bordas pode levar a um início do crescimento mais rápido, minimizando o efeito nas bordas descrito acima <sup>93</sup>.

Para alta precisão dos ensaios, um delineamento 12 x 12 é descrito por LEES e TOOTILL <sup>114 a 116</sup>. Um destes incluem 2 ensaios de padrão e amostra e com diluição resultando em 3 concentrações para cada amostra e cada padrão; ou seja, 12 tratamentos ao total que ocuparão cada linha e cada coluna do delineamento. A principal aplicação deste delineamento é no estabelecimento de padrão de referência <sup>93</sup>.

TURCINOV e PEPELJNJAK <sup>177</sup> fizeram um estudo com o objetivo de determinar os microrganismos que apresentam maior sensibilidade para o teste de potência de Azitromicina utilizando o método de difusão em agar, com um delineamento quadrado latino 8 x 8.

### **2.3.1.5. Outros delineamentos**

Em 1987, BRADY e KATZ <sup>24</sup> propuseram um delineamento experimental alternativo ao método oficial descrito pela AOAC <sup>7 a 12</sup>. Tal delineamento previa o emprego de uma curva padrão completa empregando quatro doses, e de soluções de amostra preparadas em duas doses. Os resultados demonstraram que este delineamento, quando empregado na dosagem de bacitracina, clortetraciclina, oxitetraciclina e estreptomicina, apresenta exatidão e precisão equivalentes às do método oficial descrito pela AOAC <sup>7 a 12</sup>. Os resultados obtidos com o método simplificado mostraram-se favoráveis quando confrontados com o ensaio da AOAC <sup>7 a 12</sup> com relação à precisão e exatidão, tendo sido o coeficiente de variação para 10 réplicas de 2,5 a 6,8 %, com média de 4,3 %.

KAVANAGH realizou uma modificação no delineamento 5 x 1, na qual apenas dois pontos são empregados na construção da curva padrão e a dose mais alta é usada como referência. Esta modificação significa uma melhora quanto ao delineamento e aos aspectos práticos, pois são necessários menos esforços na construção da curva padrão <sup>93</sup>.

## **2.4. Validação de métodos analíticos**

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. 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 ao requisitos para as operações analíticas pretendidas <sup>25, 145 e 193</sup>.

O laboratório, ao empregar métodos de ensaios químicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los.

Quando o laboratório utilizar métodos normalizados ou previamente validados, será necessário verificar se os dados de validação declarados são adequados ao propósito. No caso do método normalizado não declarar dados de desempenho relevantes para a aplicação em questão, o laboratório deve estabelecê-los, levando em consideração a adequação ao uso pretendido.

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” <sup>25</sup>.
- “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” <sup>193</sup>.
- “Processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” <sup>191</sup>.

Aspecto imprescindível para execução do ensaio de doseamento de antibiótico, qualquer que seja o seu delineamento, consiste na validação <sup>146</sup>. 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 <sup>146</sup>. Deve também ser considerada a validação do processo extrativo, quando aplicável, além do ensaio e automação, quando pertinentes <sup>146</sup>.

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 devem ser realizadas validações parciais quando ocorrerem modificações no método analítico e/ou bioanalítico já validado. Os ensaios de validação parcial podem ser desde uma pequena determinação, como a determinação da exatidão e precisão intra-ensaio, até próximo de uma validação total. Para proceder a validação de um método é importante que todos os equipamentos e materiais estejam devidamente calibrados e os analistas qualificados e adequadamente treinados. 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 <sup>25</sup>.

Os testes são classificados em 4 categorias, conforme a Tabela 1 <sup>25</sup>.

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 <sup>25</sup>.

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

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	
		Quantitativo	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, linearidade, intervalo, precisão, repetibilidade, exatidão e robustez<sup>25, 145, 173, 193 e 200</sup>.

#### **2.4.1. Planejamento da validação**

O processo de validação de um método não normalizado 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 validados. Da mesma forma, o operador que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo e precisa 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<sup>173 e 200</sup>:

- 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.

#### **2.4.2. Documentação de métodos validados**

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 a introdução de variação acidental no método. Documentações que registrem etapas da validação são necessárias também para fins de



avaliação e podem ser exigidas por razões contratuais ou até mesmo por organismos regulamentadores.

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. Uma maneira prática de testar a documentação, é pedir a um outro técnico competente para ler com atenção o procedimento e executar o ensaio. Se corresponder ao esperado, então é provável que o método possa ser utilizado por vários analistas com resultados consistentes. Caso contrário, pode ser necessário reescrever o procedimento com mais detalhes para evitar ambigüidades.

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 foi esquecido, que as

informações a serem incluídas no procedimento são fornecidas sempre na mesma ordem e que qualquer assunto desejado pode ser encontrado rapidamente.

### **2.4.3. Parâmetros de validação**

#### **2.4.3.1. Especificidade e seletividade**

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 25, 145 e 193 .

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 da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

Na prática, diferentes testes de especificidade e seletividade tentam abordar o mesmo problema: o que nós medimos é o que pensamos que medimos? Entender os diferentes mecanismos que causam interferências pode ajudar na estruturação dos testes e achar 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 através de adição de padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação, ou detecção.

Dependendo da técnica analítica utilizada, a quantidade relativa da matriz pode diminuir conforme a amostra é processada durante as etapas do ensaio. A matriz está presente nas fases de amostragem, no pré-tratamento da amostra e nas etapas de preparação. Alguma porção da matriz entra no sistema de separação e alguns componentes podem ainda estar presentes na fase de detecção. Os possíveis problemas encontrados durante as fases de preparação da amostra afetam a exatidão do método e isto será abordado neste documento.

#### **2.4.3.1.1. Testes de especificidade**

Testes de especificidade necessitam de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se encontre todos os componentes que precisam ser testados. 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<sup>206</sup>.

Muito esforço foi dedicado para resolver os problemas de especificidade freqüentemente encontrados com as técnicas mais comuns de espectrofotometria de UV/Visível ou de cromatografia líquida. Comparações de resultados, variando as condições de medição e análise de pureza de sinal, podem ser usados para verificar que nenhum outro componente conhecido ou desconhecido esteja sendo determinado junto com o analito. Algumas vezes deve-se usar técnicas adicionais, como cromatografia de camada fina (CCF) ou espectroscopia de massa (EM), após a separação e a coleta do analito. Em particular, isso é necessário em métodos usados para avaliar estabilidade. Para este propósito, as amostras utilizadas nos ensaios de condições extremas, são estudadas cuidadosamente para provar que nenhum produto de degradação conhecido ou desconhecido possa perturbar o sinal do analito <sup>206</sup>.

Como exemplo, para técnicas cromatográficas, além das comparações visuais de cromatogramas, diferentes parâmetros devem ser calculados nos cromatogramas para descrever a especificidade do método. Os parâmetros mais importantes são: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos.

#### **2.4.3.1.2. Testes de seletividade**

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 concentração.

Vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes  $F$  (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste  $t$  (*Student*) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência. Normalmente, parte-se da hipótese em que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentrações elevados ou acima da faixa. Preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 7 (sete) para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida. Primeiro, faz-se o teste  $F$  para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais. Tem-se dois casos:

(I) se o teste  $F$  não é significativo, isto é, se  $F$  calculado for menor que o  $F$  tabelado, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, os desvios padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testado com a distribuição  $t$  de *Student* para variâncias iguais<sup>16 e 36</sup>.

(II) Se o teste  $F$  é significativo, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, as variâncias podem ser consideradas desiguais. Neste caso, a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testado com a distribuição  $t$  de *Student* para variâncias desiguais<sup>16 e 36</sup>.

No caso de somente uma faixa relativamente estreita de concentrações interessar, ou se o erro analítico devido a uma possível dependência com a concentração for desprezível, o teste  $t$  com dados pareados pode ser utilizado para verificar efeitos de matriz<sup>16 e 36</sup>.

Se o valor de  $t$  calculado for menor que o  $t$  tabelado, pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio. Se o valor de  $t$  for maior que o esperado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio<sup>16 e 36</sup>.

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 que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração.

Um grupo inclui a matriz da amostra (contendo um nível básico do analito) e o outro grupo não inclui a matriz de amostra. Os resultados destas amostras podem ser representados em um mesmo gráfico em função da concentração de analito adicionado. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito.

#### **2.4.3.2. Intervalo ou faixa linear de trabalho**

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, conforme apresentado na Tabela 3. 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 <sup>25</sup>.

Tabela 3. Intervalo recomendado para cada tipo de ensaio.

Ensaio	Intervalo
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados as quantidade de impurezas a serem controladas.
Uniformidade de conteúdo	De 70 a 130% da concentração teórica do teste.
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir $-20\%$ sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor

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 ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho <sup>25 e 193</sup>.

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições

especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico<sup>173 e 200</sup>.

#### **2.4.3.2.1. Escolha da faixa de trabalho**

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 brancos dos métodos. 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 (*bias*). A variância dos valores informados deve ser independente da concentração. Esta independência deve ser verificada por um teste estatístico para a linearidade.

Em geral, serão necessários vários pontos de calibração, de preferência mais que seis, para determinar a faixa de trabalho. A relação da resposta do instrumento para a concentração não tem que ser perfeitamente linear para um método ser efetivo mas, neste caso, a curva de calibração deve ser preparada diariamente.

A faixa de trabalho e a faixa linear podem ser diferentes para cada tipo de amostra, devido ao efeito das interferências provenientes da matriz.



### 2.4.3.3. Linearidade

Capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado <sup>25</sup>. 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 <sup>25</sup>. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. Para ensaios físico-químicos, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser de 0,99 <sup>25, 145 e 193</sup>.

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 <sup>173 e 200</sup>.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Equação 1

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = intersecção 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 pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Para ensaios biológicos ou microbiológicos, um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado como livre de tendências (*unbiased*) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem.

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão.

Se o valor de  $t$  calculado para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de  $t$  unilateral, para a confiança desejada e  $(n-1)$  graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear<sup>16 e 36</sup>.

A maioria dos equipamentos de detecção existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta.

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.

#### **2.4.3.3.1. Sensibilidade**

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, conforme a equação abaixo e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada<sup>206</sup>.

#### **2.4.3.4. Limite de detecção**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas<sup>25 e 193</sup>.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo limite de detecção não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais<sup>206</sup>.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento.

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito <sup>206</sup>.

O procedimento de determinação do LDM é aplicado a uma grande variedade de tipos de amostras, desde a água reagente (branco) até águas residuárias, todas contendo o analito. O LDM para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção.

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática., ou seja, “Branco + 3s” e “0 + 3s“, considerando análise de sete ou mais amostras de branco e de brancos com adição, respectivamente.

O método analítico deve ser especificado e o LDM para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LDM deve ser identificada <sup>206</sup>.

#### **2.4.3.5. Limite de quantificação**

O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (trueness). Pode ser

considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão <sup>206</sup>.

Algumas vezes é também denominado Limite de Determinação. 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 <sup>25 e 193</sup>.

#### **2.4.3.6. Exatidão e tendência**

Proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em 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, segundo a equação abaixo <sup>25, 145, 176 e 193</sup>.

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental}{Concentração\ Teórica} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro <sup>25 e 193</sup>. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência).

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) <sup>173 e 200</sup>. 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, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação <sup>200</sup>.

#### **2.4.3.6.1. Materiais de referência certificado**

Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis (como por exemplo: NIST, LGC, etc) <sup>206</sup>.

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo do rigor definido para os resultados <sup>206</sup>.

#### **2.4.3.6.2. Comparação de métodos**

Consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando um método interno com os resultados conseguidos através de um método de referência. O objetivo é de estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, de avaliar a exatidão do método interno relativamente ao de referência <sup>206</sup>.

As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos de ensaio, em separado, sobre as mesmas amostras, numa faixa restrita de concentrações ou em toda faixa de concentrações em que se pretende validar o método <sup>206</sup>.

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, entre as quais Testes de Hipótese, Teste de Regressão Linear entre os dois métodos e Projeto de Experimentos <sup>206</sup>.

#### **2.4.3.6.3. Recuperação**

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 que a presente na amostra <sup>25 e 193</sup>. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação <sup>206</sup>.

A recuperação é calculada conforme a Equação 3:

$$\text{Recuperacao (\%)} = 100 \times (C1 - C2) / C3 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

C1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C3 = concentração adicionada.

#### **2.4.3.6.4. Tipos de tendência**

Em 1983, CAULCUTT e BODDY <sup>40</sup> publicaram trabalho abrangendo diversas ferramentas estatísticas empregadas em química analítica e validação de método analíticos.

Neste trabalho os autores definem 2 tipos de tendência:

- a) Tendência fixa ou absoluta: ocorre quando há um desvio sistemático e constante, conforme representado na Figura 1. 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, conforme representado na Figura 2. 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, conforme apresentado na Figura 3. Neste caso a correção pode ser feita multiplicando-se o resultado analítico ao fator de correção determinado e pela subtração do desvio absoluto.



CAULCUTT e BODDY <sup>40</sup> descreveram um método para avaliar a existência de tendência fixa ou relativa em método analíticos através da análise de regressão linear simples. 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 (Figura 4).

THOMPSON <sup>176</sup> comparou diferentes métodos de regressão para a avaliação da exatidão. Os resultados mostraram que o modelo empregado por CAULCUTT e BODDY <sup>40</sup> é adequado para avaliar a existência de tendência fixa ou absoluta e tendência relativa.

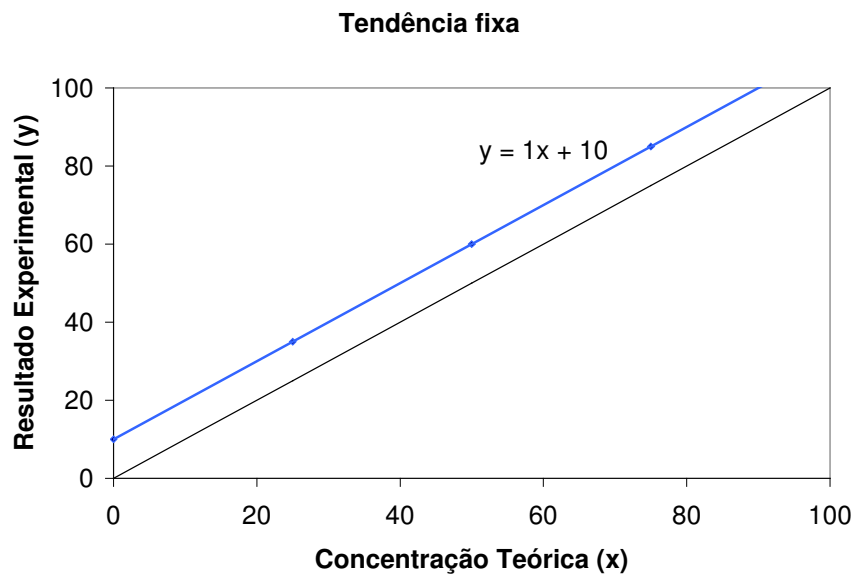


Figura 1. Método com tendência fixa <sup>40 e 176</sup>.

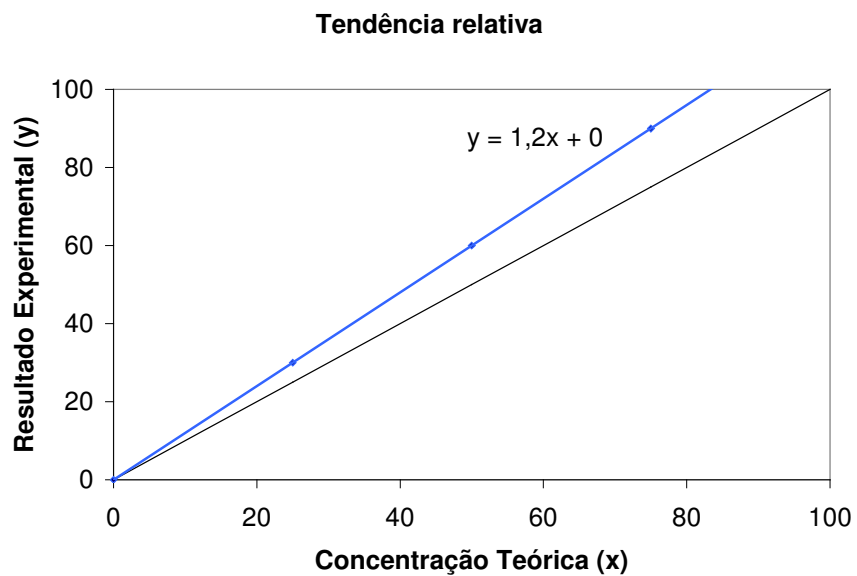


Figura 2. Método com tendência relativa <sup>40 e 176</sup>.

### Tendência fixa e relativa

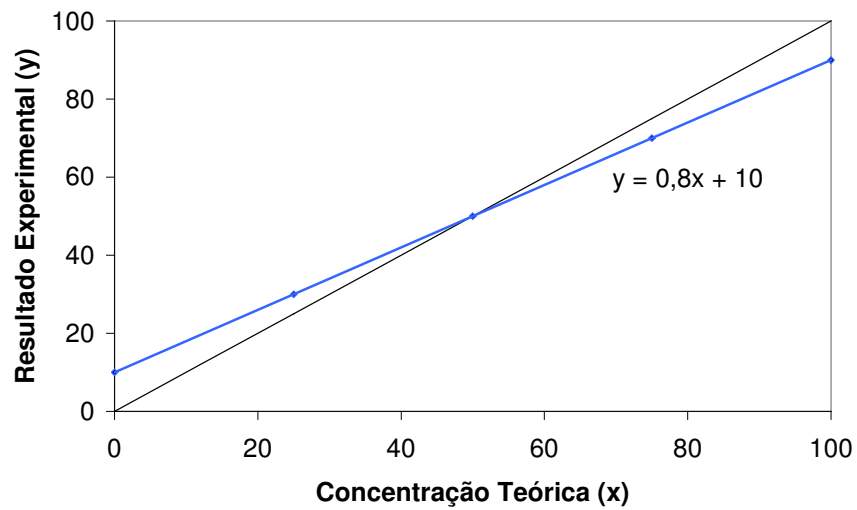


Figura 3. Método com tendência fixa e relativa <sup>40 e 176</sup>

### Sem tendência

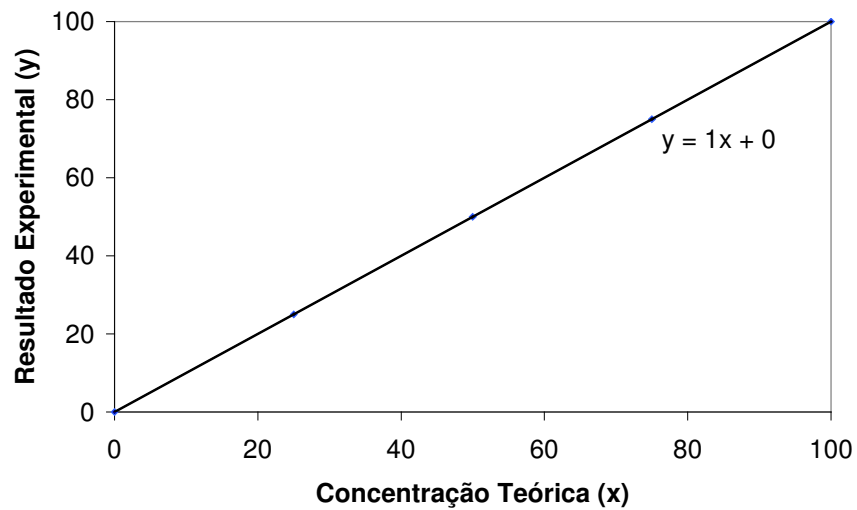


Figura 4. Método sem tendência <sup>40 e 176</sup>.

#### 2.4.3.7. Precisão

Avaliação da proximidade dos 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, segundo a Equação 4, em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. 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, não se admitindo valores superiores a 5% <sup>25, 145 e 193</sup>.

$$CV\% = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. 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.

A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo. 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, pois foi normalizado

com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande.

#### **2.4.3.7.1. Repetitividade**

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 <sup>25 e 193</sup>:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade 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. Sugere-se 7 ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade.

#### **2.4.3.7.2. Reprodutibilidade**

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição<sup>25 e 193</sup>.

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial.

Precisão sob condições de reprodutibilidade, por exemplo, onde resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos é denominada precisão intermediária.

A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade “R”, o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa.

#### **2.4.3.7.3. Precisão intermediária**

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como<sup>25 e 193</sup>:

- diferentes analistas;

- diferentes equipamentos;
- diferentes tempos.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar.

Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração<sup>206</sup>.

Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados dispersos. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores dispersos<sup>206</sup>.

#### **2.4.3.7.4. Comparação da precisão entre métodos**

Quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) tem diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste *F*. Este baseia-se no cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos (Equação 5), colocando-se a maior no numerador, de modo que a razão seja maior ou igual a um. Em seguida, compara-se este valor obtido com o valor tabelado de *F*. Se  $F_{\text{calculado}} = F_{\text{tabelado}}$ , os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões<sup>16, 36 e 40</sup>.

$$F = S_a^2 / S_b^2$$

Equação 5

#### 2.4.3.8. Robustez

Medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento <sup>25, 145 e 193</sup>.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de Youden. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão <sup>206</sup>.

Nesse método são realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 7 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições podem ser realizadas numa ordem aleatória <sup>206</sup>.

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado <sup>206</sup>.

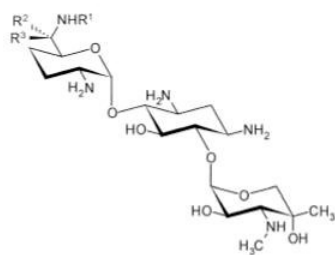


## 2.5. Aspectos gerais sobre gentamicina

### 2.5.1. Gentamicina

A gentamicina é um complexo antibiótico de largo espectro, produzido por actinomicetos do gênero *Micromonospora* e classificado entre os antibióticos aminoglicosídeos. O tratamento de infecções graves, devidas a microrganismos Gram-negativo, constitui o principal campo de aplicação na terapêutica <sup>138</sup>.

O antibiótico foi isolado em 1963 por WEINSTEIN e LUEDEMANN <sup>138</sup>. O complexo gentamicina C (Figura 5) apresenta-se como o mais importante antibiótico isolado do caldo de fermentação. Constitui-se de três componentes principais, intimamente relacionados: as gentamicinas C1, C2 e C1a. Recentemente foram isolados dois outros componentes biologicamente ativos, as gentamicinas C2a e C2b, que constituem apenas 4% do total da mistura. O complexo gentamicina C apresenta caráter básico, sendo empregado sob a forma de sulfato, em soluções injetáveis, cremes, colírios e pomadas.



gentamicin	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
C <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
C <sub>1a</sub>	H	H	H
C <sub>2</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
C <sub>2a</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
C <sub>2b</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H

Figura 5. Estrutura química do complexo gentamicina C <sup>138 e 170</sup>.

O antibiótico é considerado dos mais estáveis a temperatura e pH dentre aqueles de uso corrente na terapêutica. No controle de qualidade da matéria-prima, sulfato de gentamicina, e das formulações que o contém, as principais Farmacopéias recomendam, para o doseamento, a determinação da potência através de ensaio microbiológico.

GRAHAM e colaboradores<sup>85</sup> avaliaram a estabilidade de sulfato de gentamicina em solução de glicose. O estudo demonstrou que, na presença de glicose, ocorre degradação da gentamicina com perda da atividade antimicrobiana em até 48 horas. Um dos produtos de degradação foi identificado como sisomicina.

Em 1997, PICK e colaboradores<sup>144</sup> desenvolveram e validaram metodologia para extração quantitativa de paromomicina e gentamicina em cremes. O procedimento de extração empregou butanol e ácido sulfúrico diluído. O método apresentou recuperação próxima a 100% para os dois antibióticos avaliados.

Recentemente foram desenvolvidos diversos métodos físico-químicos para a determinação e controle da composição de sulfato de gentamicina, porém o ensaio microbiológico continua sendo o mais utilizado.

### **2.5.2. Métodos microbiológicos**

A primeira vez que um método microbiológico para avaliação de gentamicina apareceu na farmacopéia americana (USP) foi em 1970, na 18<sup>a</sup> edição da USP<sup>180</sup>. O método empregava sistema de bicamada com 21 mL de meio antibiótico n° 11 como camada base e 4 mL de meio antibiótico n° 11 inoculado com *Staphylococcus epidermidis* numa proporção de 1-2%. As placas eram incubadas a 30-35 °C por 18 horas. Eram

sugeridos os delineamentos 5 x 1 ou 3 x 3. O mesmo procedimento foi apresentado em 1975, na 19<sup>a</sup> edição da USP <sup>181</sup>.

Em 1971, ARRET e colaboradores <sup>5</sup> descreveram 83 procedimentos para diversos antibióticos, incluindo a gentamicina. O método para dosagem de gentamicina empregava sistema de bicamada com 21 mL de meio antibiótico n° 11 como camada base e 4 mL de meio antibiótico n° 11 inoculado com *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 numa proporção de 0,03%. A curva era determinada com soluções de concentração entre 0,064 e 0,156 µg/mL, diluídas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,9. As placas eram incubadas a 37°C por 16 a 18 horas, com halos entre 15 e 17 mm de diâmetro.

Com a publicação da 20<sup>a</sup> edição da USP <sup>182</sup>, em 1980, o método sofre alterações quanto a proporção de inóculo, que passou de 1-2% para 0,03%, e quanto a temperatura de incubação, que passou de 30-35 °C para 36-38 °C, tornando-se idêntico ao proposto por ARRET e colaboradores <sup>5</sup>. Este método permaneceu inalterado nas publicações seguintes da farmacopéia americana <sup>183 a 190</sup> e até 2006, com a 29<sup>o</sup> edição da USP <sup>191</sup>.

ODEN e colaboradores <sup>138</sup> descreveram ensaios microbiológicos para avaliação de gentamicina empregando *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os métodos apresentaram resposta linear nas faixas de 0,5 a 6,0 µg/mL para o *Staphylococcus aureus*, 0,05 a 0,6 µg/mL para o *Staphylococcus epidermidis* e 0,04 a 0,4 µg/mL para o *Bacillus subtilis*. Os procedimentos empregavam sistema de bicamada de meio antibiótico n° 11 para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e sistema de camada simples de meio

antibiótico nº 5 para o *Bacillus subtilis*. A incubação recomendado era por 16 a 18 horas a 32-35 °C.

### **2.5.3. Métodos físico-químicos**

Recentemente diversos métodos para avaliação de sulfato de gentamicina em produtos farmacêuticos tem sido desenvolvidos. Em 1982, CAMPOS e SCHAPOVAL<sup>37</sup> avaliaram 4 métodos físico-químicos: método densitométrico pela ninhidrina, colorimétrico pelo sulfato de cobre, colorimétrico pela ninhidrina e fluorimétrico pelo cloreto de NBD. Para efeito de comparação, as amostras foram também submetidas a determinação da potência, através de ensaio microbiológico. Os resultados sugerem o método colorimétrico pelo sulfato de cobre para o doseamento de gentamicina em soluções injetáveis.

Em 1996, STEAD e RICHARDS<sup>171</sup> descreveram método analítico para quantificação de gentamicina C1, C1a e C2 em plasma, empregando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector fluorimétrico. Anos depois, ADAMS e colaboradores<sup>3</sup> propuseram método para determinação dos componentes de gentamicina utilizando sistema cromatográfico com detecção eletroquímica.

KAALE e colaboradores<sup>101</sup> propuseram metodologia empregando eletroforese capilar para análise de sulfato de gentamicina com sistema de detecção UV a 330 nm. O procedimento incluía uma derivação com dicarboxaldeído 1,2-ftálico e ácido mercaptoacético.

Em 2000, WANG e colaboradores<sup>197</sup> desenvolveram método para determinação de gentamicina por fluorimetria. A metodologia exigia um tratamento prévio com

acetilacetona e formaldeído e posterior leitura a 434 e 411 nm. O método apresentou baixo limite de detecção e vantagens quanto a simplicidade do procedimento empregado.

FRUTOS e colaboradores <sup>78</sup> desenvolveram procedimentos para quantificação de gentamicina baseado na reação de amins primarias e secundarias com ninhidrina. A reação produz coloração purpura que pode ser lida a 400 nm. Este método colorimétrico apresentou grande valor prático devido a sua boa reprodutibilidade, sensibilidade, simplicidade e baixo custo envolvido.

Em trabalho de revisão, STEAD <sup>170</sup> relatou diversos métodos empregados na análise de aminoglicosídeos. Dentre os métodos relatados, destacou-se os procedimentos que empregam sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de par ionico. Em 2004, CLAROT e colaboradores <sup>42</sup> propuseram metodologia para analise de sulfato de gentamicina e compostos relacionados por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por *evaporative light scattering*.

# **OBJETIVO**

### 3. OBJETIVO

A necessidade de confirmação da eficácia terapêutica dos produtos medicamentosos constitui-se em aspecto de preocupação. Há situações em que a margem entre a dose ineficaz do ponto de vista terapêutico e uma dose tóxica é relativamente pequena. Adicionalmente, ainda que não se atinja o limiar da dose tóxica, há que se considerar o aspecto econômico, assim como o de falsificação com moléculas estruturalmente similares.

A gentamicina, primeiro antibiótico de importante terapêutica isolado do gênero *Micromonospora*, tem sua potência determinada microbiologicamente pelo método de difusão em agar, empregando delineamento 2 x 2 ou 5 x 1, segundo as farmacopéias brasileira e americana, respectivamente.

A associação das características positivas dos delineamentos 2 x 2 e 5 x 1 seria de interesse considerável, uma vez que poderia resultar em melhoria dos parâmetros de validação, gerando resultados mais seguros e confiáveis. O delineamento 3 x 1, proposto neste trabalho, é um ensaio de interpolação em curva padrão de emprega três doses de padrão e uma de amostra, com concentração nominal equivalente a dose média do padrão, sendo que cada placa inclui todas as preparações.

O objetivo do presente trabalho foi propor a utilização do delineamento experimental 3 x 1 para a dosagem microbiológica de gentamicina e comparar as características de especificidade, linearidade, faixa, exatidão e precisão às dos delineamentos experimentais 2 x 2 e 5 x 1 empregados na dosagem microbiológica de gentamicina em diferentes preparações farmacêuticas.

# **MATERIAL E MÉTODO**



## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Material

#### 4.1.1. Soluções diluentes e meios de cultura

##### 4.1.1.1. Caldo de caseína-soja

Foi utilizado meio caldo de caseína-soja fornecido pela Difco ou Oxoid, com composição conforme a descrita a seguir:

— Digesto pancreático de caseína	17,0 g
— Digesto papaínico de farinha de soja	3,0 g
— Cloreto de sódio	5,0 g
— Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
— Glicose	2,5 g
— Água destilada q.s.p.	1000 mL

Após dissolução do pó o pH foi ajustado entre 7,1 e 7,5 com ácido clorídrico 0,1 M ou hidróxido de sódio 0,1 M e esterilizado em autoclave a 125 °C durante 30 minutos.

#### 4.1.1.2. Tampão fosfato 0,1 M pH 8

— Fosfato de potássio bibásico	16,73 g
— Fosfato de potássio monobásico	0,523 g
— Água destilada q.s.p.	1000 mL

Após dissolução dos sais o pH foi ajustado entre 7,9 e 8,1 com ácido fosfórico 18 N ou hidróxido de potássio 18 N e esterilizado em autoclave a 125 °C durante 30 minutos.

#### 4.1.1.3. Meio antibiótico n° 1

Foi utilizado meio antibiótico n° 1 fornecido pela Difco ou Oxoid, com composição conforme a descrita a seguir:

— Peptona	6,0 g
— Digesto pancreático de caseína	4,0 g
— Extrato de levedura	3,0 g
— Extrato de carne	1,5 g
— Glicose	1,0 g
— Agar	15,0 g
— Água destilada q.s.p.	1000 mL

Após dissolução do pó o pH foi ajustado entre 6,5 e 6,7 com ácido clorídrico 0,1 M ou hidróxido de sódio 0,1 M e esterilizado em autoclave a 125 °C durante 30 minutos.

#### 4.1.1.4. Meio antibiótico nº 11

Foi utilizado meio antibiótico nº 11 fornecido pela Difco ou Oxoid, com composição conforme a descrita a seguir:

— Peptona	6,0 g
— Digesto pancreático de caseína	4,0 g
— Extrato de levedura	3,0 g
— Extrato de carne	1,5 g
— Glicose	1,0 g
— Agar	15,0 g
— Água destilada q.s.p.	1000 mL

Após dissolução do pó o pH foi ajustado entre 8,2 e 8,4 com ácido clorídrico 0,1 M ou hidróxido de sódio 0,1 M e esterilizado em autoclave a 125 °C durante 30 minutos.

#### 4.1.2. Padrão de sulfato de gentamicina

Foi utilizado padrão primário de sulfato de gentamicina, adquirido junto a *United States Pharmacopeia* (USP), com potência de 697 µg/mg.

### 4.1.3. Amostras de sulfato de gentamicina

Foram ensaiadas amostras contendo sulfato de gentamicina nas seguintes apresentações:

- MP – Matéria-prima (equivalente a 10 mg de gentamicina)
- SI – Solução Injetável (10 mg/mL)
- CD – Creme Dermatológico (1 mg/g)

Cada forma farmacêutica abrangeu 3 lotes de preparação (A, B e C) com 3 níveis de dosagem (70%, 100% e 130% da dose indicada acima).

#### 4.1.3.1. Matéria-prima

Foram preparadas 9 amostras de matéria-prima, conforme descrito no item 4.2.2.1., identificadas da seguinte forma:

- MP<sub>A70%</sub> – Matéria-prima, lote de preparação A, nível 70%
- MP<sub>A100%</sub> – Matéria-prima, lote de preparação A, nível 100%
- MP<sub>A130%</sub> – Matéria-prima, lote de preparação A, nível 130%
  
- MP<sub>B70%</sub> – Matéria-prima, lote de preparação B, nível 70%
- MP<sub>B100%</sub> – Matéria-prima, lote de preparação B, nível 100%
- MP<sub>B130%</sub> – Matéria-prima, lote de preparação B, nível 130%

- $MP_{C70\%}$  – Matéria-prima, lote de preparação C, nível 70%
- $MP_{C100\%}$  – Matéria-prima, lote de preparação C, nível 100%
- $MP_{C130\%}$  – Matéria-prima, lote de preparação C, nível 130%

#### **4.1.3.2. Solução injetável**

Foram preparadas 9 amostras de solução injetável, conforme descrito no item 4.2.2.2., identificadas da seguinte forma:

- $SI_{A70\%}$  – Solução injetável, lote de preparação A, nível 70%
- $SI_{A100\%}$  – Solução injetável, lote de preparação A, nível 100%
- $SI_{A130\%}$  – Solução injetável, lote de preparação A, nível 130%
  
- $SI_{B70\%}$  – Solução injetável, lote de preparação B, nível 70%
- $SI_{B100\%}$  – Solução injetável, lote de preparação B, nível 100%
- $SI_{B130\%}$  – Solução injetável, lote de preparação B, nível 130%
  
- $SI_{C70\%}$  – Solução injetável, lote de preparação C, nível 70%
- $SI_{C100\%}$  – Solução injetável, lote de preparação C, nível 100%
- $SI_{C130\%}$  – Solução injetável, lote de preparação C, nível 130%

#### 4.1.3.3. Creme dermatológico

Foram preparadas 9 amostras de creme dermatológico, conforme descrito no item 4.2.2.3., identificadas da seguinte forma:

- CD<sub>A70%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação A, nível 70%
- CD<sub>A100%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação A, nível 100%
- CD<sub>A130%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação A, nível 130%
  
- CD<sub>B70%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação B, nível 70%
- CD<sub>B100%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação B, nível 100%
- CD<sub>B130%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação B, nível 130%
  
- CD<sub>C70%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação C, nível 70%
- CD<sub>C100%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação C, nível 100%
- CD<sub>C130%</sub> – Creme dermatológico, lote de preparação C, nível 130%

#### 4.1.4. Microrganismo-teste

O microrganismo-teste utilizado como revelador foi o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, fornecido pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) ou pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)<sup>80</sup>.

## **4.2. Método**

### **4.2.1. Plano de trabalho**

O plano de trabalho constitui-se na realização de 243 ensaios de doseamento microbiológico de gentamicina utilizando os delineamentos experimentais 2 x 2, 5 x 1 e 3 x 1. A Figura 6 apresenta a distribuição dos ensaios.

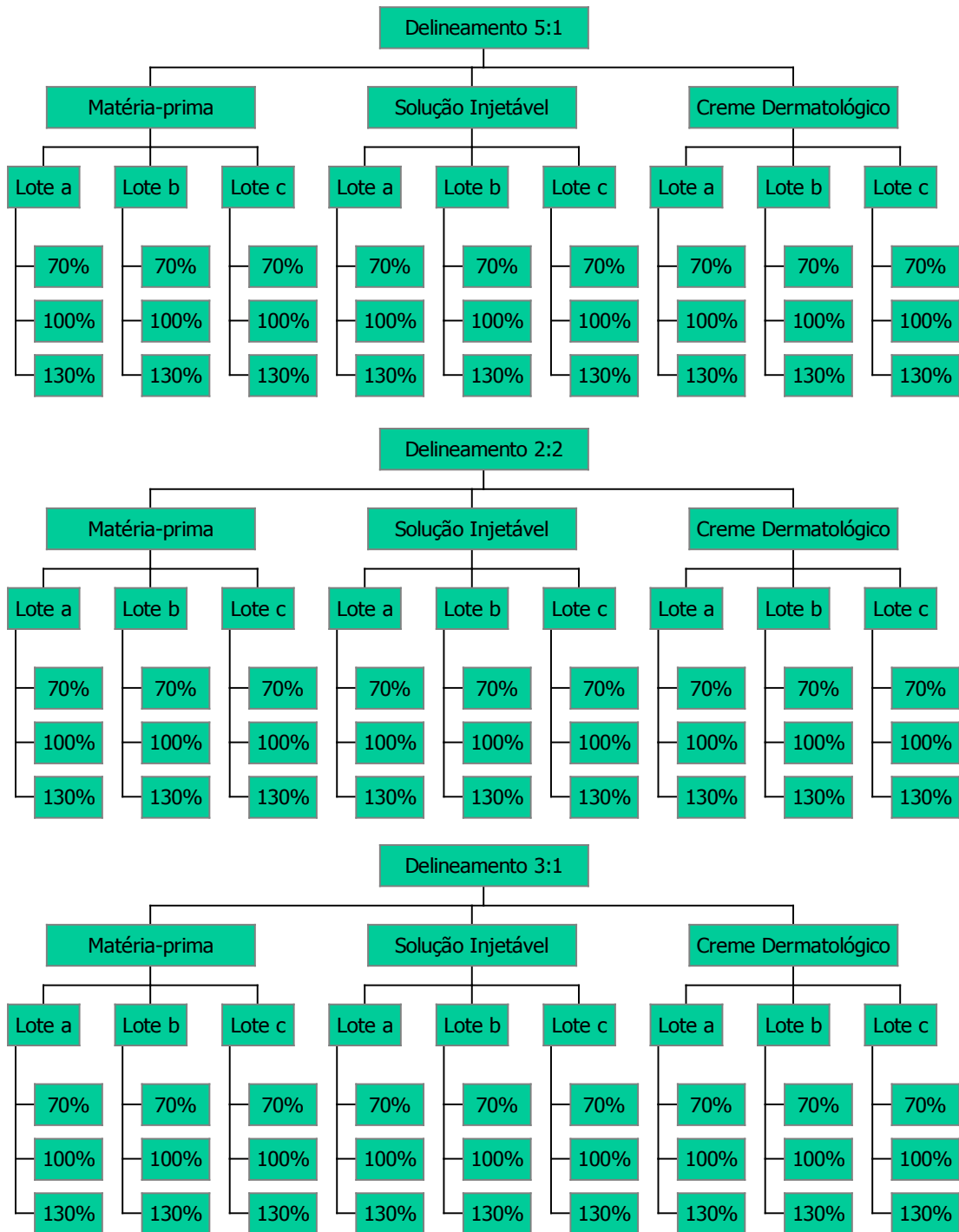


Figura 6. Plano de trabalho para doseamento microbiológico de sulfato de gentamicina.



## **4.2.2. Preparação das amostras de sulfato de gentamicina**

### **4.2.2.1. Matéria-prima**

A amostra de matéria-prima de sulfato de gentamicina, com potência estimada de 620 µg/mg, foi fornecida pela FARMUSP (Farmácia Universitária da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

### **4.2.2.2. Solução injetável**

As amostras de solução injetável foram preparadas, no dia do ensaio, pesando-se quantidades de matéria-prima de sulfato de gentamicina (620 µg/mg) suficientes para obter soluções com:

— SI<sub>70%</sub> – 7 mg/mL

— SI<sub>100%</sub> – 10 mg/mL

— SI<sub>130%</sub> – 13 mg/mL

As soluções foram filtradas utilizando-se dispositivo estéril com membrana 0,22 µm e transferidas assepticamente para frascos estéreis, devidamente identificados.

#### **4.2.2.3. Creme dermatológico**

As amostras de creme dermatológico foram preparadas, no dia do ensaio, pesando-se quantidades de matéria-prima de sulfato de gentamicina (620 µg/mg) suficientes para obter cremes com:

- CD<sub>70%</sub> – 0,7 mg/g
- CD<sub>100%</sub> – 1,0 mg/g
- CD<sub>130%</sub> – 1,3 mg/g

As amostras foram homogeneizadas através de técnicas adequadas de manipulação de cremes (com espátula tipo pão-duro e frasco plástico de fundo redondo ou com espátula de alumínio e placas de vidro) e transferidas para frascos de vidro limpos e identificados.

#### **4.2.3. Preparação das soluções antibióticas**

##### **4.2.3.1. Delineamento 2 x 2**

###### **4.2.3.1.1. Padrão de gentamicina**

Foi pesada uma quantidade de padrão primário de sulfato de gentamicina equivalente a 25 mg de gentamicina. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8 a uma

concentração de 1 mg/mL. Desta solução, foi pipetado 5 mL para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8 a uma concentração de 50 µg/mL. A partir desta solução foram transferidos 2 mL e 4 mL para balões volumétricos de 50 mL, completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8, a concentrações de 2 µg/mL (P1) e 4 µg/mL (P2), respectivamente.

#### **4.2.3.1.2. Matéria-prima**

Foram pesadas quantidades de matéria-prima de sulfato de gentamicina equivalente a 7 mg, 10 mg e 13 mg de gentamicina. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foram transferidos 1 mL para balões volumétricos de 100 mL (A1) e 50 mL (A2), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.1.3. Solução injetável**

Foram transferidos 1 mL de soluções injetáveis de sulfato de gentamicina, com concentrações de gentamicina de 7 mg/mL, 10 mg/mL e 13 mg/mL, para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foram transferidos 1 mL para balões volumétricos de 100 mL (A1) e 50 mL (A2), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.1.4. Creme dermatológico**

Foram pesados 1 g de cremes dermatológicos de sulfato de gentamicina, com concentrações de gentamicina de 0,7 mg/g, 1,0 mg/g e 1,3 mg/g, para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foram transferidos 10 mL (A1) e 20 mL (A2) para balões volumétricos 50 mL, completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.2. Delineamento 5 x 1**

##### **4.2.3.2.1. Padrão de gentamicina**

Foi pesada uma quantidade de padrão primário de sulfato de gentamicina equivalente a 25 mg de gentamicina. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8 a uma concentração de 1 mg/mL. Desta solução, foi pipetado 5 mL para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8 a uma concentração de 50 µg/mL. A partir desta solução preparou-se a curva padrão a seguir, usando tampão fosfato 0,1 M pH 8 como diluente:

- 1,3 µg/mL: pipetado 1,3 mL para balão volumétrico de 50 mL (P1)
- 1,6 µg/mL: pipetado 1,6 mL para balão volumétrico de 50 mL (P2)
- 2,0 µg/mL: pipetado 2,0 mL para balão volumétrico de 50 mL (P3)

— 2,5 µg/mL: pipetado 2,5 mL para balão volumétrico de 50 mL (P4)

— 3,1 µg/mL: pipetado 3,1 mL para balão volumétrico de 50 mL (P5)

#### **4.2.3.2.2. Matéria-prima**

Foram pesadas quantidades de matéria-prima de sulfato de gentamicina equivalente a 7 mg, 10 mg e 13 mg de gentamicina. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 100 mL (A), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.2.3. Solução injetável**

Foram transferidos 1 mL de soluções injetáveis de sulfato de gentamicina, com concentrações de gentamicina de 7 mg/mL, 10 mg/mL e 13 mg/mL, para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 100 mL (A), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.2.4. Creme dermatológico**

Foram pesados 1 g de cremes dermatológicos de sulfato de gentamicina, com concentrações de gentamicina de 0,7 mg/g, 1,0 mg/g e 1,3 mg/g, para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foram transferidos 10 mL para balão volumétrico de 50 mL (A), completando com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.3 Delineamento 3 x 1**

##### **4.2.3.3.1. Padrão de gentamicina**

Foi pesada uma quantidade de padrão primário de sulfato de gentamicina equivalente a 25 mg de gentamicina. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8 a uma concentração de 1 mg/mL. Desta solução, foi pipetado 5 mL para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8 a uma concentração de 50 µg/mL. A partir desta solução preparou-se a curva padrão a seguir, usando tampão fosfato 0,1 M pH 8 como diluente:

- 1,0 µg/mL: pipetado 1,0 mL para balão volumétrico de 50 mL (P1)
- 2,0 µg/mL: pipetado 2,0 mL para balão volumétrico de 50 mL (P2)
- 4,0 µg/mL: pipetado 4,0 mL para balão volumétrico de 50 mL (P3)

#### **4.2.3.3.2. Matéria-prima**

Foram pesadas quantidades de matéria-prima de sulfato de gentamicina equivalente a 7 mg, 10 mg e 13 mg de gentamicina. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 100 mL (A), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.3.3. Solução injetável**

Foram transferidos 1 mL de soluções injetáveis de sulfato de gentamicina, com concentrações de gentamicina de 7 mg/mL, 10 mg/mL e 13 mg/mL, para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 100 mL (A), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.3.3.4. Creme dermatológico**

Foram pesados 1 g de cremes dermatológicos de sulfato de gentamicina, com concentrações de gentamicina de 0,7 mg/g, 1,0 mg/g e 1,3 mg/g, para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com tampão fosfato 0,1 M pH 8. A partir desta solução foram transferidos 10 mL para balão volumétrico de 50 mL (A), completando o volume com tampão fosfato 0,1 M pH 8.

#### **4.2.4. Preparação da suspensão microbiana**

Culturas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram mantidas em superfície inclinada de meio antibiótico n° 1. Uma cultura de não mais de 24 horas, incubada em temperatura de 32 a 35 °C, foi ressuspensa com 3 mL de caldo de caseína-soja. Foram realizadas diluições sucessivas até obter transmitância de  $25 \pm 2\%$  a 580 nm usando caldo de caseína-soja como branco. Esta suspensão foi utilizada como inoculo.

#### **4.2.5. Preparação das placas com meio basal e inoculado**

As placas foram preparadas com 21 mL de meio antibiótico n° 11. Após solidificação da camada base, foi adicionado 4 mL de meio antibiótico n° 11 inoculado numa proporção de 1%.

#### **4.2.6. Delineamentos Experimentais empregados**

Os discos de papel (*Schleicher e Schuell*<sup>®</sup>) de 12,7 mm de diâmetro, previamente imersos em soluções de padrões ou amostras tendo sido o excesso de volume removido de forma padronizada, foram distribuídos conforme o delineamento experimental empregado.



#### 4.2.6.1. Delineamento 2 x 2

No ensaio 2 x 2 cada placa inclui todas as doses, sendo que as doses baixas e altas de padrão e amostra de potência desconhecida foram distribuídas em posições opostas. A Figura 7 indica a disposição dos discos de papel (*Schleicher e Schuell*<sup>®</sup>) em cada placa de Petri.

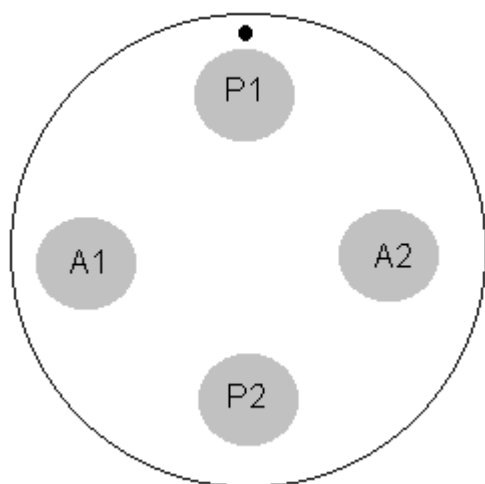


Figura 7. Esquema de distribuição das soluções-teste empregado no delineamento 2 x 2.

Foram empregadas 6 placas para cada amostra ensaiada pelo delineamento experimental 2 x 2.

#### 4.2.6.2. Delineamento 5 x 1

No ensaio 5 x 1 cada placa inclui duas doses, em posição alternada, sendo que em todas as placas uma das concentrações foi a de referência (concentração central da curva padrão) e a outra foi uma das quatro concentrações do padrão ou a dose da amostra de potência desconhecida (dose nominal equivalente à da referência do padrão). A Figura 8 indica a disposição dos discos de papel (*Schleicher e Schuell*<sup>®</sup>) em cada placa de Petri.

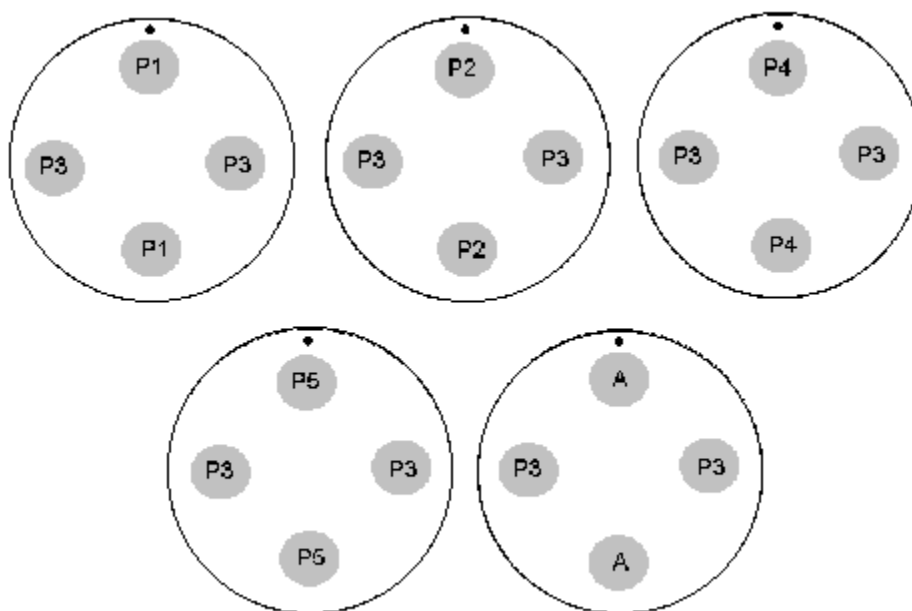


Figura 8. Esquema de distribuição das soluções-teste empregado no delineamento 5 x 1.

Foram empregadas 16 placas para a curva padrão e 4 placas para cada amostra ensaiada pelo delineamento experimental 5 x 1.

#### 4.2.6.3. Delineamento 3 x 1

No ensaio 3 x 1 cada placa inclui todas as doses, sendo que a dose média do padrão e a dose da amostra de potência desconhecida foram distribuídas em posições opostas. A Figura 9 indica a disposição dos discos de papel (*Schleicher e Schuell*<sup>®</sup>) em cada placa de Petri.

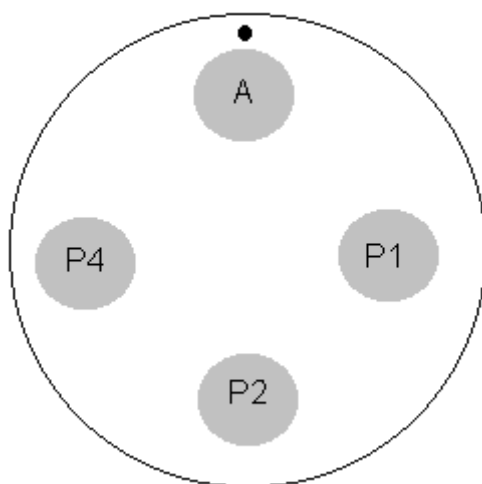


Figura 9. Esquema de distribuição das soluções-teste empregado no delineamento 3 x 1.

Foram empregadas 6 placas para cada amostra ensaiada pelo delineamento experimental 3 x 1. A Figura 10 exemplifica a distribuição dos discos de papel na placa de Petri e a formação dos halos de inibição após o período de incubação.

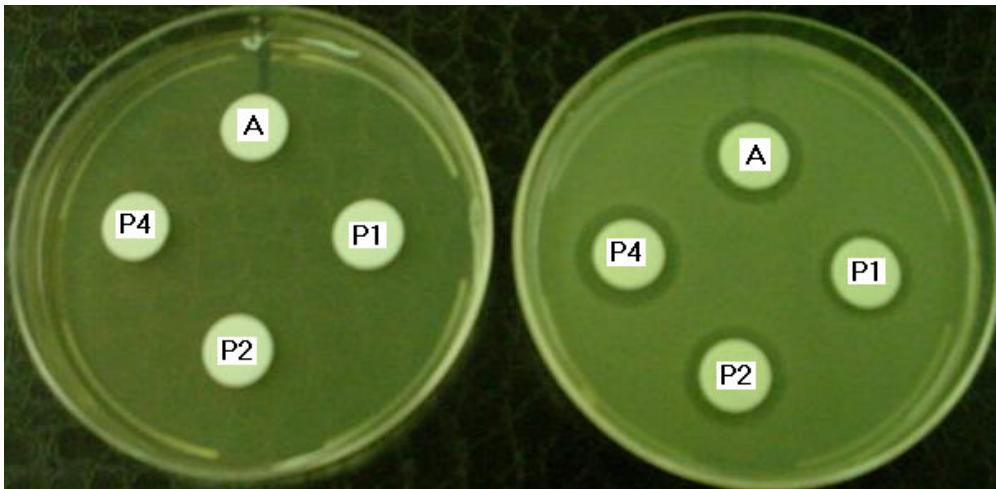


Figura 10. Placas do doseamento microbiológico de gentamicina pelo delineamento 3 x 1 antes (esquerda) e depois (direita) do período de incubação.

#### 4.2.7. Incubação das placas

As placas foram incubadas em estufa incubadora Nova Ética (Mod. 411 D), por 16-18 horas em temperatura de  $37 \pm 1$  °C.

#### 4.2.8. Leitura da resposta biológica

Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos, em milímetros, com auxílio aparelho de leitura de halos *Eli Lilly Antibiotic Zone Reader*<sup>®</sup> (Figura 11) Os resultados foram registrados e os cálculos foram realizados conforme o delineamento experimental empregado.

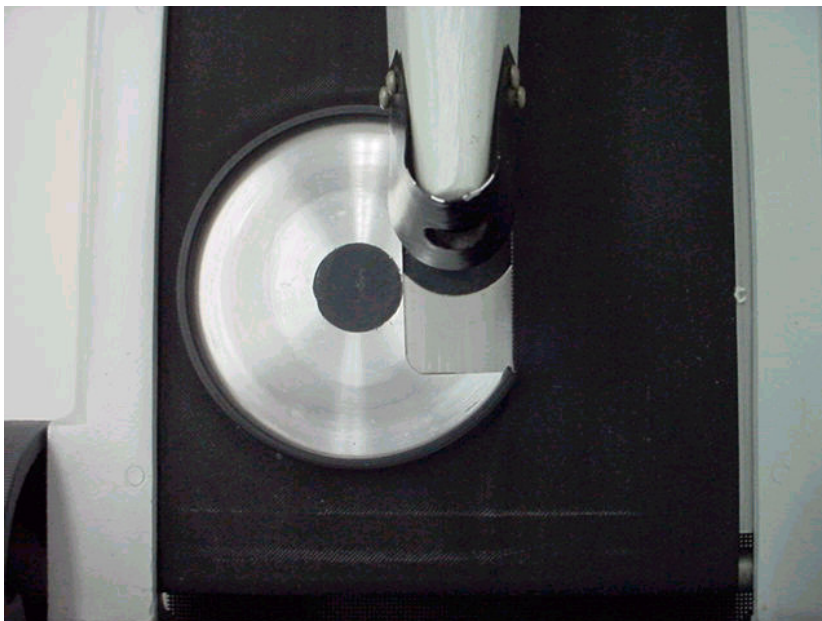


Figura 11. Dispositivo para leitura de halos *Eli Lilly Antibiotic Zone Reader*<sup>®</sup>.

#### 4.2.9. Determinação da potência de gentamicina

##### 4.2.9.1. Delineamento 2 x 2

Os resultados dos ensaios realizados empregando delineamento 2 x 2 foram calculados segundo descrito por HEWITT<sup>93</sup>, conforme as equações abaixo:

Diferença entre doses:

$$E = \frac{1}{2} \times [(A2 + P2) - (A1 + P1)] \quad \text{Equação 6}$$

Diferença entre preparações:

$$F = \frac{1}{2} \times [(A2 + A1) - (P2 + P1)] \quad \text{Equação 7}$$

Razão logarítmica entre as doses:

$$I = \log(2) = 0,301 \quad \text{Equação 8}$$

Inclinação da curva:

$$b = \frac{E}{I} \quad \text{Equação 9}$$

Potência da amostra:

$$M = \frac{F}{b} \quad \text{Equação 10}$$

$$\text{Potência} = \text{Antilog}M \quad \text{Equação 11}$$

Cada ensaio foi avaliado, através de análise de variância (ANOVA), quanto à regressão e ao paralelismo para garantir a validade do teste.

#### 4.2.9.2. Delineamento 5 x 1

Os resultados dos ensaios realizados empregando delineamento 5 x 1 foram calculados segundo descrito por HEWITT<sup>93</sup>, conforme as equações abaixo:

Correção dos pontos da curva:

$$P1_C = P1 + (P3_C - P3_{P1}) \quad \text{Equação 12}$$

$$P2_C = P2 + (P3_C - P3_{P1}) \quad \text{Equação 13}$$

$$P3_C = \frac{1}{4} \times (P3_{P1} + P3_{P2} + P3_{P4} + P3_{P5}) \quad \text{Equação 14}$$

$$P4_C = P4 + (P3_C - P3_{P1}) \quad \text{Equação 15}$$

$$P5_C = P5 + (P3_C - P3_{P1}) \quad \text{Equação 16}$$

Diferença entre doses:

$$E = \frac{1}{10} \times [2 \times P5_c + P4_c - P2_c - 2 \times P1_c] \quad \text{Equação 17}$$

Diferença entre preparações:

$$F = A - P3_A \quad \text{Equação 18}$$

Razão logarítmica entre as doses:

$$I = \log(1,25) = 0,0969 \quad \text{Equação 19}$$

Inclinação da curva:

$$b = \frac{E}{I} \quad \text{Equação 20}$$

Potência da amostra:

$$M = \frac{F}{b} \quad \text{Equação 21}$$

$$\text{Potência} = \text{Antilog}M \quad \text{Equação 22}$$

Para garantir a validade do ensaio, cada curva padrão foi avaliada, através da análise de análise de variância, quanto à linearidade e à regressão.

#### **4.2.9.3. Delineamento 3 x 1**

Os resultados dos ensaios realizados empregando delineamento 3 x 1 foram calculados conforme as equações abaixo:

Diferença entre doses:

$$E = \frac{1}{2} \times [P3 - P1] \quad \text{Equação 23}$$

Diferença entre preparações:

$$F = A - P2 \quad \text{Equação 24}$$

Razão logarítmica entre as doses:

$$I = \log(2) = 0,301 \quad \text{Equação 25}$$

Inclinação da curva:

$$b = \frac{E}{I} \quad \text{Equação 26}$$

Potência da amostra:

$$M = \frac{F}{b} \quad \text{Equação 27}$$

$$\text{Potência} = \text{Antilog}M \quad \text{Equação 28}$$

Cada ensaio foi avaliado, através de análise de variância, quanto à linearidade e à regressão para garantir a validade do teste.

#### **4.2.10. Avaliação dos parâmetros de validação do método analítico**

Os delineamentos experimentais empregados no doseamento microbiológico de gentamicina foram avaliados quanto à especificidade, exatidão, precisão, linearidade e faixa.



#### 4.2.10.1. Avaliação da especificidade

A especificidade foi avaliada através da comparação dos diâmetros dos halos obtidos de solução de gentamicina e solução de gentamicina com os excipientes da forma farmacêutica avaliada.

Os diâmetros dos halos foram comparados quanto a dispersão, empregando o teste F-Snedecor.

Se o teste  $F$  não é significativo, isto é, se  $F$  calculado for menor que o  $F$  tabelado, considerou-se que a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão. Neste caso, os desvios padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos halos de inibição foi testado com a distribuição  $t$  de Student para variâncias iguais<sup>16 e 36</sup>.

Se o teste  $F$  é significativo, considerou-se que a matriz tem um efeito importante sobre a precisão e as variâncias foram consideradas desiguais. Neste caso, a significância das diferenças das médias dos halos de inibição foi testado com a distribuição  $t$  de Student para variâncias desiguais<sup>16 e 36</sup>.

#### 4.2.10.2. Avaliação da exatidão

A exatidão foi avaliada quanto à tendência fixa e à tendência relativa, e foi determinada por análise de regressão linear, plotando as concentrações teóricas *versus* as concentrações determinadas experimentalmente.

A equação da reta, referente à exatidão de cada delineamento experimental, foi estimada através de 81 determinações experimentais em três níveis de concentração (70%, 100% e 130% da dose de referência) em matéria-prima, solução injetável e creme dermatológico.

Considerou-se que os métodos são exatos, ou seja, não apresentam tendência fixa e tendência relativa quando os intervalos de confiança para os coeficientes linear e angular incluem, respectivamente, os valores 0 e 1.

#### **4.2.10.3. Avaliação da precisão**

A precisão foi avaliada através do desvio padrão determinado a partir de 81 determinações experimentais em três níveis de concentração (70%, 100% e 130% da dose de referência) em matéria-prima, solução injetável e creme dermatológico. Os delineamentos foram comparados quanto a precisão através do teste de Bartlett e do teste de Levene.

Também foi avaliado se a precisão tem associação com a concentração, através de análise de regressão linear, plotando o desvio padrão relativo *versus* concentração. Considerou-se que a precisão não tem associação com a concentração quando o intervalo de confiança do coeficiente angular inclui o valor 0.

#### **4.2.10.4. Avaliação da linearidade e faixa linear**

A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear pelo coeficiente de correlação e pela significância da regressão. Considerou-se que os métodos apresentam linearidade quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) é maior ou igual a 0,90 e a significância da regressão é inferior a 0,01.

A resolução RE 899 de 2003 <sup>25</sup> indica que a faixa ou intervalo recomendado para metodologia de determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas é de 80% a 120% da concentração teórica. No entanto, a especificação para gentamicina em creme dermatológico, descrito na USP 29 <sup>191</sup>, é de 90% a 130% da concentração teórica. Desta forma, a avaliação a faixa ou intervalo foi realizada de 70% a 130% da concentração teórica. O intervalo foi estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados.

#### **4.2.11. Comparação entre os diferentes delineamentos**

As comparações entre os diferentes delineamentos foram realizadas através da determinação de índices de capacidade do sistema de medição. Estes índices foram estimados pela razão entre a amplitude dos resultados numa determinada condição e a faixa ou intervalo linear do método empregado (70% a 130% da concentração teórica). Os índices avaliam qual a influência da diferença do delineamento em relação a faixa de aplicação do método.

Considerou-se que para valores inferiores a 10% não há influência significativa do tipo de delineamento empregado, sendo métodos intercambiáveis. Para valores entre 10% e 30% há uma pequena influência, mas ainda aceitável. Quando os valores superaram a 30% considerou-se grande influência do tipo de delineamento empregado, não sendo possível assegurar a intercambialidade dos métodos.

#### **4.2.12. Comparação entre as diferentes apresentações**

As comparações entre as diferentes apresentações foram realizadas através da determinação de índices de capacidade do sistema de medição. Estes índices foram estimados pela razão entre a amplitude dos resultados numa determinada condição e a faixa ou intervalo linear do método empregado (70% a 130% da concentração teórica). Os índices avaliaram qual a influência da diferença da apresentação em relação a faixa de aplicação do método.

Considerou-se que para valores inferiores a 10% não há influência significativa da apresentação avaliada. Para valores entre 10% e 30% há uma pequena influência, mas ainda aceitável. Quando os valores superaram a 30% considerou-se grande influência da apresentação avaliada.

#### **4.2.13. Comparação entre os diferentes níveis de concentração**

As comparações entre os diferentes níveis de concentração foram realizadas através da determinação de índices de capacidade do sistema de medição. Estes índices

foram estimados pela razão entre a amplitude dos resultados numa determinada condição e a faixa ou intervalo linear do método empregado (70% a 130% da concentração teórica). Os índices avaliaram qual a influência da diferença do nível de concentração da amostra em relação a faixa de aplicação do método.

Considerou-se que para valores inferiores a 10% não há influência significativa do nível de concentração da amostra. Para valores entre 10% e 30% há uma pequena influência, mas ainda aceitável. Quando os valores superaram a 30% considerou-se grande influência do nível de concentração da amostra.

#### **4.2.14. Comparação entre os diferentes lotes da preparação**

As comparações entre os diferentes dias de ensaio foram realizadas através da determinação de índices de capacidade do sistema de medição. Estes índices foram estimados pela razão entre a amplitude dos resultados numa determinada condição e a faixa ou intervalo linear do método empregado (70% a 130% da concentração teórica). Os índices avaliaram qual a influência da diferença do dia de ensaio em relação a faixa de aplicação do método.

Considerou-se que para valores inferiores a 10% não há influência significativa do dia de ensaio. Para valores entre 10% e 30% há uma pequena influência, mas ainda aceitável. Quando os valores superaram a 30% considerou-se grande influência do dia de ensaio.

**RESULTADO E  
DISCUSSÃO**

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Quando um método é adotado para uso em um outro laboratório, o propósito do ensaio pode ser diferente. Por exemplo, um ensaio originalmente descrito pode ter sido delineado para pesquisa e desenvolvimento, porém, seu novo propósito pode ser a rotina do controle de qualidade. Detalhes práticos, como, composição do meio e preparação do inóculo podem não sofrer alteração. É provável, porém, que o delineamento do ensaio tenha que ser modificado. Muitas vezes, infelizmente, esse fato não é observado, e um determinado delineamento deve ser associado ao ensaio de uma substância em particular.

A precisão associada à padronização dos ensaios pode variar de acordo com o número de réplicas. Portanto, pelo menos na teoria, qualquer delineamento pode ser adotado no intuito de aumentar a precisão do ensaio. Na prática, quando queremos obter um resultado confiável, é necessário não apenas controlar as técnicas operacionais, mas também escolher um delineamento que permita atingir a precisão desejada de forma eficiente. O delineamento e replicação exercem influência quantitativa marcante na precisão de um método de doseamento, seja ele qual for. Porém, deve ficar claro que, a menos que os requerimentos químicos, físicos e biológicos para um ensaio válido sejam assegurados, nenhum tipo de delineamento ou quantidade de réplicas conduzirão a bons resultados.

Os pontos relevantes na seleção de um delineamento são:

- Número de amostras com a mesma substância ativa que serão testadas.

- A natureza das amostras e a determinação de especificações (limites de aceitação). Caso a faixa de trabalho seja estreita, a amostra poderá ser diluída até que a potência da solução teste esteja próxima da do padrão a ser utilizado.
- Classificação das amostras: número de amostras que se encontram dentro das especificações estabelecidas.
- A precisão requerida dos resultados: devem-se responder as seguintes perguntas: a) a mesma precisão é requerida para todas as amostras?, b) se o ensaio é realizado em muitas amostras com relativa baixa precisão, quais são as chances de se aceitar um resultado ocasional que esteja bastante fora da real potência?
- A capacidade do time de trabalho.

Quando não é requerida alta precisão, devem ser feitas considerações de ordem econômica, sendo, portanto, selecionado um delineamento de modo a evitar replicatas desnecessárias. Devemos nos preocupar não apenas com a precisão, mas também com a capacidade geral do teste, de modo que este nos dê informações confiáveis de acordo com os propósitos que estabelecemos.

Considerando-se a finalidade do teste, um delineamento de ensaio que é bastante apropriado para discriminação de amostras é o método das placas grandes, no qual se usa apenas um nível de dose para amostra e quatro níveis de dose para o padrão. Este delineamento pode ser ilustrado quando a dose global varia na proporção de 8:1 para os padrões, sendo, portanto, particularmente adequada quando praticamente desconhecemos a potência da amostra. Assim, a ocasional obtenção de uma potência alta ou baixa não invalidará o ensaio. Portanto, tal delineamento é útil para uma grande variedade de



amostras resultantes de processos de extração de antibióticos, nos quais a variedade de amostras pode incluir aquelas que apresentam pouca ou nenhuma atividade. O único nível de dose da amostra não permite que seja feita nenhuma comparação, contudo, este delineamento é aceito se considerarmos os objetivos do teste.

Quando um ensaio de alta precisão é requerido, é necessário prévio conhecimento da natureza quantitativa da amostra e da potência aproximada desta. Para análises de rotina em um laboratório de Controle de Qualidade, o delineamento 5 x 1 é bastante conveniente, pois permite a avaliação de um número grande de amostras através da determinação de uma curva padrão. Entretanto, tal delineamento apresenta limitações quanto ao fornecimento de evidências da validade do ensaio. Pode-se apenas avaliar a linearidade da curva padrão e a significância da regressão.

O ensaio de antibióticos deve ser delineado de modo a permitir a determinação da validade do modelo matemático no qual a equação de potência é baseada. De acordo com as Farmacopéias Britânica, Européia e Brasileira, se o modelo de linhas paralelas for escolhido, as linhas obtidas nos gráficos de logaritmo da dose pela resposta (diâmetro do halo de inibição) da amostra e da substância de referência devem ser paralelas e lineares na faixa de doses selecionada para os cálculos.

Quando há necessidade de maior segurança quanto a validade do ensaio, o delineamento 3 x 3 é o mais recomendado, pois permite avaliação da significância da regressão, linearidade da resposta e paralelismo entre as curvas de padrão e amostra. Em ensaios de rotina, quando a linearidade já foi comprovada, pode ser empregado o delineamento 2 x 2. Neste caso, padrão e amostra são preparados de modo a minimizar a influência da curvatura, não sendo, portanto necessários testes para a sua avaliação.

O delineamento 2 x 2 simples está incluído na Farmacopéia Internacional. Esse delineamento e suas diversas modificações para a comparação simultânea de duas ou mais amostras com o mesmo padrão é amplamente utilizado.

As soluções de teste para as duas preparações possuem a mesma potência nominal. No entanto, a diferença da potência (logaritmo) é revelada pela distância vertical entre as duas linhas paralelas. Assumindo que as linhas são essencialmente paralelas, mas as respostas médias são sujeitas a erros aleatórios, então a melhor estimativa da diferença nas respostas devido a diferença entre as doses alta e baixa é obtida como a média dessas diferenças para padrão e amostra e é designada E. Similarmente, a melhor estimativa da diferença na resposta devido a diferença entre a amostra e o padrão é obtido pelo cálculo da média de dois níveis e é designado F.

Deve ser notado que os princípios aqui descritos para o caso simples, o delineamento 2 x 2, são aplicáveis a todos os testes de linhas paralelas. Quando as doses nominais são desiguais, no entanto, uma etapa adicional deve ser introduzida.

As Farmacopéias Internacional e Européia fornecem fórmulas análogas para outros delineamentos de teste. Para esses outros testes, os princípios para cálculos são idênticos, apesar de que, em alguns casos, a lógica por detrás é um pouco mais complicada. Para trabalho de rotina, é usualmente mais simples trabalhar com a soma dos diâmetros das zonas do que com as médias. Essa é uma etapa perfeitamente válida, levando aos mesmos resultados com menos trabalho.

Contudo, devem ser feitas considerações adicionais quanto ao número de amostras a serem analisadas. Quando são analisadas poucas amostras, o ensaio 2 x 2 emprega uma quantidade de material menor quando comparado com o ensaio 5 x 1. No entanto, o ensaio

5 x 1 permite a análise de muitas amostras empregando a mesma curva padrão, passando a apresentar vantagem em relação ao ensaio 2 x 2.

O delineamento com curva padrão de 5 concentrações, descrito inicialmente no *US Code of Federal Regulations* tem sido usado há muitos anos. Cada placa inclui duas doses, em posições alternadas, cada uma em triplicata. Em todas as placas uma das concentrações é a de referência, que é a concentração central da curva padrão; a outra é uma das quatro concentrações do padrão (1, 2, 4 ou 5), ou a dose da amostra de potência desconhecida, em nível de dose nominal equivalente à da referência do padrão.

Laboratórios envolvidos na determinação de potência de número grande de amostras de mesma natureza, freqüentemente consideram conveniente testar duas ou mais amostras simultaneamente com o mesmo padrão. Este delineamento estará poupando esforços, pois permite a análise de várias amostras e o maior número de mais níveis de concentração do padrão estará contribuindo para melhor estimativa da inclinação da reta.

Em contraste aos ensaios balanceados, cada placa não se constitui em um ensaio particular, ocasionando a necessidade de um sistema de correção quanto aos desvios entre placas<sup>146 e 93</sup>. Este sistema de correção é incorporado ao delineamento, pois cada ponto de referência se constitui na média de nove medidas, ao se considerar as três réplicas das placas, para uma amostra, e a média de 36 leituras ao se considerar os pontos do padrão, resultante de 12 placas. Primeiramente, deve-se determinar a média de cada uma das quatro concentrações do padrão, da concentração de referência das mesmas placas e de todas as amostras em análise. A correção dos dados será em função da diferença observada entre a média geral do ponto de referência (padrão 3) e a média da triplicata do padrão na placa da

dose em questão ( $F$  – fator de correção), cujo valor será somado ou subtraído da média do diâmetro dos halos da concentração ensaiada nestas mesmas placas.

Nas avaliações microbiológicas, quando envolvem o delineamento experimental com traçado da curva dose-resposta, várias concentrações do padrão podem ser empregadas. Um procedimento de cálculo incluindo a correção das respostas de padrão e amostras através da resposta da dose de referência é indicado para minimizar erros devido a desvios da linearidade. As respostas corrigidas serão empregadas para a construção de uma curva padrão e cálculos subsequentes. O gráfico é construído com os diâmetros do padrão no eixo  $x$ , em escala aritmética e a dose em escala logarítmica, no eixo  $y$ . Este procedimento torna-se desnecessário quando é confirmada a linearidade das respostas.

O ensaio  $3 \times 1$ , proposto neste trabalho, agrega características dos delineamentos  $2 \times 2$  e  $5 \times 1$ . É um ensaio com interpolação em curva padrão, no entanto, emprega apenas 3 pontos na determinação da curva padrão. A disposição das soluções padrão e amostra permitem que todas as preparações sejam empregadas na mesma placa, eliminando a necessidade de correção e reduzindo fontes de erro.

Quanto à validade do ensaio, a avaliação se dá através da determinação do coeficiente de correlação linear e da significância da regressão, semelhantemente ao delineamento  $5 \times 1$ . Entretanto, quando emprega-se delineamento  $5 \times 1$ , no caso de invalidade do ensaio, devido a ausência de significância da regressão ou ausência de linearidade, os resultados obtidos de todas as amostras avaliadas devem ser desconsiderados. Quando o delineamento  $3 \times 1$  é empregado, a avaliação da significância da regressão e da linearidade é determinada para cada amostra e, no caso de invalidade destes parâmetros, apenas a amostra em questão deve ter seu resultado desconsiderado.

Empregando o delineamento 3 x 1, é possível quantificar 3 amostras simultaneamente, aplicando-se 6 discos de papel por placa. Tal procedimento representa vantagem pela pequena quantidade de material envolvida no ensaio. Entretanto, tem-se que tomar cuidados na aplicação dos discos de papel para que não ocorra sobreposição dos halos de inibição.

O delineamento 3 x 1 pode ser aplicado para avaliação de outros antibióticos, inclusive empregando razão entre as doses diferente de 2. Porém, faz-se necessária a avaliação da significância da regressão e a linearidade da curva empregada.

Publicações descrevendo novos desenvolvimentos de métodos de ensaio de doseamento para uma substância em particular possuem, no geral, procedimentos bem detalhados, e, sendo assim, podem ser seguidos por um analista sem que este necessite de informações adicionais. As informações fornecidas nestas publicações incluem detalhes dos níveis das doses do padrão e da amostra e da distribuição destes nas placas e tubos, ou seja, descrevem detalhadamente o delineamento do ensaio. Esses delineamentos são, provavelmente, adequados para as necessidades do ensaio para o qual foi desenvolvido. Entretanto, também pode ocorrer a influência de alguns fatores como: restrição de aparelhos, a preferência do autor, ou até mesmo, a falta de conhecimento e experiência de outros delineamentos.

Os resultados relativos aos doseamentos microbiológicos de gentamicina das matérias-primas, soluções injetáveis e cremes dermatológicos pelos delineamentos 2 x 2, 5 x 1 e 3 x 1 constam nas Tabelas 4 a 12.

Tabela 4. Resultados do doseamento microbiológico de matéria-prima de gentamicina pelo delineamento 2 x 2.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	67,7
		2	74,3
		3	73,4
	100%	1	98,4
		2	100,7
		3	97,9
	130%	1	136,9
		2	129,0
		3	134,3
B	70%	1	62,6
		2	68,4
		3	68,2
	100%	1	101,1
		2	92,7
		3	98,9
	130%	1	123,6
		2	132,0
		3	123,2
C	70%	1	70,0
		2	62,9
		3	68,2
	100%	1	90,9
		2	94,0
		3	91,5
	130%	1	121,3
		2	133,0
		3	131,3

Tabela 5. Resultados do doseamento microbiológico de solução injetável de gentamicina pelo delineamento 2 x 2.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	64,2
		2	63,3
		3	62,7
	100%	1	100,1
		2	99,7
		3	101,0
	130%	1	129,3
		2	122,3
		3	138,6
B	70%	1	64,5
		2	76,6
		3	71,3
	100%	1	94,7
		2	98,7
		3	92,5
	130%	1	125,1
		2	129,0
		3	139,3
C	70%	1	64,9
		2	63,4
		3	69,6
	100%	1	95,9
		2	93,7
		3	96,5
	130%	1	128,2
		2	128,2
		3	129,4

Tabela 6. Resultados do doseamento microbiológico de creme dermatológico de gentamicina pelo delineamento 2 x 2.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	70,5
		2	84,8
		3	78,3
	100%	1	97,7
		2	105,2
		3	100,8
	130%	1	143,9
		2	162,0
		3	130,3
B	70%	1	80,5
		2	78,5
		3	74,1
	100%	1	100,9
		2	104,7
		3	93,2
	130%	1	137,3
		2	135,1
		3	128,0
C	70%	1	69,5
		2	73,9
		3	69,6
	100%	1	88,3
		2	94,5
		3	99,5
	130%	1	125,4
		2	122,4
		3	128,8



Tabela 7. Resultados do doseamento microbiológico de matéria-prima de gentamicina pelo delineamento 5 x 1.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	75,8
		2	72,6
		3	72,3
	100%	1	96,8
		2	96,2
		3	96,2
	130%	1	134,9
		2	120,5
		3	133,6
B	70%	1	69,9
		2	66,9
		3	66,6
	100%	1	96,9
		2	94,1
		3	100,9
	130%	1	136,9
		2	133,2
		3	132,7
C	70%	1	64,0
		2	67,8
		3	62,1
	100%	1	89,9
		2	97,2
		3	89,9
	130%	1	130,4
		2	129,0
		3	132,0

Tabela 8. Resultados do doseamento microbiológico de solução injetável de gentamicina pelo delineamento 5 x 1.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	86,3
		2	69,3
		3	64,3
	100%	1	108,4
		2	96,1
		3	97,5
	130%	1	135,4
		2	125,2
		3	124,6
B	70%	1	70,4
		2	72,5
		3	72,5
	100%	1	103,8
		2	102,9
		3	102,5
	130%	1	148,6
		2	121,5
		3	127,4
C	70%	1	70,1
		2	68,5
		3	65,7
	100%	1	94,0
		2	99,2
		3	100,3
	130%	1	132,5
		2	137,6
		3	123,6

Tabela 9. Resultados do doseamento microbiológico de creme dermatológico de gentamicina pelo delineamento 5 x 1.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	75,8
		2	72,6
		3	72,3
	100%	1	96,8
		2	96,2
		3	96,2
	130%	1	134,9
		2	120,5
		3	133,6
B	70%	1	76,7
		2	74,5
		3	74,1
	100%	1	101,6
		2	98,4
		3	100,9
	130%	1	138,7
		2	133,4
		3	142,9
C	70%	1	65,8
		2	62,7
		3	70,4
	100%	1	93,2
		2	83,2
		3	95,4
	130%	1	126,5
		2	109,2
		3	117,9

Tabela 10. Resultados do doseamento microbiológico de matéria-prima de gentamicina pelo delineamento 3 x 1.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	64,1
		2	68,1
		3	64,0
	100%	1	89,7
		2	102,2
		3	99,5
	130%	1	128,3
		2	143,2
		3	115,5
B	70%	1	58,8
		2	69,2
		3	72,9
	100%	1	87,8
		2	101,9
		3	88,0
	130%	1	113,1
		2	125,8
		3	142,9
C	70%	1	66,0
		2	69,3
		3	71,3
	100%	1	95,7
		2	99,6
		3	93,6
	130%	1	127,8
		2	127,5
		3	132,6

Tabela 11. Resultados do doseamento microbiológico de solução injetável de gentamicina pelo delineamento 3 x 1.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	78,3
		2	62,2
		3	65,7
	100%	1	106,5
		2	102,7
		3	100,5
	130%	1	120,8
		2	143,8
		3	123,6
B	70%	1	75,0
		2	64,6
		3	63,7
	100%	1	103,4
		2	96,7
		3	97,2
	130%	1	129,6
		2	125,0
		3	125,1
C	70%	1	68,6
		2	68,9
		3	71,2
	100%	1	101,3
		2	97,1
		3	107,5
	130%	1	138,1
		2	132,6
		3	132,6

Tabela 12. Resultados do doseamento microbiológico de creme dermatológico de gentamicina pelo delineamento 3 x 1.

Lote	Nível	Réplica	Teor (%)
A	70%	1	79,6
		2	66,8
		3	75,1
	100%	1	94,7
		2	99,2
		3	92,8
	130%	1	144,8
		2	141,7
		3	126,3
B	70%	1	71,6
		2	60,3
		3	62,9
	100%	1	99,1
		2	95,4
		3	102,3
	130%	1	124,5
		2	134,2
		3	139,9
C	70%	1	56,9
		2	70,9
		3	61,7
	100%	1	81,1
		2	92,5
		3	100,2
	130%	1	123,5
		2	119,3
		3	127,1

Os ensaios do delineamento 2 x 2 foram considerados válidos quanto a significância da regressão ( $p < 0,01$ ) e ao paralelismo ( $p > 0,05$ ), conforme apresentado na Tabela 13. As curvas do delineamento 5 x 1 foram consideradas válidas quanto a linearidade ( $r > 0,90$ ) e a significância da regressão ( $p < 0,01$ ), conforme apresentado na Tabela 14. Os resultados obtidos pelo delineamento 3 x 1 foram considerados válidos quanto a linearidade ( $r > 0,90$ ) e a significância da regressão ( $p < 0,01$ ), conforme apresentado na Tabela 15.







Tabela 14. Validade dos doseamentos microbiológicos de sulfato de gentamicina pelo delineamento 5 x 1 em diferentes amostras.

Apresentação	Lote	Regressão*	Linearidade*
Matéria-prima	A	0,00	0,99
	B	0,00	0,99
	C	0,00	0,99
Apresentação	Lote	Regressão*	Linearidade*
Solução Injetável	A	0,00	0,99
	B	0,00	0,99
	C	0,00	0,99
Apresentação	Lote	Regressão*	Linearidade*
Creme Dermatológico	A	0,00	0,99
	B	0,00	0,99
	C	0,00	1,00

\* Valores de P.

Tabela 15. Validade dos doseamentos microbiológicos sulfato de gentamicina pelo delineamento 3 x 1 em diferentes amostras.

Matéria-prima				Solução Injetável				Creme Dermatológico			
Lote	Nível	Regressão*	Linearidade*	Lote	Nível	Regressão*	Linearidade*	Lote	Nível	Regressão*	Linearidade*
		0,00	0,94			0,00	0,96			0,00	0,96
	70%	0,00	0,96		70%	0,00	0,96		70%	0,00	0,96
		0,00	0,94			0,00	0,96			0,00	0,98
		0,00	0,90			0,00	0,95			0,00	0,93
A	100%	0,00	0,94	A	100%	0,00	0,95	A	100%	0,00	0,93
		0,00	0,91			0,00	0,90			0,00	0,91
		0,00	0,96			0,00	0,96			0,00	0,98
	130%	0,00	0,98		130%	0,00	0,97		130%	0,00	0,97
		0,00	0,97			0,00	0,95			0,00	0,96
		0,00	0,93			0,00	0,90			0,00	0,97
	70%	0,00	0,94		70%	0,00	0,97		70%	0,00	0,96
		0,00	0,95			0,00	0,95			0,00	0,94
		0,00	0,95			0,00	0,95			0,00	0,92
B	100%	0,00	0,96	B	100%	0,00	0,98	B	100%	0,00	0,98
		0,00	0,91			0,00	0,98			0,00	0,90
		0,00	0,95			0,00	0,96			0,00	0,98
	130%	0,00	0,96		130%	0,00	0,98		130%	0,00	0,98
		0,00	0,96			0,00	0,97			0,00	0,98

Continuação da Tabela 15. Validade dos doseamentos microbiológicos de sulfato de gentamicina pelo delineamento 3 x 1 em diferentes amostras.

Matéria-prima				Solução Injetável				Creme Dermatológico			
Lote	Nível	Regressão*	Linearidade*	Lote	Nível	Regressão*	Linearidade*	Lote	Nível	Regressão*	Linearidade*
		0,00	0,97			0,00	0,97			0,00	0,95
	70%	0,00	0,96		70%	0,00	0,95		70%	0,00	0,97
		0,00	0,95			0,00	0,95			0,00	0,96
		0,00	0,96			0,00	0,97			0,00	0,96
C	100%	0,00	0,98	C	100%	0,00	0,98	C	100%	0,00	0,99
		0,00	0,90			0,00	0,91			0,00	0,90
		0,00	0,96			0,00	0,97			0,00	0,99
	130%	0,00	0,97		130%	0,00	0,98		130%	0,00	0,97
		0,00	0,97			0,00	0,97			0,00	0,98

\* Valores de P.

No que diz respeito a validação, os delineamentos experimentais 2 x 2, 5 x 1 e 3 x 1 apresentaram especificidade, exatidão, precisão, linearidade e intervalo ou faixa adequados a aplicação dos métodos.

Os métodos apresentaram especificidade adequada para análise de solução injetável e creme dermatológico contendo sulfato de gentamicina. Os testes *F* de *Snedecor* demonstraram que não houve efeito significativo da matriz quanto a precisão das respostas obtidas. Os testes *t* de *Student* demonstraram a ausência de efeito da matriz para solução injetável e creme dermatológico contendo sulfato de gentamicina. Desta forma garantiu-se que a resposta obtida (diâmetro dos halos de inibição) está associada a quantidade de gentamicina presente na formulação (Tabelas 16, 17 e 18).

Tabela 16. Diâmetro dos halos de soluções de matéria-prima e matéria-prima + placebo.

MP	MP+CD	MP	MP+SI
18,55	18,70	18,80	18,78
18,38	18,45	18,83	18,88
18,50	18,57	18,73	18,67
18,58	18,47	20,43	20,27
18,45	18,40	20,53	20,50
18,67	18,52	20,47	20,27
17,25	17,23	19,67	19,45
17,12	16,98	19,68	19,65
17,20	17,20	19,75	19,73
18,86	19,04	18,84	18,96
18,80	18,94	18,84	18,76
18,81	18,95	18,91	18,86
18,35	18,34	22,13	22,25
18,49	18,46	20,58	20,68
18,30	18,31	20,73	20,81
18,18	18,19	19,95	19,81
18,23	17,88	19,91	19,90
18,23	18,19	20,25	20,26
18,57	18,18	19,20	18,75
18,82	18,03	19,15	18,25
18,83	18,45	19,15	18,45
18,72	18,67	22,00	22,12
18,52	18,43	21,67	21,58
18,57	18,60	21,93	21,87
18,05	17,87	19,92	19,95
17,85	17,73	19,95	19,88
17,85	17,90	20,07	20,23
Media = 18,25	Media = 18,32	Media = 19,91	Media = 20,00
Variância = 0,27	Variância = 0,24	Variância = 1,27	Variância = 1,05

Foram empregadas soluções com concentração de 2 µg/mL

Tabela 17. Resultados do teste de especificidade para creme dermatológico de sulfato de gentamicina.

Teste-F: duas amostras para variâncias

	MP+CD	MP
Média	18,25	18,32
Variância	0,27	0,24
Observações	27	27
Gl	26	26
F	1,10	
P(F<=f) uni-caudal	0,40	
F crítico uni-caudal	1,93	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	MP+CD	MP
Média	18,25	18,32
Variância	0,27	0,24
Observações	27	27
Variância agrupada	0,26	
Hipótese da diferença de média	0,00	
Gl	52	
Stat t	-0,55	
P(T<=t) bi-caudal	0,59	
t crítico bi-caudal	2,01	

Tabela 18. Resultados do teste de especificidade para solução injetável de sulfato de gentamicina.

Teste-F: duas amostras para variâncias

	MP+SI	MP
Média	19,91	20,00
Variância	1,27	1,05
Observações	27	27
Gl	26	26
F	1,21	
P(F<=f) uni-caudal	0,32	
F crítico uni-caudal	1,93	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	MP+SI	MP
Média	19,91	20,00
Variância	1,27	1,05
Observações	27	27
Variância agrupada	1,16	
Hipótese da diferença de média	0,00	
Gl	52	
Stat t	-0,31	
P(T<=t) bi-caudal	0,76	
t crítico bi-caudal	2,01	



Os métodos foram considerados exatos quando os intervalos de confiança dos coeficientes linear e angular incluem, respectivamente, os valores 1 e 0 (Figuras 12, 14 e 16). Nenhum dos três delineamentos apresentou tendência fixa ou absoluta e tendência relativa. Desta forma não foi necessário empregar nenhum tipo de correção ou ajuste aos resultados obtidos.

A precisão dos métodos foi quantificada pela estimativa do desvio padrão de cada delineamento avaliado. A estimativa do desvio padrão foi determinada pela raiz quadrada do erro residual da análise de variância para cada delineamento. Os testes de Bartlett e de Levene indicaram que não há diferença significativa de precisão para os delineamentos avaliados (Figura 18). Também considerou-se que a precisão não tem associação com a concentração quando o intervalo de confiança do coeficiente angular inclui o valor 0 (Figuras 13, 15 e 17).



























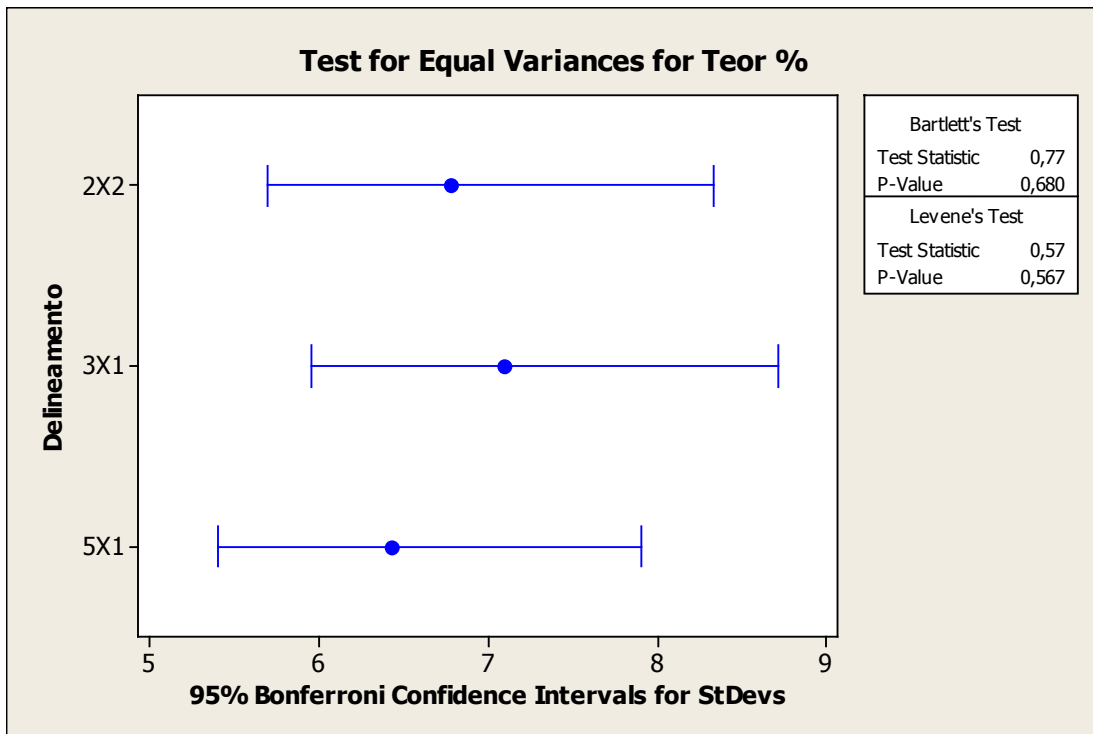


Figura 18. Comparação da precisão do delineamentos 2 x 2, 5 x 1 e 3 x 1.

Os resultados demonstraram que há associação linear entre o diâmetro dos halos de inibição e o logaritmo da concentração, sendo que para todos os ensaios foi obtido coeficiente de correlação superior a 0,90 e regressão significativa ( $p < 0,01$ ). O método estudado apresentou linearidade, exatidão e precisão adequadas na faixa de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  a 4,0  $\mu\text{g/mL}$ .

As Tabelas 19 e 20 apresenta os índices de capacidade do sistema de medição. Considerou-se que para valores inferiores a 10% não há influência significativa do fator avaliado. Para valores entre 10% e 30% há uma pequena influência, mas ainda aceitável. Quando os valores superaram a 30% considerou-se grande influência do fator avaliado. Os resultados demonstraram que os fatores avaliados não exercem influência significativa em

relação a faixa de aplicação (70% a 130% da concentração teórica) dos métodos. Isto indica que as diferenças encontradas entre os resultados obtidos nas diferentes condições (delineamentos, tipos de amostras, níveis de concentração e lotes de preparo) foram desprezíveis quando comparadas com a faixa de aplicação dos métodos.

Tabela 19. Índices de capacidade dos efeitos de diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração.

Tipo de Efeito	Índice de capacidade
Lote	7,6%*
Tipo de amostra	4,6%*
Delineamento	3,8%*
Nível de concentração	7,9%*
* Não há influência significativa.	

Tabela 20. Índices de capacidade das interações de diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração.

Tipo de Interação	Índice de capacidade
Lote x Tipo de amostra	16,3%**
Lote x Delineamento	11,5%**
Lote x Nível de concentração	12,1%**
Tipo de amostra x Delineamento	11,0%**
Tipo de amostra x Nível de concentração	10,8%**
Delineamento x Nível de concentração	6,6%*
* Não há influência significativa.	
** Influência pouca significativa.	

Os gráficos de efeitos (Figura 19) e de interações (Figura 20) indicam as diferenças entre as diversas condições avaliadas em relação a faixa de aplicação dos métodos.



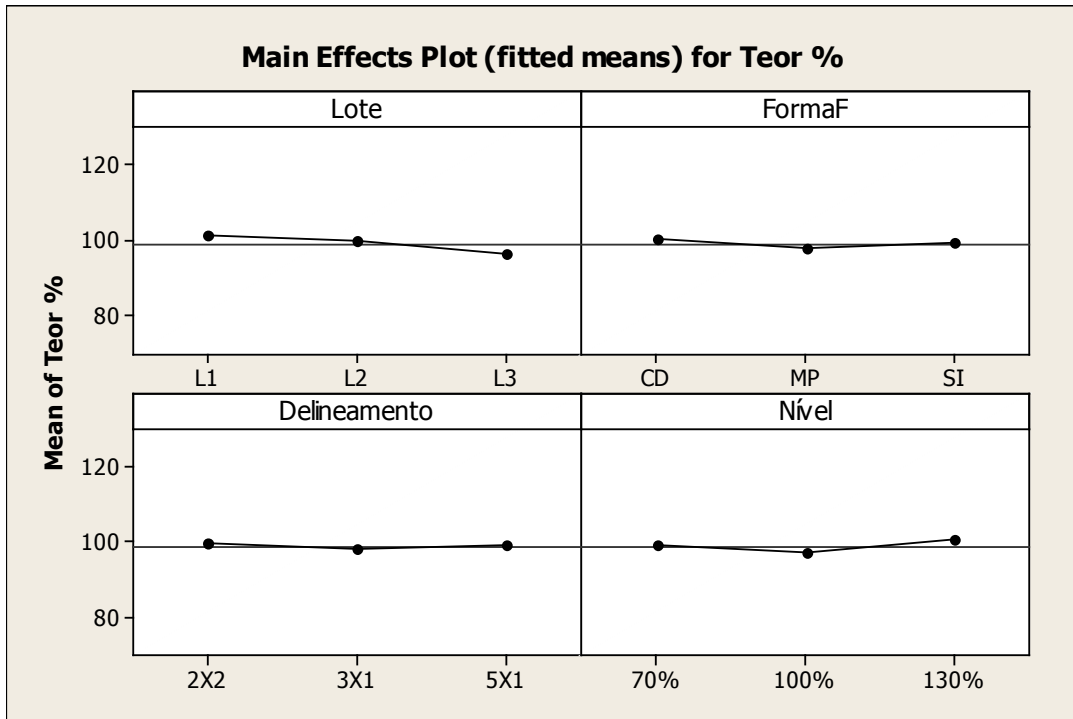


Figura 19. Gráficos de efeitos dos diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração

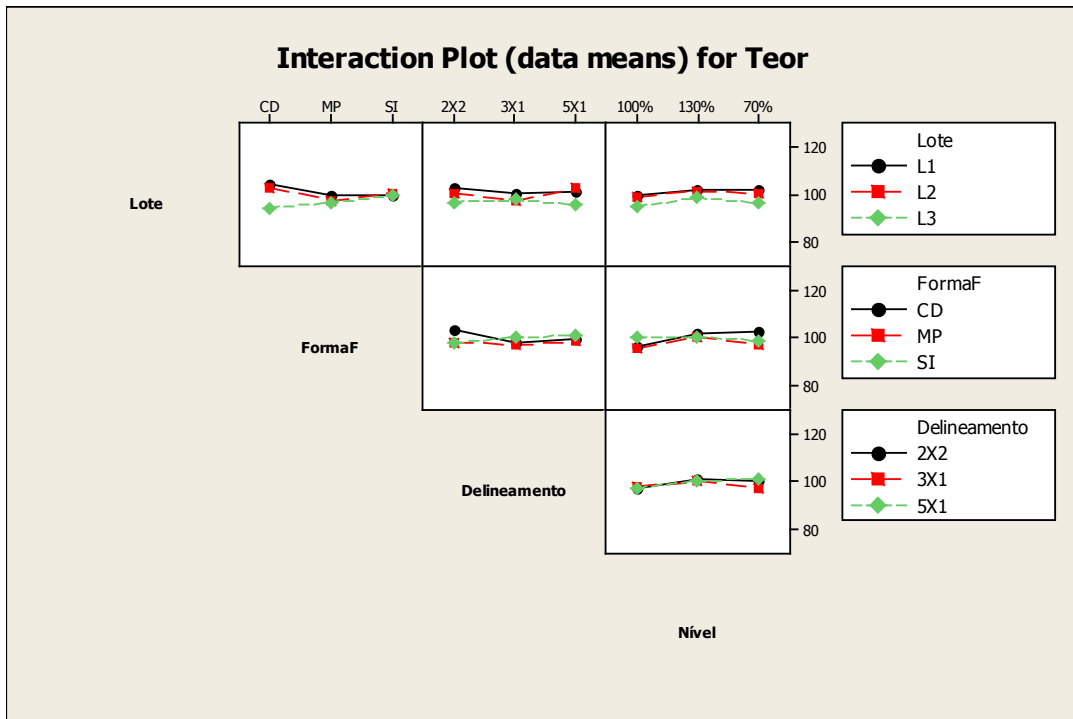


Figura 20. Gráficos das interações dos diferentes lotes, tipos de amostras, delineamentos e níveis de concentração

# CONCLUSÃO

## 6. CONCLUSÃO

- O método microbiológico, em todos os seus delineamentos, apresentou especificidade adequada para análise de solução injetável e creme dermatológico contendo sulfato de gentamicina. Os testes estatísticos demonstraram ausência de efeito da matriz.
- O delineamento 3 x 1 mostrou exatidão adequada, não apresentando tendências fixa e relativa para a avaliação de matéria-prima de sulfato de gentamicina, solução injetável e creme dermatológico contendo gentamicina, equivalente aos resultados obtidos para os delineamentos 2 x 2 e 5 x 1. Portanto, não há necessidade de correções dos resultados obtidos pelos métodos estudados.
- O delineamento 3 x 1 mostrou precisão adequada para a avaliação de matéria-prima de sulfato de gentamicina, solução injetável e creme dermatológico contendo gentamicina, não apresentando diferença significativo em relação aos delineamentos 2 x 2 e 5 x 1. Os valores de desvio padrão relativo para os delineamentos 2 x 2, 5 x 1 e 3 x 1 foram, respectivamente, 6,8%, 7,1% e 6,4%.
- A avaliação estatística mostrou que não há associação entre a precisão do método e a concentração de gentamicina presente nas amostras avaliadas, comprovando a homocedasticidade do método.
- O método apresentou regressão significativa e linearidade satisfatória na faixa estudada de 1,0 µg/mL a 4,0 µg/mL. A faixa ou intervalo de aplicação do método foi de 70% a 130% da concentração teórica.

- Os delineamentos estudados mostraram-se equivalentes para a avaliação matéria-prima de sulfato de gentamicina, solução injetável e creme dermatológico contendo gentamicina.
- As diferenças encontradas entre os resultados obtidos nas diferentes condições (delineamentos, tipos de amostras, níveis de concentração e lotes de preparo) foram desprezíveis quando comparadas com a faixa de aplicação dos métodos.
- O ensaio 2 x 2 é indicado em situações de pesquisa e desenvolvimento, uma vez que fornece indicações quanto significância da regressão e paralelismo entre as curva de padrão e amostra, permitindo avaliação da validade do teste.
- O delineamento 5 x 1 apresentou-se apropriado para a análise de rotina em laboratório de controle de qualidade, permitindo a avaliação simultânea de grande número de amostras. No entanto, a necessidade de correção torna os cálculos complicados e aumentando a probabilidade de enganos nos cálculos.
- O ensaio 3 x 1 mostrou-se interessante para a análise de rotina em laboratório de controle de qualidade, destacando-se vantagens quanto a simplicidade de execução do teste e cálculo da potência e baixo custo e material envolvido.
- O delineamento proposto pode ser aplicado para dosagem de outros antibióticos, apenas ressaltando-se a necessidade da avaliação da significância da regressão e linearidade da curva empregada.

**REFERÊNCIA**

**BIBLIOGRÁFICA**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. ABRAHAM, E.P., GARDNER, A.D., CHAIN, E., FLETCHER, C.M., HEATLEY N.G., JENNINGS, M.A., FLOREY, H.W. Further observations on penicillin. *Lancet*, v. 241, n. 6155, p. 177-186, 1941.
3. ADAMS, E., ROELANTS, W., DE PAEPE, R., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. Analysis of gentamicin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 18, p. 689-698, 1998.
4. ANDERSON, B. Improved susceptibility disk assay method employing an agar overlay technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 14, n. 5, p. 761-764, 1978.
5. ARRET, B., JOHNSON, D.P., KIRSHBAUM, A. Outline of details for microbiological assays of antibiotics: Second revision. *J. Pharm. Sci.*, v. 60, n. 11, p. 1689-1694, 1971.
6. ASHESHOV, I.N., STRELITZ, F.A. A simplified method for assay of antibiotics. *Science*, v. 101, n. 2633, p. 621-622, 1945.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official methods of analysis*. 10.ed. Washington, 1965. p. 818-815, 823-824.
8. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official methods of analysis*. 11.ed. Washington, 1970. p. 752-763.
9. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official methods of analysis*. 12.ed. Washington, 1975. p. 803-814.

10. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official methods of analysis*. 13.ed. Washington, 1980. p. 713-719.
11. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official methods of analysis*. 14.ed. Arlington, 1984. p. 813-815, 823-824.
12. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official methods of analysis*. 15.ed. Arlington, 1990. p. 115-129.
13. BALANDRANO, D., VALLE, R. Induced resistance in *Staphylococcus aureus* for assay of antibiotic mixtures in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Sci.*, v. 69, n. 4, p. 458-459, 1980
14. BEADLE, G.W., MITCHELL, H.K., BONNER, D. Improvements in the cylinder-plate method for penicillin assay. *J. Bacteriol.*, v. 49, p. 101-104, 1945.
15. BEER, E.J., SHERWOOD, M.B. The paper-disk agar plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bacteriol.*, v. 50, p. 459-467, 1945.
16. BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. 5.ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. p. 1-35, 117-263.
17. BERRIDGE, J., BARRET, J. A rapid turbidimetric method for the assay of antibiotics. *Nature*, v. 167, n. 448, 1951.
18. BERRIDGE, N.J., BARRET, J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, v. 6, p. 14-20, 1952.
19. BLISS, C.I. A revised cylinder-plate assay for penicillin. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v. 35, p. 6-12, 1945.
20. BLISS, C.I. Relative potency as applied to the assay of penicillin. *Science*, v. 100, n. 2608, p. 578, 1944.

21. 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.
22. BOWMAN, F.W. The organisms for antibiotic microbiological assays. *Antibiot. Chemother.*, v. 7, n. 12, p. 639-640, 1957.
23. BRADY, M.S., KATZ, S.E. Factors influencing optimization of diffusion assays for antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 73, n. 2, p. 202-205, 1990.
24. BRADY, M.S., KATZ, S.E. Simplified plate diffusion system for microbial assays of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 70, n. 4, p. 641-646, 1987.
25. 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.
26. BREIER, A.R., GARCIA, C.V., OPPE, T.P., STEPPE, M., SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 29, p. 957-961, 2002.
27. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1948. p. 816-818.
28. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1953. p. 791-797.
29. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1958. p. 909-916.
30. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1963. p. 516-517, 1097-1105.
31. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1968. p. 643-646, 1312-1318.



32. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1973. p. 315-316, A102-A104.
33. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1980. v. 1, p. 203-204, 301, A122-A126 .
34. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1988. v.2, p. 259-260, 385-386.
35. BROWNLEE, K.A., DELVES, C.S., DORMAN, M., GREEN, C.A., GREENFELL, E., JOHNSON, J.D.A., SMITH, N. The biological assay of streptomycin by a modified cylinder plate method. *J. Gen. Microbiol.*, v. 2, p. 40-53, 1948.
36. CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003. p. 19-105, 153-164.
37. CAMPOS, L.M.M., SCHAPOVAL, E.E.S. Controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo gentamicina. *An. Farm. Quím. S. Paulo*, v. 22 (1-2), p. 27-33, 1982.
38. CANELA, R., PALACIN, C., COLOME, J. Valoración microbiológica de asociaciones de antibióticos. *Circ. Farm.*, v. 29, p. 115-119, 1971.
39. CARDOSO, S.G.; SCHAPOVAL, E.S.S. Microbiological assay for terbinafine hydrochloride in tablets and creams. *Intern. J. Pharmaceut.*, v.203, p.109-113, 2000.
40. CAULCUTT, R., BODDY, R. Statistics for analytical chemists. London: Chapman & Hall, 1983. 253p.
41. CHAIN, E., FLOREY, H.W., GARDNER, A.D., HEATLEY, N.G., JENNINGS, M.A., ORREWING, J., SAUNDERS, N.G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, v. 239, n. 6104, p. 226-228, 1940.

42. CLAROT, I., CHAIMBAULT, P. HASDENTEUFEL, F., NETTER, P., NICOLAS, A.  
Determination of gentamycin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1031, p. 281-287, 2004.
43. CODE of federal regulation. Food and Drugs 1985. Part. 300-449, p. 285-302, 546-586.
44. CODE of federal regulation. Food and Drugs 1992. Part. 300-449, p. 285-302, 546-586.
45. COOPER, K.E. The theory of antibiotics inhibition zones. In: KAVANAGH, F.,ed. *Analytical microbiology*. New York: Academic Press, 1963. v. 1, p. 1-83.
46. COOPER, K.E., GILLESPIE, W.A. The influence of temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. *J. Gen. Microbiol.*, v. 7, n. 1-2, p. 1-7, 1952.
47. COOPER, K.E., LINTON, A.H. The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assay. *J. Gen. Microbiol.*, v. 7, n. 1-2, p. 8-17,1952.
48. COOPER, K.E., WOODMAN, D. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 58, p. 75-84, 1946.
49. DART, R.K. *Microbiology for the analytical chemist*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1966. p.133-149.
50. DAVIS, W.W., McGUIRE, J.M. Some new procedures and instruments useful for microbiological antibiotic testing by diffusion methods. II. An automatic delivery pipette for use with porous disks. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v. 38, p. 462-464, 1949.

51. DAVIS, W.W., McGUIRE, J.M., PARKE, T.V. Some new procedures and instruments useful for microbiological antibiotic testing by diffusion methods. III. The use of prepared tables for converting zone diameters to potencies. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v. 38, p. 464-465, 1949.
52. DAVIS, W.W., McGUIRE, J.M., PARKE, T.V. Some new procedures and instruments useful for microbiological antibiotic testing by diffusion methods. I. A new zone Reader. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v. 38, p. 464-465, 1949.
53. DESVIGNES, A. Les possibilités de l'analyse par voie microbiologique *Mises Point. Chim. Anal. Pure Appl., Anal. Bromatol.*, v. 8, p. 31-56, 1960.
54. DEUTSCHBERGER, J, KIRSHBAUM, A. Simplified equations for fitting least square lines to data. *Antibiot. Chemother.*, v. 9, p. 752-754, 1959.
55. DUFRENOY, J. Les méthodes auxanographiques et leur applications au dosage des antibiotiques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 22, n. 5-6, p. 449-479, 1947.
56. EPSTEIN, J.A., FOLEY, E.J., PERRINE, I., LEE, S.W. Convenient assay method for penicillin and similar substances. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 29, n. 3, p. 319-320, 1944.
57. EUROPEAN pharmacopoeia 2.ed., Paris: Maisonneuve, 1980. p. V.2.2.1., VIII.4 .
58. EUROPEAN pharmacopoeia, Paris: Maisonneuve, 1971. p. 308-310, 431-439.
59. FAINE, S., KNIGHT, D.C. Rapid microbiological assay of antibiotic in blood and other body fluids. *Lancet*, v. 2, n. 7564, p. 375-378, 1968.
60. FALK, C.R. Adaptation of antibiotic assay methods for routine use. *Am. J. Public Health*, v. 43, p. 419-425, 1953.
61. FARMACOPÉIA brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.

62. FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, p. V.5.2.17-V.5.2.17-15.
63. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. P. 789, 996-1002.
64. FIELDING, J. A simple method of estimating penicillin and other bacteriostatics. *Br. Med. J.*, p. 136-137, 1947.
65. FINN, R.K. Theory of agar diffusion methods for bioassay. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 6, p. 975-977, 1959.
66. FLEMING, A. Estimation of penicillin in serum use of glucose, phenol red, and serum water. *Lancet*, v. 252, n. 6448, p. 401-402, 1947.
67. FLEMING, A. In vitro tests of penicillin potency. *Lancet*, v. 242, n. 6199, p. 732-733, 1942.
68. FLEMING, A. Micromethods of estimating penicillin in blood serum. *Lancet*, v. 247, n. 6324, p. 620-621, 1944.
69. FLEMING, A. On the antibacterial action of culture a *Penicilium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.*, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.
70. FOGLESONG, M.A., KAVANAGH, F., DIETZ, V. Possibility for error in FDA diffusion assays. *J. Pharm. Sci.*, v. 68, n. 6, p. 797-798, 1979.
71. 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.
72. FOSTER, J.W., WOODRUFF, H.B. Improvements in the cup assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, v. 148, p. 723, 1943.

73. FOSTER, J.W., WOODRUFF, H.B. Microbiological aspects of penicillin. I. Methods of assay. *J. Bacteriol.*, v. 46, p. 187-202, 1943.
74. FOSTER, W.J. Quantitative estimation of penicillin. *J. Biol. Chem.*, v. 144, p. 285-286, 1942.
75. FREEMAN, K., JOHNSON, D.P., GARTH, M.A. Assuring reliable performance of antibiotic assay media. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 60, n.6, p. 1261-1265, 1977.
76. FRIEDMAN, L., KRAEMER, E.O. The structure of gelatin gels from studies of diffusion. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 52, n. 4, p. 1295-1304, 1930.
77. FRIEDMAN, S., KIRSHBAUM, R. The use of resistant organisms for the assay of antibiotic mixtures in preparations and body fluids. *Antibiot. Chemother.*, v. 4, p. 1216-1221, 1954.
78. FRUTOS, P., TORRADO, S., PEREZ-LORENZO, M.E., FRUTOS, G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 21, p. 1149-1159, 2000.
79. FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 678, 1998.
80. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. *Listagem de bactérias de referência em controle de qualidade*. Rio de Janeiro, 1988.
81. GAVIN, J.J. Analytical microbiology I. The test organism. *Appl. Microbiol.*, v. 4, p. 323-331, 1956.
82. GAVIN, J.J. Analytical microbiology II. The diffusion methods. *Appl. Microbiol.*, v. 5, p. 25-33, 1957.

83. GAVIN, J.J. Analytical microbiology III. Turbidimetric methods. *Appl. Microbiol.*, v. 5, p. 235-243, 1957.
84. GOYAN, F.M., DUFRENOY, J., STRAIT, L.A., PRATT, R. A three-hour "Physical Development" cup-plate assay for penicillin. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v. 36, n. 3, p. 65-68, 1947 .
85. GRAHAM, A.E., SPEICHER, E., WILLIAMSON, B. Analysis of gentamicin sulfate and a study of its degradation in dextrose solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 15, p. 537-543, 1997.
86. HARRIS, D.A. RUGER, M.L. Microbiological aspects of new antibiotic screening. I. A plug test procedure. *Antibiot. Chemother.*, v. 3, n. 3, p. 265-270, 1953.
87. HARRIS, D.A. Use of microorganisms as analytical tools. *Anal. Chem.*, v. 27, p. 1690-1694, 1955.
88. HAYES, W. The effect of agar depth in the plate method for the assay of penicillin. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 57, p. 457-466, 1945.
89. HEATLEY, N.G. Methods of penicillin assay their purpose, scope and a validity. Biological methods for penicillin assay. An introductory survey. *Analyst*, v. 73, p. 244-250, 1948 .
90. HEATLEY, N.G. The assay of antibiotics. In: FLOREY, H.W., CHAIN, E., HEALTLEY, N.G., JENNINGS, M.A., SANDERS, A.G., ABRAHAM, M.A., ABRAHAM, E.P., FLOREY, M.E., eds. *Antibiotics*, London: Oxford University Press, 1949. v. 1, p. 110-199.
91. HENDLIN, D. Analytical microbiology. *Anal. Chem.*, v. 31, n. 6, p. 970-971, 1959.

92. HEWITT, W. Curvature of response lines in microbiological assays. *The Pharmaceutical Microbiology Interest Group*. p.10-11, 2000.
93. HEWITT, W. *Microbiological assay*. Orlando: Academic Press, 1977. p. 17-68, 136-150, 214-242.
94. 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.
95. HUGO, W.B., RUSSELL, A.D. *Pharmaceutical microbiology*. 3.ed. Oxford, Blackwell, 1983.
96. HUMPHREY, J.H., LIGHTBOWN, J.W. A general theory for plate assay of antibiotics with some practical applications. *J. Gen. Microbiol.*, v. 7, n. 1-2, p. 129-143, 1952 .
97. INTERNATIONAL pharmacopoeia. 3.ed. Geneva: World Health Organization, 1988. v. 3, p. 211-213.
98. INTERNATIONAL pharmacopoeia. 3.ed., Geneva: World Health Organization, 1979. v. 1, p. 145-151.
99. JOSLYN, D.A. Penicillin assay. Outline of four-hour turbidimetric method. *Science*, v. 99, p. 21-22, 1944.
100. JOSLYN, D.A., GALBRAITH, M. A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *J. Bacteriol.*, v. 59, p. 711-716, 1950.
101. KAALE, E., LEONARD, S., VAN SCHEPDAEL, A., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. Capillary electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. *J. Chromatogr. A*, v. 895, p. 67-79, 2000.

102. KABAY, A. Rapid quantitative microbiological assay of antibiotic and chemical preservative of a nonantibiotic nature. *Appl. Microbiol.*, v. 22, n. 5, p. 752-755, 1971.
103. KANTOROWICZ, O. An antibiotic assay tray. *J. Gen. Microbiol.*, v. 5, p. 357-359, 1951.
104. KAVANAGH, F. Automated system for analytical microbiology V. Calibrations lines for antibiotics. *J. Pharm. Sci.*, v. 64, n. 5, p. 844-850, 1975.
105. KAVANAGH, F. Microbiological diffusion assay II: Design and Applications. *J. Pharm. Sci.*, v. 64, n. 7, p. 1224-1229, 1975.
106. KAVANAGH, F. Microbiological equations diffusion assay. I. Microbiological diffusion Cooper equation. *J. Pharm. Sci.*, v. 63, n. 9, p. 1459-1463, 1974.
107. KAVANAGH, F., RAGHEB, H.S. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: Considerations for Assuring Accuracy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 62, n. 4, p. 943-950, 1979.
108. KIRSHBAUM, A., ARRET, B. Outline of details for assaying the commonly used antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, v. 9, p. 613-617, 1959.
109. KNUDSEN, L.F. Penicillin assay. *Science*, v. 101, n. 2611, p. 46-48, 1945.
110. KNUDSEN, L.F. The use of statistics in biological experimentation and assay. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, v. 28, p. 806-813, 1945.
111. KNUDSEN, L.F., RANDALL, W.A. Penicillin assay and its control chart analysis. *J. Bacteriol.*, v. 50, p. 187-200, 1945.
112. KONDO, F., ROSTAMIBASHIMAN, M. An improved method for detection of aminoglycoside antibiotics by bacteriological screening. *Miyazaki Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, v. 36, n. 1, p. 77-83, 1989.



113. 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.
114. LEES, K.A. TOOTILL, J.P.R. Microbiological assay on large plates. Part III. High throughput, low precision assays. *Analyst*, v. 80, p. 531-535, 1955.
115. LEES, K.A., TOOTILL, J.P.R. Microbiological assay on large plates. Part I. General considerations with particular reference to routine assay. *Analyst*, v. 80, p. 95-110, 1955.
116. LEES, K.A., TOOTILL, J.P.R. Microbiological assay on large plates. Part II. Precise assay. *Analyst*, v. 80, p. 110-123, 1955.
117. LIGHTBOWN, J.W., BROADBRIDGE, RA., ISAACSON, P. Diffusion assay by an automated procedure. *Analyst*, v. 104, p. 201-207, 1979.
118. LOO, Y.H., SKELL, P.S., THORNBERRY, H.H., EHRLICH, J., MCGUIRE, J.M., SAVAGE, G.M., SYLVESTER, J.C. Assay of streptomycin by the paper-disc plate method. *J. Bacteriol.*, v. 50, p. 701-709, 1945.
119. 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.
120. LUIZA, V. L.; CASTRO, C. G. S. O.; NUNES, J. M. Aquisição de medicamentos no setor público: o binômio qualidade – custo. *Cad. Saúde Pública*. Rio de Janeiro. v.15, n.4, p. 769-76, 1999.
121. MARQUES, M.R.C., HACKMANN, E.R.M., SAITO, T. Doseamento microbiológico de neomicina: influência do volume de meio de cultura. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, v. 24, v. 1, p. 12-18, 1988.

122. MARTINDALE the extra pharmacopoeia. 29.ed. London: Pharmaceutical Press, 1989. p. 105, 234, 268.
123. MIYAMURA, S. A method for calculating the potency of antibiotics from the two doses plate assay technic. *Antibiot. Chemother.*, v. 6, p. 658-659, 1956.
124. MAY, J.R., VOUREKA, A.E., FLEMING, A. Some problems in the titration of streptomycin. *Br. Med. J.*, v. 1, p. 627-630, 1947.
125. McMAHAN, J.R. A new automated system for microbiological assays. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, v. 130, n. 2, p. 680-685, 1965.
126. McMAHAN, J.R. An improved short time turbidimetric assay for penicillin. *J. Biol. Chem.*, v. 153, p. 249-158, 1944.
127. MENDEZ, A.S.L.; WEISHEMER, V.; OPPE, T.P.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.S.S. Microbiological assay for determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.37, p.649-653, 2005.
128. MERCK index. 11 ed. Rahway, 1989. p 6.367.
129. MEYER, J., SARTORY, R., MALGRAS, I., TOUILLIER, J. Animal and plant control tests for antibiotics. *Bull. Assoc. Diplômes Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, n. 46, p. 30-42, 1952. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v. 48, n.abstr. 2990g, 1954.
130. MITCHISON, D.A., SPICER, C.C. A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. *J. Gen. Microbiol.*, v. 3, p. 184-203, 1949.
131. MYNHEER, D.E., HEDDELL, G.W., WEBB, F.W. Use of microtitre plate technology in the microbiological assay of antibiotics. *Anal. Proc.*, V. 24, n. 6, p. 192-194, 1987.

132. NATIONAL formulary. 10.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1955. p. 423-424.
133. NATIONAL formulary. 13.ed. Washington: American Pharmaceutical Association. 1970. p. 473-475.
134. NATIONAL formulary. 9.ed. Easton: Mack 1950. p. 745-748.
135. NAVEH, A., POTASMAN, I., BASSAM, H., ULITZUR, S. A new rapid and sensitive bioluminescence assay for antibiotics that inhibit protein synthesis: *J. Appl. Bacteriol.*, v. 56, n. 3, p. 457-463, 1984.
136. NERI, G., RACCHELLI, L., FAVILLI, F. Valutazione statistica di un metodo analitico ufficiale – dosaggio microbiologico per “punto contro curva standard”. *Il Fàrmaco*, v. 29, p.205-212, 1974.
137. NOONE, P., PATTISON, J.R., SAMSON, D. Simple, rapid method for assay of aminoglycoside antibiotics. *Lancet*, v. 2, n. 7714, p. 16-19, 1971.
138. ODEN, E.M.; WAGMAN, G.H.; WEINSTEIN, M.J. Gentamycin. In: KAVANAGH, F., ed. *Analytical Microbiology*. New York: Academic Press, 1972. v. 2, p. 271-284.
139. OWENS, J.D., WACHER-VIVEROS, M.C. Selection of pH buffers for use in conductimetric microbiological assays. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 60, p. 395-400, 1986.
140. PATRICK, W.C., CRAIG, G.H., BACHMAN, M.C. Diameter of inhibition zones correlated with tube sensitivities using six antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, v. 1, n. 2, p. 133-137, 1951.
141. PHARMACEUTICAL codex. 11.ed. London: Pharmaceutical Press, 1979. p. 586-587.

142. PHARMACOPEIA of the United States of America. 15.ed. Easton: Mack, 1955. p. 452-453, 848-861 .
143. PHARMACOPEIA of the United States of America. 16.ed. Easton: Mack, 1960. p. 448-450, 863-868.
144. PICK, J., OLSON, L.L., ELLIS, W.Y., LIM, P. Development and validation of a method to extract and quantitate paromomycin and gentamicin from an Aquafilic® cream formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 16, p. 131-137, 1997.
145. PINTO, T.J.A., FERRARINI, M., GATTI, R.M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. *Farm. & Quím.*, v. 36, n. 1, p. 26-36, 2003
146. 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. p. 7-56, 261-287.
147. PITTON, J.S. Dosage microbiologique des antibiotiques et analyse statistique des resultats. I. Elaboration et justification de la methode. *Pharm. Acta Helv.*, v. 41, n. 11, p. 622-640, 1966.
148. 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.
149. PLATT, T.B., WEISBLATT, H., GUEVREKIAN, L. The chrometric biassay: a microbiological assay for antibiotics based on continuous dilution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 153, n. 2, p. 571-581, 1968.
150. RAGHEB, H.S. Effect of volume of solution per cylinder on estimation of antibiotic potency in diffusion assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 71, n. 5, p. 1071-1074, 1988.

151. RAKE, G., JONES, H. A rapid method for estimation of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 54, p. 189-190, 1943.
152. 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.
153. 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.
154. RAPER, K.B., ALEXANDER, D.F., COZBILL, R.D. Penicillin. II Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. *J. Bacteriol.*, v. 48, p. 639-659, 1944.
155. REEVES, M.D., SCHMIDT, W.H. Penicillin. IV. A device for placing cylinders on assay plates. *J. Bacteriol.*, v. 49, n. 4, p. 395-400, 1945.
156. REID, H.C., BREWER, J.H. The reductase method for the determination of penicillin concentration in body fluids. *J. Bacteriol.*, v. 52, p. 251-254.
157. REILLY, H.C., SOBERS, H.O. The use of plain agar as a base large in the paper disk assay. *Antibiot. Chemother.*, v. 2, n. 9, p. 469-471, 1952.
158. REMINGTON'S pharmaceutical sciences. 18.ed. Easton: Mack, 1970. p. 1201-1203.
159. RIPPERE, R.A. Some principles of microbiological turbidimetric assay of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 62, n. 4, p. 951-956, 1979.
160. SABATH, L.D., CASEY, J.I., RUCH, P.A., STUMPF, L.L, FINLAND, M. Rapid microsasay of gentamicin, kamamycin, neomycin., streptomycin, and vancomycin in serum or plasma. *J. Lab. Chem. Med.*, v. 78, n. 3, p. 457-463, 1971.

161. SCHIMIDT, W.H., MOYER, A.J. Penicillin I. Methods of assay. *J. Bacteriol.*, v. 47, n. 2, p. 199-208, 1944.
162. SHERWOOD, M.B., FALCO, E.A., DeBEER, E.J. A rapid, quantitative method for the determination of penicillin. *Science*, v.99, n. 2569, p. 247-248, 1944.
163. SILVEIRA, L.E., SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 27, p. 91-96, 2002.
164. SIMPSON, D.L., KOBOS, R.K. Microbiological assay of antibiotics based on inhibition of ammonia production monitored with an ammonia electrode. *Anal. Chim. Acta*, v. 164, p. 273-277, 1984.
165. SIMPSON, D.L., KOBOS, R.K. Potenciometric microbiological assay of gentamicin, streptomycin, and neomycin with a carbon dioxide gas-sensing electrode. *Anal. Chem.*, v. 55, p. 1974-1977, 1983.
166. SMITH, R.M., JOSLYN, D.A., GRUHZIT, O.M., McLEAN Jr, I.W., PENNER, M.A., EHRLICH, J. Chloromycetin: biological studies. *J. Bacteriol.*, v. 55, p. 425-448, 1948.
167. SNELL, N.S., LEWIS, J.C. Errors caused by stainless - steel cylinders in plate bioassays. *Antibiot. Chemother.*, v. 9 n. 10, p. 609-612, 1959.
168. SOUZA, M.J., BITTENCOURT, C.F., SOUZA FILHO, P.S. Microbiological assay for enrofloxacin injection. *Intern. J. Pharm.*, v. 271, p. 287-291, 2004.
169. STAUB, I., SCHAPOVAL, E.E.S., BERGOLD, A.M. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. *Intern. J. Pharm.*, v. 292, p. 195-199, 2005.
170. STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J. Chromatogr. B*, v. 747, p. 69-93, 2000.

171. STEAD, D.A., RICHARDS, R.M.E. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 675, p. 295-302, 1996.
172. STEPPE, M., PRADO, M.S.A., TAVARES, M.F.M., PINTO, T.J.A., KEDOR-HACKMANN, E.R.M., SANTORO, M.I.R.M. Comparison of micellar electrokinetic chromatography, liquid chromatography, and microbiologic assay for analysis of cephalexin in oral suspensions. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 86, n. 4, p. 707-713, 2003.
173. SWARTZ, M.; KRULL, IRA. Validation of Bionalytical Methods – Highlights of FDA’s Guidance. *Validation Viewpoint*. v.21, n.2, p.136-142, 2003.
174. TARCZA, E., GARTH, M.A. Assay and statistical analyses for antibiotic standards. *J. Pharm. Sci.*, v. 67, n. 8, p. 1050-1053, 1978.
175. THOMAS, N., THOMPSON, C.W. Investigation into the problem of assaying mixed antibiotics. *Anal. Proc.*, v. 27, n. 7, p. 176-178, 1990.
176. THOMPSON, M. Regression methods in the comparison of accuracy. *Analyst*, v. 107, p. 1169-1180, 1982.
177. TURCINOV, T., PEPELJNJAK, S. Azithromycin potency determination: optimal conditions for microbiological diffusion method assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 17, p. 903-910, 1998.
178. UNITED States pharmacopeia. 17.ed. Easton: Mack, 1965. p. 405-406.
179. UNITED States pharmacopeia. 17.ed. Easton: Mack, 1965. p. 832-840.
180. UNITED States pharmacopeia. 18.ed. Easton.: Mack, 1970. P.441-443, 857-864.

181. UNITED States pharmacopeia. 19.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1975. p. 337-338, 595-600.
182. UNITED States pharmacopeia. 20 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 1980. p. 544-546, 882-888.
183. UNITED States pharmacopeia. 21 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 1985. p. 712-729, 1160-1165.
184. UNITED States pharmacopeia. 22 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 1990. p. 920-942, 1488-1493.
185. UNITED States pharmacopeia. 23 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 1995. p. 1690-1696.
186. UNITED States pharmacopeia. 24 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2000. p. 1823-1829.
187. UNITED States pharmacopeia. 25 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2002. p. 1883-1889.
188. UNITED States pharmacopeia. 26 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2003. p. 2016-2022.
189. UNITED States pharmacopeia. 27 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2004. p. 2163-2168.
190. UNITED States pharmacopeia. 28 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2005. p. 2256-2263.
191. UNITED States pharmacopeia. 29 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2006. p. 2513-2520.



192. VALENTINE, F.C.O., JOHNS, R.G.S. A suggested method for the titration of certain antibiotics. *Lancet*, v. 257, p. 1033-1034, 1949.
193. VALIDATION analytical procedures In: Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities, 1996.
194. VERONESE, M., MARCA, G. Separazione e dosaggio microbiologico di polimixina, neomicina e di un chemioterapico nitrofurano. *Farmaco Ed. Prat.*, v. 25, n. 7, p. 428-434, 1970.
195. VINCENT, J.G., VINCENT, H.W. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 55, n. 1, p. 162-164, 1944.
196. VITAL, T.M., REIS, C., GARCÍA-ZAPATA, M.T.A., CUNHA, L.C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *Rev. Bras. C. Farm.*, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 219-227, 2004.
197. WANG, H.Y., LIU, L.D., SUN, Y., MA, L., LI, J. Determination of gentamycin by synchronous derivative fluorimetry. *Talanta*, v. 52, p. 201-209, 2000.
198. WARDELL, W.M., YULE, A.G., BALLARD, L., FORSYTH, A.J. Modification of the pH method to enable rapid microbiological assay of wide range of antibiotics. *Med. J. Aust.*, v. 1, n. 7, p. 383-386, 1971.
199. WELCH, H., RANDALL, W.A., KUNDSSEN, J. Methods of testing antibiotic substances and limitations involved. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, p. 102-113, 1946.
200. WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, p. 624-632, 1999.

201. WOOLFREY, B.F., RAMADEI, W.A., QUALL, C. Petri dish concavity – a potencial source of error in antibiotic assay and agar diffusion antibiotic susceptibility tests. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 71, n. 4, p. 433-436, 1979.
202. WU, X., GUAN, Y., WEI, G., WANG, H.Y. Theoretical equations for agar diffusion bioassay. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 29, n. 8, p. 1731-1734, 1990.
203. YAMADA, Y., SASAKI, J., MATSUZAKI, T., HIIKI, K. Influence of medium and diluent pH and diffusion time on antibiotic bioassay. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, , v. 6, n. 1, p.23-33, 1981.
204. YAMAMOTO, C.H. *Dosagem microbiológica de neomicina por difusão em Agar. Redução do tempo de análise pela aplicação do cloreto de trifeniltetrazolio*. São Paulo, 1994, 169p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
205. YAMAMOTO, C.H., PINTO, T.J.A. Rapid determination of neomycin by a microbiological agar diffusion assay using triphenyltetrazolium chloride. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 79, n. 2, p. 434-440, 1996.
206. 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.