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 neomicina e bacitracina
– Desenvolvimento e validação de método rápido em
microplacas

Fabiane Lacerda Francisco

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo - 2015

Fabiane Lacerda Francisco

**Doseamento microbiológico de neomicina e bacitracina –
Desenvolvimento e validação de método rápido em microplacas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos.

Área de Concentração: Produção e Controle Farmacêuticos

Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo – 2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Francisco, Fabiane Lacerda

F818d Doseamento microbiológico de neomicina e bacitracina -
desenvolvimento e validação de método rápido em microplacas /
Fabiane Lacerda Francisco. -- São Paulo, 2015.
97p.

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

1. Doseamento microbiológico : Farmacologia 2. Antibióticos
3. Controle biológico de qualidade de fármacos I. T. II. Lourenço,
Felipe Rebello, orientador.

615.19015 CDD

Fabiane Lacerda Francisco

**Doseamento microbiológico de neomicina e bacitracina –
Desenvolvimento e validação de método rápido em microplacas**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, ____ de ____ de ____.

À **Deus**, que está sempre presente em minha vida
guiando os meus caminhos.

À **minha família**, por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar, iluminar e proteger minha vida.

Aos meus pais, Aurea e Sergio, por sempre acreditarem em mim, por todo amor e dedicação, e pelo apoio em todos os momentos.

À professora Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pela oportunidade de estar na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao meu orientador, professor Felipe Rebello Lourenço, por toda a atenção e apoio para a realização deste trabalho, e por toda a paciência e dedicação para me ensinar e me orientar.

Aos colegas e professores do laboratório, pelos ótimos momentos que vivenciamos no laboratório, e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FURP- Fundação para o Remédio Popular, pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

FRANCISCO, F.L. **Doseamento microbiológico de neomicina e bacitracina – Desenvolvimento e validação de método rápido em microplacas.** 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os ensaios microbiológicos são utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana desde a descoberta do uso dos antibióticos. Apesar dos ensaios microbiológicos serem amplamente empregados para determinação da potência de antibióticos em formas farmacêuticas, uma vez que fornecem a medida da atividade biológica, apresentam limitações quanto a baixa reprodutibilidade e tempo de análise. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e validar ensaio colorimétrico rápido em microplaca para determinar a potência da neomicina e bacitracina em produtos farmacêuticos. Metodologias de análise fatorial e análise de superfície de resposta foram utilizadas no desenvolvimento e otimização da escolha do microrganismo, da composição do meio de cultura, da proporção de inóculo, e das concentrações de cloreto de trifeniltetrazólio e dos antibióticos. Os métodos otimizados foram validados pela avaliação da linearidade, precisão, exatidão e robustez. Análise estatística mostrou equivalência entre o método de difusão em ágar e o método colorimétrico rápido em microplaca para ambos antibióticos. Além disso, o ensaio em microplaca apresentou vantagens em relação à reprodutibilidade, sensibilidade, tempo de incubação e quantidades necessárias de meio de cultura e soluções para ambos os antibióticos.

Palavras-chave: Doseamento microbiológico, delineamento fatorial, análise de superfície de resposta, sais de tetrazólio, Neomicina, Bacitracina.

ABSTRACT

FRANCISCO, F.L. **Microbiological assay of neomycin and bacitracin – Development and validation of microplate rapid method.** 2014. 97 p. Dissertation (Master's) – Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Microbiological assays have been used to evaluate antimicrobial activity since the discovery of the first antibiotics. Despite of microbiological assays have been widely employed to determine antibiotic potency of pharmaceutical dosage forms, once they provide a measure of biological activity, they have limitations regarding the low reproducibility and increased time of analysis. The aim of this work is to develop, optimize and validate a rapid colorimetric microplate bioassay for the potency of neomycin and bacitracin in pharmaceutical drug products. Factorial and response surface methodologies were used in the development and optimization of the choice of microorganism, culture medium composition, amount of inoculum, triphenyltetrazolium chloride (TTC) concentration and antibiotic concentration. The optimized bioassays methods were validated by the assessment of linearity, precision, accuracy, and robustness. Statistical analysis showed equivalency between agar diffusion microbiological assays and rapid colorimetric microplate bioassays. In addition, microplate bioassay had advantages concerning the reproducibility, sensitivity of response, time of incubation, and amount of culture medium and solutions required.

Keywords: Microbiological assay; Factorial design; Response surface methodology; Tetrazolium salt, Neomycin, Bacitracin.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA	23
1. Doseamento microbiológico de antibióticos	25
2. Ensaio turbidimétrico para análise de antibióticos	26
2.1 Influência da composição do meio de cultura	27
2.2 Influência do microrganismo-teste	27
2.3 Influência do tempo e temperatura de incubação	28
2.4 Influência da concentração de cloreto de trifeniltetrazólio	29
2.5 Influência da concentração de antibiótico	30
3. Sulfato de neomicina	30
4. Bacitracina Zincica	33
5. Métodos rápidos	35
6. Análises estatísticas	35
OBJETIVOS	37

PARTE I – Desenvolvimento e validação de ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplacas para avaliação de sulfato de neomicina em formas farmacêuticas

1. Introdução	43
2. Materiais e métodos	46
2.1 Substância químicas	46
2.2 Equipamentos	46
2.3 Soluções	46
2.4 Desenvolvimento e otimização do ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca	47
2.5 Validação do ensaio	51
2.6 Comparação dos ensaios	52
3. Resultados e discussão	53
3.1 Desenvolvimento e otimização do ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca	53
3.2 Validação do ensaio	59
3.3 Comparação dos ensaios	60

4	Conclusão	62
---	-----------	----

PARTE II – Desenvolvimento e validação de ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplacas para avaliação de bacitracina em formas farmacêuticas

		63
1.	Introdução	65
2.	Materiais e métodos	68
2.1	Substâncias químicas e soluções	68
2.2	Equipamentos	69
2.3	Desenvolvimento e otimização do ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca	69
2.4	Validação do ensaio	72
2.5	Comparação dos ensaios	73
3.	Resultados e discussão	74
3.1	Desenvolvimento e otimização do ensaio	74
3.2	Validação do método	82
3.3	Comparação dos ensaios	83
4.	Conclusão	84

CONSIDERAÇÕES FINAIS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANEXOS

Currículo Lattes

Trabalhos publicados

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Antibióticos são caracterizados por substâncias antibacterianas produzidas por microrganismos. Entre todos os produtos farmacêuticos, os antibióticos são os mais comumente prescritos e também os mais frequentemente falsificados e adulterados (BRUNTON et al.; 2006; DAFALE, 2012). A industrialização dos produtos farmacêuticos vem sendo acompanhada pela evolução tecnológica do século atual, incluindo todas as etapas da produção até a obtenção do produto acabado. A confirmação da eficácia terapêutica dos antibióticos representa um aspecto de grande preocupação (PINTO et al., 2010). O doseamento microbiológico é uma metodologia que permite a análise dos antibióticos de forma simples para laboratórios de controle de qualidade quando comparada a outros métodos, além de ser exigência presente em diversas farmacopeias (FIORENTINO et al., 2013; USP, 2012 ; BP 2010; F. Bras. 2010; JP 16, 2011).

Dentre as classes de antibióticos, destacam-se os aminoglicosídeos. Os aminoglicosídeos são importantes fármacos amplamente utilizados em infecções causadas por bactérias Gram-negativas. São frequentemente encontrados em associações com outras classes de medicamentos para aumentar seu espectro de ação, como no caso da associação de neomicina com bacitracina. A bacitracina é um antibiótico polipeptídeo ativo principalmente contra bactérias Gram-positivas. Tanto a neomicina quanto a bacitracina são formadas por diversos componentes que apresentam diferentes atividades antibacterianas, o que dificulta suas quantificações em um produto farmacêutico por métodos químicos e físico-químicos.

O doseamento microbiológico é indicado em casos em que o antibiótico não pode ser caracterizado pelas propriedades físico-químicas e apresenta a vantagem de definir a atividade do antibiótico frente ao microrganismo (HEWWIT, 1977; PEDROSO & SALGADO, 2014). O ensaio de difusão em ágar é uma técnica convencional de doseamento microbiológico, porém esta técnica não fornece resultados em tempo real (LEHTINEM et al.; 2006). Métodos alternativos vêm sendo desenvolvidos para diminuir os custos e tempo necessário para a realização do ensaio, além de aumentar a sensibilidade e

solucionar possíveis limitações do método de difusão em ágar (HOLOWACHUCK, 2003).

Os métodos fotométricos de doseamento microbiológico são utilizados desde a descoberta da penicilina. O ensaio baseia-se no efeito do antibiótico sobre o crescimento do microrganismo presente em meio de cultura líquido, resultando em uma turbidez gradual que é analisada pelos valores de absorbância ou transmitância (PINTO et al., 2010; KAVANAGH, 1963). É um método simples e rápido, e apresenta como vantagens a facilidade operacional, medida objetiva da resposta, e ausência de efeitos de difusão e exatidão (PEDROSO & SALGADO, 2013; PINTO et al., 2010;).

Atualmente, os equipamentos fotométricos são dotados de sistemas computacionais, o que reduz o tempo envolvido no tratamento dos dados, pois permitem leitura e cálculo automatizados. O sistema de microplacas tem sido empregado em diversas áreas, permitindo análise de grande número de amostras de forma rápida e confiável. (BOTELHO et al., 2013; LOURENÇO & PINTO, 2011). Métodos colorimétricos empregando indicadores de viabilidade, como o cloreto de trifeniltetrazólio, vêm sendo utilizados na microbiologia para a detecção de antibióticos, possibilitando a redução do tempo de incubação necessário para o ensaio (MOHAMMADZADEH et al., 2006; YAMAMOTO & PINTO, 1996).

O desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos é elementar para a obtenção de resultados confiáveis de modo que permita a tomada de decisões rápida. Assim, o emprego de método colorimétrico com a utilização de microplacas é de grande interesse, pois além de reduzir o tempo de análise, permite o ensaio de grande número de amostras simultaneamente, com leitura e cálculo automatizados (BOTELHO et al., 2013, YAMAMOTO & PINTO, 1996)

Recentemente, o desenvolvimento de métodos analíticos vem sendo realizado utilizando-se uma metodologia de planejamento de experimentos (DoE). A análise de superfície resposta é uma das ferramentas mais utilizadas de DoE e permite estudar quais os fatores que interferem no método, e como eles irão interferir no método e em sua resposta final, permitindo o desenvolvimento e otimização do método de forma racional.

Diante do exposto, justifica-se o desenvolvimento de um ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca para a análise de neomicina e bacitracina utilizando uma abordagem racional com planejamento de experimentos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS

O doseamento microbiológico é utilizado para confirmar a eficácia terapêutica de medicamentos que não podem ser caracterizados pelas propriedades químicas ou físico-químicas, ou em situações na qual a dose ineficaz e a dose tóxica são muito próximas (PINTO et al., 2010).

O ensaio microbiológico é uma exigência de controle de qualidade para antibióticos presentes em diversas farmacopeias (USP, 2012; BP 2010; F. Bras. 2010; JP 16, 2011). Neste ensaio, a atividade do antibiótico é definida pela dose que inibe o crescimento de um microrganismo sensível ao antibiótico. O ensaio é realizado comparando-se a inibição do crescimento do microrganismo por concentrações conhecidas de um padrão de referência com a inibição por diluições da substância testada. A atividade antimicrobiana pode ser medida pelos métodos de difusão em ágar e método turbidimétrico (DART, 1996; WHO, 2013).

O método de difusão em ágar é um método no qual o microrganismo é utilizado como indicador da concentração do antibiótico (KAVANAGH, 1972; KAVANAGH & RAGHEB, 1979). O método relaciona a dose do antibiótico ensaiado com o tamanho da zona de inibição do crescimento no meio de cultura sólido inoculado (HEWWIT, 1977). O ensaio é realizado adicionando-se a substância-teste a cilindros de aço inox ou discos de papel que são colocados sobre a placa contendo o meio de cultura inoculado. As placas são então incubadas a 35°C/37°C por 18 a 24 horas (DRISCOLL et. al., 2014). Dessa forma, o método de difusão em ágar apresenta necessidade de grande tempo de ensaio, além de baixa reprodutibilidade e robustez. (HOLOWACHUCK et. al., 2003; STYPULKOWSKA, 2013).

O método turbidimétrico, utilizado desde a descoberta da penicilina, é um método fotométrico no qual é realizada a medida da inibição do crescimento de um microrganismo-teste pelo antibiótico em meio de cultura líquido (KAVANAGH, 1963). É um método simples e rápido, no qual a resposta é diretamente determinada pela concentração da substância ativa presente no meio de cultura (PEDROSO & SALGADO, 2013).

Em geral, os ensaios biológicos apresentam grande variabilidade devido à impossibilidade da definição dos reagentes biológicos, tornando necessária a

utilização de métodos estatísticos, delineamentos experimentais e análise dos resultados de forma adequada (PINTO et. al., 2010). A variabilidade intra e inter-ensaios pode prejudicar a confiabilidade do método, e as impurezas de antibióticos podem produzir erros, comprometendo a precisão do método (HANKO & ROHRER, 2007). Entretanto, apesar da alta variabilidade, sendo os ensaios microbiológicos realizados com suas condições devidamente padronizadas e controladas, estes fornecerão adequada determinação da potência, além de apresentarem vantagens como a possibilidade da verificação da perda de atividade de um antibiótico (ABDELAZIZ et. al. 2012; CAZEDEY & SALGADO, 2013; DAFALE et. al., 2012).

2. ENSAIO TURBIDIMÉTRICO PARA ANÁLISE DE ANTIBIÓTICOS

O ensaio turbidimétrico utiliza meio de cultura líquido inoculado com microrganismo sensível, em uma série de tubos com diversas concentrações do antibiótico testado. O resultado é obtido através de uma curva que relaciona as concentrações do antibiótico e a turbidez (LOURENÇO & PINTO, 2011). O princípio do teste é baseado no aumento da turbidez causada pelo crescimento microbiano no meio de cultura líquido. Portanto, mudanças no crescimento microbiano e, conseqüentemente da turbidez do meio de cultura, poderão ser mensuradas por um leitor de microplaca a uma determinada absorbância (OTHMAN et. al., 2012).

Apesar do meio de cultura líquido ser mais propenso a degradação, o método turbidimétrico se mostra mais rápido e de fácil execução quando comparado ao método de difusão em ágar (RIPERRE, 1979; CAZEDEY & SALGADO, 2013).

No ensaio turbidimétrico, o antibiótico poderá influenciar a carga microbiana final do ensaio por três diferentes mecanismos ou pela combinação deles. Esses mecanismos são: o aumento do tempo de geração, o aumento da fase lag e a morte de uma parte dos microrganismos. Baseando-se nos mecanismos ou combinação deles, obtêm-se equações que representam as influências sob o crescimento do microrganismo. (HEWITT, 1977).

Diversos fatores influenciam a resposta do ensaio turbidimétrico. Alguns destes fatores serão apresentados a seguir.

2.1 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

A composição do meio de cultura deve ser completa de forma que não interfira na resposta do microrganismo em função das diversas concentrações do antibiótico. A velocidade da resposta é afetada pela composição, pH, temperatura de incubação e aeração do meio de cultura (PINTO et al., 2010). Dessa forma, diferenças diárias no meio de cultura utilizado, assim como alterações do pH ou decomposição dos nutrientes essenciais do meio, poderão resultar em substancial variação (HEWITT, 1977).

O pH do meio de cultura é um dos fatores que interfere na faixa de crescimento do microrganismo. Nos ensaios microbiológicos, o pH do meio de cultura é ajustado visando as necessidades do microrganismo utilizado e a sensibilidade necessária para o ensaio. Adicionalmente, a atividade de antibióticos ácidos aumenta e a atividade de antibióticos básicos diminui quando o pH do meio de cultura é diminuído. Por fim, para um ensaio rápido deve-se utilizar um meio de cultura completo que permita o maior crescimento possível (KAVANAGH, 1963).

2.2 INFLUÊNCIA DO MICRORGANISMO-TESTE

O ensaio turbidimétrico é baseado na interação entre o antibiótico e o microrganismo teste (LOURENÇO & PINTO, 2011). A seleção do microrganismo-teste é interdependente da sensibilidade necessária para o ensaio, pois cada microrganismo irá produzir diferentes respostas para cada antibiótico. Dessa forma o microrganismo selecionado deverá responder adequadamente às mudanças de concentração do antibiótico (RIPERRE, 1979).

Cada cepa bacteriana apresenta diferentes taxas de crescimento e assim cada uma irá diferir no tempo necessário para atingir a fase logarítmica de crescimento (OTHMAN et. al. 2011). Se a bactéria utilizada estiver na fase

logarítima de crescimento, então o tempo de incubação necessário será menor, pois a fase lag será mais curta ou inexistente (KAVANAGH, 1963).

Além da fase de crescimento, a carga microbiana também irá influenciar na resposta, pois uma alta carga microbiana pode permitir um ensaio com menor tempo de incubação e proporcionar um aumento na resposta média do ensaio (HEWITT, 1977), porém poderá influenciar na inclinação da curva dose-resposta em um tempo mínimo de incubação (KAVANAGH, 1963). Ensaio com pequena quantidade de inóculo podem resultar em longo período de incubação. É necessário avaliar a influência do tamanho do inóculo para cada método, meio de cultura, microrganismo-teste e substância ensaiada (LOURENÇO, 2009; KAVANAGH, 1963).

2.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

No ensaio turbidimétrico os tubos são incubados até que o controle positivo atinja uma leitura desejada. Para tanto, o tempo exigido é influenciado pela composição e pH do meio de cultura, temperatura de incubação e tamanho do inóculo, entre outros. Um quesito de grande importância é manter todos os tubos incubados pelo mesmo tempo, sendo que para o ensaio turbidimétrico este tempo é geralmente de 3 a 5 horas (PINTO et al., 2010). Entretanto, é importante citar que a inclinação da curva de calibração aumenta com o aumento do tempo de incubação, facilitando a leitura da resposta. Ainda, cada antibiótico irá necessitar de um tempo mínimo para um teste satisfatório, o que difere para antibióticos que atuam somente nas células em divisão e para aqueles que atuam independentemente do processo de divisão celular (KAVANAGH, 1963).

A maioria das bactérias cresce em meios de cultura complexos em temperaturas por volta de 37°C. A diminuição da temperatura reduz a taxa de crescimento, o que aumenta o tempo de incubação necessário para alcançar certa população desejada. Além disso, para que um ensaio seja preciso é necessário que a temperatura seja uniforme entre os tubos, o que pode ser realizado com a utilização de um banho de água com circulação (KAVANAGH, 1963).

Outro aspecto importante é a agitação, que deve ser periódica ou constante, visto que além de ser exigência para alguns microrganismos-teste, é também importante para reduzir o tempo de incubação, pois durante o período de incubação as bactérias podem sedimentar no fundo do tubo onde a quantidade de oxigênio é limitada, o que pode interferir no crescimento de microrganismos aeróbicos (PINTO et al., 2010; LOURENÇO, 2009; KAVANAGH, 1963).

2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO CLORETO DE TRIFENILTETRAZÓLIO (CTT)

Os sais de tetrazólio foram descritos pela primeira vez em 1894 e a partir de 1950 foram intensamente utilizados na química, bioquímica e microbiologia. O cloreto de trifeniltetrazólio é um dos sais de tetrazólio mais estudados. É uma substância incolor e solúvel em água que forma um precipitado de cristais vermelhos insolúvel em água após ser reduzido por bactérias, denominado formazan, (JUNILLON & FLANDROIS, 2014; JUNILLON et al., 2014; JUNILLON et al., 2012).

Dessa forma, o cloreto de trifeniltetrazólio vem sendo utilizado em diversos ensaios microbiológicos para a verificação da presença de bactérias ativas metabolicamente, além de ser utilizado em ensaios com microplacas para mensurar a proliferação celular, pois se admite que a coloração ocasionada pela redução do CTT será proporcional ao número de células viáveis na fase exponencial. O CTT é útil para reduzir o tempo de incubação necessária para o ensaio (YAMAMOTO & PINTO, 1996; BERRIDGE et al., 2005).

O uso de altas concentrações de CTT pode se mostrar tóxico tanto para bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas, por isso é necessário determinar a concentração que melhor representa a carga microbiana sem apresentar toxicidade (JUNILLON & FLANDROIS, 2014; JUNILLON et al., 2014; YAMAMOTO & PINTO, 1996)

2.5 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICO

A diferença de concentrações do antibiótico irá refletir na carga microbiana ao fim do período de incubação, produzindo uma resposta gradual que será analisada pelos diferentes valores de absorbância ou transmitância (PINTO et al., 2010). A turbidez resultante do crescimento microbiano será inversamente proporcional à concentração do antibiótico (LOURENÇO, 2009). O tipo de escala utilizado para fazer a leitura desta turbidez irá influenciar no perfil da curva dose-resposta. A resposta pode ser apresentada pela relação entre o log da concentração e a densidade óptica ou pelo log da concentração e a porcentagem de transmitância. O logaritmo da concentração é utilizado, pois permite a construção de uma reta, que é a maneira mais fácil de unir os pontos da curva dose-resposta. (KAVANAGH, 1963).

Os ensaios microbiológicos medem respostas e não quantidades de substâncias. A resposta deverá ser convertida em quantidades da substância ativa através da curva dose-resposta (KAVANAGH, 1963). A curva dose-resposta é fundamental para o ensaio turbidimétrico e sua construção inadequada, por motivos teóricos ou práticos, é causa comum de erros. (BOTELHO, 2010; PINTO et al., 2010; KAVANAGH, 1972)

2. SULFATO DE NEOMICINA

A neomicina é um importante antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, efetivo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias (VASTRAD & NEELAGUND, 2011). O sulfato de neomicina é um complexo antibiótico solúvel em água utilizado em diversas preparações farmacêuticas, como preparações oftálmicas, tópicas, orais ou para administração intravenosa (HANKP & ROHRER, 2006; STYPULKOWSKA et al., 2013).

Este antibiótico é utilizado no tratamento de diversas infecções na pele ou mucosas, como queimaduras, úlceras e dermatoses infecciosas. Assim como outros antibióticos aminoglicosídeos, seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de proteínas, além de ser pouco absorvida pelo trato gastrointestinal e ser excretada pelo rim. Cerca de 97% de uma dose oral de

neomicina não são absorvidos, sendo eliminados de forma inalterada nas fezes (BRUNTON et al.; 2006).

A neomicina apresenta uma faixa terapêutica limitada, e é potencialmente tóxica, podendo causar nefrotoxicidade e ototoxicidade. Os efeitos tóxicos mais predominantes constituem-se de lesão renal e surdez neural irreversível (ADAMS et al., 1996; BRUNTON et al.; 2006).

A análise da neomicina e outros antibióticos aminoglicosídeos é uma difícil tarefa por serem fármacos de alta polaridade, não voláteis e principalmente pela ausência de grupos cromóforos e fluoróforos (STYPULKOWSKA et al., 2013).

A neomicina é composta em sua maioria pela neomicina B, mas também há a presença da neomicina C e neomicina A, conhecida como neamina, que é um produto da decomposição das neomicinas B e C (**Figura 1**). A neomicina B é mais ativa que a neomicina C contra uma variedade de microrganismos, e seus componentes podem ser encontrados em um produto com misturas de 50:50 a 95:5 dos componentes B e C, respectivamente, o que dificulta e torna análise da neomicina por métodos cromatográficos e espectrofotométricos um problema (HEWITT, 1977; PINTO et al., 2013).

Figura 1. Estruturas químicas das substâncias relacionadas de neomicina (STYPULKOWSKA et al., 2013).

A análise de neomicina também apresenta problemas atribuídos à variação de sua composição em um produto e aos métodos utilizados. Normalmente um laboratório consegue realizar um teste com boa precisão, porém encontram-se diferenças quando são utilizados diferentes métodos em diferentes laboratórios (KAVANAGH, 1972).

Diversos métodos cromatográficos vêm sendo desenvolvidos para a análise de neomicina como cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal, reversa, de pareamento iônico ou cromatografia iônica com derivatização pré ou pós-coluna empregando o-ftalaldeído para detecção ultravioleta ou fluorescência, detectores de espectrometria de massas (MASCHER et al., 2007; EORTEL et al., 2004; EORTEL et al., 2004), por espalhamento de luz (STYPULKOWSKA et al., 2013; CLAROT et al., 2005; TAWA et al., 1998; STEAD & RICHARDS, 1997) e eletroquímica (ADAMS et al., 1996; PENDELA et al., 2004; GUAN & YUAN, 2007; ZAWILLA et al., 2006; HANKO et al., 2007). Métodos de eletroforese capilar com detecção UV indireta também são encontrados na literatura (HUIDOBRO et al., 2009; SRISOM et al., 2007). Entretanto, apesar da existência de diversos métodos alternativos, o método microbiológico continua a ser o método oficial indicado pelas farmacopeias para a análise de neomicina.

3. BACITRACINA ZINCICA

A bacitracina é um antibiótico do grupo dos polipeptídeos frequentemente encontrado na forma de sal de zinco. É amplamente utilizada em produtos farmacêuticos de administração tópica, além de poder ser utilizada em aplicações orais para esterilização do trato gastrointestinal e tratamento de algumas infecções gastrointestinais, limitadas aplicações intramusculares e em produtos veterinários. É frequentemente encontrada em produtos farmacêuticos em associação com outros antibióticos, como a neomicina e a polimixina, e raramente produz hipersensibilidade (MING & EPPERSON, 2002; SARRI et al., 2006; BRUNTON et al., 2006; POTTS et al., 2012; CIESIOLKA et al., 2014).

Este antibiótico é produzido por espécies de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, e é ativo principalmente contra cocos e bacilos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., e *Clostridium difficile*, e algumas arqueobactérias como *Methanobacterium* sp., *Mathanococcus* sp., e *Halococcus* sp. (MING & EPPERSON, 2002, SARRI et al., 2006; POTTS et al., 2012;)

A bacitracina é uma mistura formada por diferentes componentes polipeptídicos similares relacionados com uma estrutura que compreende um anel heptapeptídeo ligado a uma cadeia pentapeptídica (**Figura 2**). As formas de bacitracina A, B1, B2 e B3 são as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana do antibiótico. A forma de bacitracina F é seu principal produto de degradação, é um componente inativo conhecido por sua nefrotoxicidade (PAVLI & KMETEC, 2001; SARRI et al., 2006). A bacitracina apresenta forte afinidade a metais catiônicos divalentes, e está disponível comercialmente na forma mais estável em um complexo de bacitracina zincica, que é também utilizado como padrão de referência químico (SARRI et al., 2006).

Seu mecanismo de ação atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana pela inibição da desfosforilação do carreador lipídico. A bacitracina apresenta a habilidade de degradar ácidos nucleicos, sendo ativa principalmente contra moléculas de RNA, e ativa contra cadeias simples de DNA em maiores concentrações (CIESIOLKA et al., 2014).

Figura 2. (a) Estruturas químicas das bacitracinas A, B1, B2 e B3. (b) sequencia peptídica das bacitracinas A, B1, B2, B3, C1, C2, C3 e F (POTTS et al., 2012).

	R ₁	R ₂	R ₃
Bacitracin A	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Bacitracin B1	CH ₃	CH ₃	H
Bacitracin B2	H	CH ₃	CH ₃
Bacitracin B3	CH ₃	H	CH ₃

Bacitracin	X	Y	R
A	L-Ile	L-Ile	(A)
B1	L-Ile	L-Ile	(B)
B2	L-Val	L-Ile	(A)
B3	L-Ile	L-Val	(A)
C1	L-Val	L-Ile	(B)
C2	L-Ile	L-Val	(B)
C3	L-Val	L-Val	(A)
F	L-Ile	L-Ile	(C)

4. MÉTODOS RÁPIDOS

Os métodos rápidos na área de microbiologia começaram a ser desenvolvidos nas últimas décadas baseado na necessidade de métodos que consumam menos tempo para não interferir na eficiência do processo de fabricação, além da possibilidade de oferecerem maior sensibilidade e exatidão que os métodos convencionais (PINTO et al. 2015), .

Os métodos de cultivo costumam ser os mais utilizados já que apresentam as vantagens de serem de simples execução, não necessitar de equipamentos especializados e serem de baixo custo. Porém a necessidade de longo período de incubação, de 24 horas a 14 dias, pode acarretar em elevado custo quando medidas corretivas são necessárias, como no caso de contaminação do produto ou do ambiente (PINTO et al. 2015).

Diversas tecnologias podem ser aplicadas aos métodos microbiológicos. As tecnologias baseadas no crescimento do microrganismo podem não se caracterizar por testes realmente rápidos, mas sim em testes mais rápidos que os convencionais. Alguns exemplos dessas tecnologias são a bioluminescência ATP e AK, impedância e condutividade, detecção colorimétrica e da pressão do *headspace* pela produção de CO₂ (PINTO et al. 2015).

Já as tecnologias baseadas na viabilidade podem ser rápidas uma vez que não se baseiam no crescimento microbiano e sim na coloração de componentes bioquímicos ou fluorescência de substratos fluorogênicos celulares. Alguns exemplos dessas tecnologias são microscopia direta de filtro epifluorescente, citometria de fluorescência por varredura a laser da membrana e citometria de fluxo por coloração vital ou fluorescência (PINTO et al. 2015).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Recentemente, o desenvolvimento de métodos analíticos vem sendo realizado utilizando uma abordagem racional. O planejamento de experimentos (DoE) é uma metodologia que determina a relação entre os fatores que afetam um processo e seu resultado final. Este planejamento garante o correto

funcionamento de um processo dentro das condições determinada por uma região de *design space*, e é uma excelente ferramenta para a otimização de métodos (SHIVHARE & McCreath, 2010)

A metodologia de análise de superfície resposta é uma das ferramentas de DoE utilizadas para a otimização. É baseada no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais que irá descrever o comportamento dos dados, permitindo a previsão da resposta dentro das condições estudadas. Esta ferramenta é útil em situações onde vários fatores afetam uma resposta, uma vez que irá analisar simultaneamente os fatores gerando as melhores condições de cada nível para se obter o melhor resultado. Além disso, permite analisar a existência de interação entre dois ou mais fatores (BEZERRA et al., 2008).

Um dos planejamentos de análise de superfície resposta mais comumente utilizados é o de compósito central. O planejamento de compósito central é utilizado para estudar como os fatores de um método afetam em sua resposta final. Este planejamento é constituído do planejamento fatorial (completo ou fracionado) com pontos centrais e axiais. O planejamento de compósito central irá apresentar sempre o dobro de pontos axiais que o número de variáveis. Esses pontos representam os valores extremos (nível baixa e alta) para cada variável (HANRAHAN & LU, 2006).

OBJETIVO

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver ensaio microbiológico rápido para análise de neomicina e bacitracina empregando leitura cinética em microplacas; validar os ensaios desenvolvidos através dos parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez; e comparar os ensaios desenvolvidos com os ensaios oficiais presentes nas farmacopeias.

Objetivos específicos

- Determinar as composições dos meios ideais para os doseamentos microbiológico rápido de neomicina e bacitracina;
- Escolher os microrganismos sensíveis que apresentem crescimento mais rápido e adequado;
- Determinar o menor tempo de incubação possível que forneça respostas adequadas;
- Otimizar as concentrações de antibiótico, de cloreto de trifêniltetrazólio (CTT), e proporções de inóculo;
- Validar os ensaios quanto à especificidade/seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez;
- Comparar os ensaios desenvolvidos com os ensaios oficiais descritos nas farmacopéias.

**PARTE I – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO
MICROBIOLÓGICO COLORIMÉTRICO RÁPIDO EM MICROPLACAS PARA
AVALIAÇÃO DE SULFATO DE NEOMICINA EM FORMAS
FARMACÊUTICAS**

1. INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos são uma das classes de medicamentos mais utilizadas mundialmente. Seu uso irracional e indiscriminado é uma questão preocupante, principalmente pelo surgimento de cepas resistentes aos antibióticos. O sucesso da terapia está relacionado à atividade biológica do antibiótico utilizado. Dentre as classes de antibióticos, os aminoglicosídeos são uma das classes mais empregadas no tratamento de doenças infecciosas devido ao seu amplo espectro de ação. (BRUNTON et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010; BUTLER & COOPER, 2011).

Os aminoglicosídeos atuam inibindo a síntese proteica pela interação com a subunidade 30s dos ribossomos. Quimicamente, os aminoglicosídeos são aminoaçúcares ligados por uma ligação glicosídica a um anel aminociclitol e podem ser divididos pelos seus 1,2- substituentes (neomicina, etc.) e 1,3 substituinte (gentamicina e etc.). A neomicina é um antibiótico aminoglicosídico de amplo espectro de ação, e é produzido por *Streptomyces fradiae*. Seus principais componentes são a neomicina B e a neomicina C. (**Figura 1**). (BENVENISTE & DAVIES, 1973; MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999; STEAD, 2000; BRUNTON et al., 2006)

Figure 1. Estrutura química da neomicina B (R1: CH_2NH_2 e R2: H) e neomicina C (R1: H e R2: CH_2NH_2).

As características químicas dos aminoglicosídeos em geral incluem alta polaridade, solubilidade em água, baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos e fluoróforos. A ausência desses grupos torna necessário o uso de derivatização pré ou pós-coluna antes da detecção por métodos de fluorescência ou UV, o que dificulta o desenvolvimento de métodos para a análise de aminoglicosídeos. Outros métodos podem ser utilizados como alternativa para sua detecção como detectores eletroquímicos e de índice de refração. Entretanto, o ensaio microbiológico de difusão em ágar permanece como o método oficial para a análise de neomicina (ROBERTSON et al., 1971; KAVANAGH, 1972; YAMAMOTO & PINTO, 1996; ADAMS et al., 1998; ISOHERRANEN & SOBACK, 1999; FRUTOS et al., 2000; LOURENÇO et al., 2011; LOURENÇO & PINTO, 2011; PINTO et al., 2013).

O ensaio de difusão em ágar é frequentemente utilizado na análise da potência de antibióticos. Neste ensaio, o crescimento microbiano ocorre na superfície do meio de cultura sólido, exceto na região onde o antibiótico tenha se difundido (zona de inibição), que será proporcional à concentração do antibiótico. Apesar de seu amplo emprego, o ensaio de difusão em ágar apresenta algumas desvantagens em relação ao ensaio turbidimétrico como a sensibilidade, o tempo de incubação prolongado (por volta de 18 horas), e as limitações por questões de difusão (KAVANAGH, 1963; HEWITT, 1977; LOURENÇO et al., 2007a; LOURENÇO & PINTO, 2009; SCHMIDT et al. 2009; PINTO et al. 2010; DAFALE et al., 2012; DAFALE et al. 2013; LOURENÇO et al., 2013; GHISLENI et al., 2014).

No ensaio turbidimétrico, o crescimento microbiano varia de acordo com a concentração do antibiótico no meio de cultura líquido, resultando em uma visível turbidez que pode ser medida fotometricamente após um período de incubação, sob condições apropriadas. Diferente do ensaio de difusão em ágar, o meio de cultura líquido utilizado no ensaio turbidimétrico fornece um crescimento rápido (por volta de 6 horas), e não apresenta limitações em relação à difusão do antibiótico. Diversos fatores podem afetar o crescimento microbiano, e consequentemente a resposta do ensaio turbidimétrico (LOURENÇO et al. 2007b; PINTO et al. 2010; LOURENÇO & PINTO, 2011; BOTELHO et al., 2013; TÓTOLI & SALGADO, 2013; PEDROSO & SALGADO, 2014).

Nas últimas décadas, os sais de tetrazólio têm sido utilizados para fornecer uma detecção rápida do crescimento microbiano (BARTLETT et al., 1976; YAMAMOTO & PINTO, 1996; SMITH et al., 1998; PROCTOR & SOUZA, 2001; KLANCNIK et al., 2010). As células microbianas são capazes de reduzir os sais de tetrazólio a um precipitado avermelhado (formazan). Em outras palavras, a concentração do formazan, que é medida na intensidade da coloração avermelhada, será proporcional à quantidade de células viáveis, que é proporcional à concentração do antibiótico no meio de cultura líquido. Este fato permite que a detecção do crescimento microbiano seja feita antes da visibilidade turbidimétrica. Desta forma, o uso dos sais de tetrazólio, como o cloreto de trifeniltetrazólio, pode reduzir o tempo de incubação necessária no ensaio. Apesar de diversas aplicações dos sais de tetrazólio, seu uso em ensaios microbiológicos para a potência de antibióticos não foi encontrado na literatura (BARTLETT et al., 1976; YAMAMOTO & PINTO, 1996; SMITH et al., 1998; PROCTOR & SOUZA, 2001; KLANCNIK et al., 2010).

Recentemente, os métodos analíticos têm sido desenvolvidos utilizando planejamento fatorial e análise de superfície de resposta (RSM). Esta metodologia consiste em uma abordagem racional para o desenvolvimento e otimização racional, uma vez que permite que múltiplos fatores sejam avaliados simultaneamente, incluindo suas interações. O planejamento fatorial pode ser usado para identificar os fatores mais relevantes para a resposta do experimento. O planejamento compósito central pode ser utilizado para estudar como estes fatores afetam a resposta do ensaio. Apesar de seus benefícios, os planejamentos fatorial e composto central raramente são utilizados no desenvolvimento de métodos microbiológicos. (HANRAHAN & LU, 2006; SRINUBABU et al., 2007; BEZERRA et al., 2008; SAVIANO et al., 2014).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar um ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca utilizando as metodologias de análise de superfície de resposta e planejamento fatorial. Além disso, o ensaio foi validado de acordo com a legislação, e comparado com o ensaio convencional de difusão em ágar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

O Padrão de referência sulfato de neomicina foi fornecido pela FURP – Fundação para o Remédio Popular, assim como as amostras comerciais de pomada de sulfato de neomicina e bacitracina zíncica, além da mistura de excipientes utilizada como placebo.

O meio de cultura e as soluções tampão foram preparados no laboratório utilizando peptona (Bacto BD, EUA), extrato de carne (BBL BD, EUA), extrato de levedura (Bacto BD, EUA), ágar (Bacto BD, EUA), digesto pancreático de caseína (Bacto BD, EUA), dextrose (Inlab, Brasil), fosfato de potássio monobásico (J.T. Baker, México) e fosfato de potássio dibásico (J.T. Baker, México).

2.2. EQUIPAMENTOS

Foram utilizados um leitor de microplaca Polaris (Celer, Brasil) e um agitador Bioshake iQ (Analytik Jena, Alemanha) para a agitação, incubação e leitura da microplaca. Para o ensaio de difusão em ágar foi utilizado uma estufa bacteriológica (Nova Ética, Brasil) e um leitor de zonas (Lilly Fischer, EUA). Além disso, foi utilizado uma balança analítica AUY220 (Shimadzu, Japão), um pHmetro PG1800 (Gehaka, Brasil), e uma autoclave esterilizador (Lutz Ferrando, Brasil) para o preparo dos meios de cultura e soluções em geral.

2.3. SOLUÇÕES

Soluções de padrão de referência neomicina.

Quantidades exatamente pesadas do padrão de referência neomicina foram diluídas utilizando tampão fosfato de potássio pH 8,0 para obter as concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL.

Amostras comerciais de pomada sulfato de neomina e bacitracina zíncica.

Foram pesadas quantidades da pomada equivalentes a 5,0 mg de neomicina, e posteriormente transferidas para um balão de extração. Foram adicionados 50 ml de éter dietílico para a dissolução da pomada, e a extração foi realizada com três porções de 50 ml de tampão fosfato pH 8,0. Todo o conteúdo do recipiente foi transferido para um balão volumétrico de 200 ml, e o volume foi completado com tampão fosfato. A partir desta solução, foi realizada a diluição com tampão fosfato para a obtenção das concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL.

2.4. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO MICROBIOLÓGICO COLORIMÉTRICO RÁPIDO EM MICROPLACA.

O ensaio foi desenvolvido e otimizado com uma abordagem racional. Planejamento fatorial e análise de superfície de resposta foram utilizados para estudar os efeitos de cada condição experimental no crescimento microbiano.

Tempo de incubação e composição do meio de cultura

Testes iniciais foram realizados para a escolha do microrganismo susceptível e de crescimento mais rápido. Foram testados os microrganismos *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). A incubação foi realizada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 500 RPM por 6 horas. O planejamento fatorial 2^4 foi utilizado para a escolha da composição do meio de cultura que fornece o crescimento mais intenso após 3 horas incubação. Este planejamento permitiu a avaliação dos efeitos de cada componente do meio de cultura no crescimento da *Escherichia coli* (ATCC 8739) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição dos meios de cultura testados para o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca, usando *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Meio de cultura	Peptona (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Extrato de carne (g/L)	Dextrose (g/L)
#01	5,0	0,0	0,0	0,0
#02	0,0	1,5	0,0	0,0
#03	0,0	0,0	1,5	0,0
#04	0,0	0,0	0,0	1,0
#05	5,0	1,5	0,0	0,0
#06	5,0	0,0	1,5	0,0
#07	5,0	0,0	0,0	1,0
#08	0,0	1,5	1,5	0,0
#09	0,0	1,5	0,0	1,0
#10	0,0	0,0	1,5	1,0
#11	5,0	1,5	1,5	0,0
#12	5,0	1,5	0,0	1,0
#13	5,0	0,0	1,5	1,0
#14	0,0	1,5	1,5	1,0
#15	5,0	1,5	1,5	1,0
#16	0,0	0,0	0,0	0,0

Todos os meios de cultura continham fosfato de potássio monobásico (1,32 g/L) e fosfato de potássio dibásico (3,68 g/L), e o pH foi ajustado entre 7,8 e 8,0.

Influência da concentração de microrganismo e cloreto de trifeniltetrazólio.

Após a definição da composição de meio de cultura, um planejamento compósito central foi realizado para estudar os efeitos das concentrações de *Escherichia coli* (ATCC 8739) (inóculo, 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 1,8%), cloreto de trifeniltetrazólio (CTT, 0,2; 0,3; 0,5; 0,7 e 0,8% *m/v*), e sulfato de neomicina (NEO, 2,0; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,0 µg/mL) no crescimento microbiano (**Tabela 2**). Foram testadas quinze combinações diferentes das três variáveis, incluindo 8 pontos do planejamento fatorial, 6 pontos axiais e um ponto central (6

determinações independentes) (Bezerra et al., 2008). A validade do modelo matemático foi verificada pelo coeficiente de correlação ($r^2 \geq 0,70$) e ajuste (valor de $p \geq 0,05$). Todos os ensaios foram realizados utilizando o meio de cultura #15 (equivalente ao meio de cultura nº39 da Farmacopeia Americana), e a microplaca foi incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM, por 3 horas. Os resultados foram utilizados para otimizar as concentrações de inóculo, cloreto de trifêniltetrazólio e sulfato de neomicina do ensaio rápido.

Tabela 2. Estudo da influência da concentração de *Escherichia coli* (ATCC 8739), cloreto de trifêniltetrazólio, e sulfato de neomicina no crescimento microbiano, usando a composição completa do meio de cultura (#15).

Ensaio	Inóculo (%)	CTT (%)	Neomicina ($\mu\text{g/mL}$)
#01	0,2	0,5	4,5
#02	0,5	0,3	3,0
#03	0,5	0,3	6,0
#04	0,5	0,7	3,0
#05	0,5	0,7	6,0
#06	1,0	0,2	4,5
#07	1,0	0,5	2,0
#08	1,0	0,5	4,5
#09	1,0	0,5	4,5
#10	1,0	0,5	4,5
#11	1,0	0,5	4,5
#12	1,0	0,5	4,5
#13	1,0	0,5	4,5
#14	1,0	0,5	7,0
#15	1,0	0,8	4,5
#16	1,5	0,3	3,0
#17	1,5	0,3	6,0
#18	1,5	0,7	3,0
#19	1,5	0,7	6,0
#20	1,8	0,5	4,5

Ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca.

O ensaio foi realizado com as condições experimentais otimizadas. Vinte microlitros (20 µL) das soluções do padrão de neomicina ou da amostra comercial (nas concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL) foram adicionadas nos poços da microplaca. Aliquotas de 180 µL do meio de cultura n° 15 inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) (em uma proporção de 0,5%) foram transferidas para cada poço da microplaca. Foi adotado o delineamento em quadrado latino para diminuir a variabilidade dos resultados devido à posição da distribuição das soluções nos poços na microplaca. (**Figura 2**). A incubação foi realizada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 500 RPM, por 3 horas. Ao final da incubação, Aliquotas de 50 µL da solução de trifeniltetrazólio (CCT) a 0,5% (*m/v*) foram adicionadas em cada poço, e a microplaca foi então incubada por mais 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 500 RPM. A leitura da resposta colorimétrica foi realizada a 630 nm e a potência das amostras comerciais foi calculada utilizando a média das absorbâncias.

Figura 2. Esquema do delineamento em quadrado latino para a distribuição do padrão de neomicina (P1, P2, e P3 – concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL) e amostras comerciais (A1/B1, A2/B2, e A3/B3 – concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL). CN = controle negativo e CP = controle positivo.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	CN	CN	CN	CP	CP	CP	CN	CN	CN	CP	CP	CP
B	P1	P2	P3	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3
C	P2	P3	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3	P1
D	P3	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3	P1	P2
E	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3	P1	P2	P3
F	A2	A3	P1	P2	P3	A1	B2	B3	P1	P2	P3	B1
G	A3	P1	P2	P3	A1	A2	B3	P1	P2	P3	B1	B2
H	CP	CP	CP	CN	CN	CN	CP	CP	CP	CN	CN	CN

Concentração mínima inibitória (CIM).

Uma solução estoque de neomicina contendo 1000 µg/mL foi preparada utilizando tampão fosfato pH 8,0. Diluições seriadas de 1000 a 0,5 µg/mL foram realizadas em duplicada. Alíquotas de 20 µL de cada diluição foram transferidas para a microplaca. Posteriormente, 180 µL do meio de cultura nº15 inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 8739) (em uma proporção de 0,5%) foram transferidas para cada poço da microplaca, que foi então incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Ao final do período de incubação, foram adicionadas alíquotas de 50 µL da solução de trifeniltetrazólio (CCT) a 0,5% (m/v) em cada poço, e a concentração mínima inibitória (CIM) foi determinado como a menor concentração que não apresentou crescimento microbiano.

Concentração mínima bactericida (CMB)

Alíquotas de 20 µL das concentrações que não apresentaram crescimento no teste da CIM foram transferidas para novos poços da microplaca. Foram adicionadas alíquotas de 180 µL do meio de cultura nº15 em cada poço, e a microplaca foi então incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação, alíquotas de 50 µL da solução de trifeniltetrazólio a 0,5% (m/v) foram adicionada aos poços, e a concentração mínima bactericida foi determinada como a menor concentração que não apresentou crescimento microbiano.

2.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e robustez. De acordo com a legislação, os limites de detecção e quantificação não são necessários para esta categoria de ensaio. (Brasil, 2003; ICH, 2005).

Linearidade. A linearidade foi avaliada pelo ensaio de seis concentrações do padrão de referência sulfato de neomicina (2,0; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5, e 5,0 µg/mL). Os dados obtidos das curvas analíticas foram avaliados por análise de regressão. Além disso, as curvas analíticas obtidas das amostras

comerciais e padrão de referências foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para confirmação do paralelismo entre elas (Brasil, 2003; ICH, 2005)

Precisão. A precisão do ensaio foi avaliada em dois níveis: a) repetibilidade; e b) precisão intermediária. A repetibilidade foi mensurada como o desvio padrão relativo de seis amostras analisadas no mesmo dia e sob as mesmas condições de trabalho. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de seis amostras em dois dias diferentes. (Brasil, 2003; ICH, 2005)

Exatidão. Foram preparadas soluções com mistura de excipientes (placebo) e padrão de referência neomicina para a avaliação da exatidão. A extração da neomicina foi realizada como descrito na seção **Amostras comerciais de pomada sulfato de neomina e bacitracina zíncica**, que foi realizada conforme monografia da Farmacopeia Americana. A exatidão foi determinada como a média de recuperação do método, incluindo o processo de extração. (Brasil, 2003; ICH, 2005)

Robustez. A robustez foi avaliada pelo planejamento compósito central durante o desenvolvimento e otimização do ensaio, que permitiu a avaliação da influência das concentrações de cloreto de trifeniltetrazólio e *Escherichia coli* (ATCC 8539) simultaneamente no crescimento microbiano. (Brasil, 2003; ICH, 2005)

2.6. COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS

Ensaio de difusão em ágar. O ensaio microbiológico de difusão em ágar descrito na farmacopeia (Farmacopeia Brasileira, 2010; United States Pharmacopeia, 2012) foi utilizado na comparação entre o ensaio oficial e o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca. Alíquotas de 20 mL do meio de cultura antibiótico nº11 (extrato de carne 1,5 g/L, extrato de levedura 3,0 g/L, digesto pancreático de caseína 4,0 g/L, peptona 6,0 g/L, dextrose 1,0 g/L, e ágar 15,0 g/L, pH final entre 7,9 a 8,0) foram adicionadas em placas de Petri. Posteriormente, cinco mililitros (5 mL) do meio de cultura antibiótico nº11 inoculado (em uma proporção de 1%) com uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ($25 \pm 2\%$ transmitância a 580 nm) foram adicionados à camada de meio de cultura já solidificada. Discos de papel foram

então imersos em soluções de padrão de neomicina ou de amostras comerciais (concentrações de 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL) e colocados sobre o ágar. As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, e a potência das amostras comerciais foi calculada como a média dos valores das zonas inibição. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

Comparação estatística dos ensaios. Seis amostras comerciais foram analisadas simultaneamente pelo ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca e pelo ensaio de difusão em ágar. As potências dessas amostras foram comparadas utilizando o teste T duplo unicaudal (TOST- two one-sided) para equivalência. Neste teste, consideramos que dois métodos são equivalentes se o intervalo de confiança de 90% de suas diferenças está dentro do limite estabelecido como analiticamente similar. Definiu-se que o intervalo para a equivalência dos ensaios deveria ser o limite de especificação (90 a 135% do teor rotulado) do teor de neomicina na forma de sulfato de neomicina (LOURENÇO & PINTO, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO MICROBIOLÓGICO COLORIMÉTRICO RÁPIDO EM MICROPLACA

A escolha do microrganismo é uma questão importante em ensaios microbiológicos, uma vez que o microrganismo deve ser susceptível ao antibiótico ensaiado e deve apresentar um crescimento rápido e intenso. De acordo com os resultados, *Escherichia coli* (ATCC 8739) apresentou um crescimento mais rápido e intenso que *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Estes resultados podem ser explicados devido às características metabólicas da *Escherichia coli*. Um dos principais objetivos do ensaio em microplaca é ser mais rápido que o ensaio convencional de difusão em ágar, portanto *Escherichia coli* (ATCC 8539) foi o microrganismo de escolha para o ensaio rápido.

A composição do meio de cultura é um fator que pode alterar o crescimento microbiano, e consequentemente, o resultado do ensaio microbiológico. Desta forma, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 para estudar o efeito dos componentes do meio de cultura no crescimento do microrganismo *Escherichia coli* (ATCC 8539). Foram realizados testes com 16 combinações de meio de cultura com diferentes quantidades de peptona (0,0 ou 5,0 g/L), extrato de levedura (0,0 ou 1,5 g/L), extrato de carne (0,0 ou 1,5 g/L) e dextrose (0,0 ou 1,0 g/L). De acordo com os resultados, os quatro componentes estudados influenciaram no crescimento microbiano (**Figura 3**). Estes resultados sugerem que a composição completa do meio de cultura é a mais adequada para fornecer um crescimento microbiano mais rápido e intenso, como desejado para o ensaio rápido.

Figura 3. Gráfico de Pareto para o efeito da composição do meio de cultura no crescimento microbiano, usando *Escherichia coli* (ATCC 8739) incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 500 RPM, por 3 horas.

Um planejamento compósito central foi realizado para estudar como as concentrações de *Escherichia coli* (ATCC 8739) (inóculo, variando de 0,2 a 1,8%), cloreto de trifeniltetrazólio (CTT, variando de 0,2 a 0,8% *m/v*), e sulfato de neomicina (variando de 2,0 a 7,0 µg/mL) interferem no crescimento do microrganismo. Foi obtido um modelo matemático que explica o crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm) como função das concentrações de *Escherichia coli*, cloreto de trifeniltetrazólio e neomicina. Este modelo apresentou valores do coeficiente de correlação ($r^2 = 0,814$ r^2 de predição = 0,731) e ajuste (valor de *p* para falta de ajuste = 0,981) adequados. Os coeficientes deste modelo são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Coeficientes do modelo matemático que explica o crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm) como função das concentrações de *Escherichia coli*, cloreto de trifeniltetrazólio, e sulfato de neomicina.

Termo*	Coeficiente	Valor de p
Constante	0,2980	0,000
Concentration de inóculo (linear)	0,4859	0,000
Concentração de CTT (linear)	-0,2575	0,003
Concentração de Neomicina (linear)	-0,0333	0,002
Concentração de inoculo (quadrático)	-0,1651	0,011

* Termos quadráticos de concentração de CTT e sulfato de neomicina não foram significantes (valor de *p* > 0.05)

De acordo com os resultados do planejamento compósito central, quanto maior a quantidade de microrganismo, menor a inclinação da curva de dose-resposta (concentração do antibiótico) (**Figura 4**). Isso pode ser explicado devido a maior quantidade de antibiótico necessário para inibir o crescimento microbiano. Além disso, o tempo de incubação necessário para atingir a fase

estacionária irá diminuir. Estes resultados estão de acordo com a teoria do ensaio turbidimétrico (KAVANAGH, 1963; HEWITT, 1977, PINTO et al. 2010)

Figura 4. Efeitos das concentrações de *Escherichia coli* (ATCC 8539) (inóculo), e neomicina no crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm), concentração fica de CTT a 0,5%.

O cloreto de trifeniltetrazólio foi utilizado como um indicador de viabilidade, uma vez que somente células microbianas viáveis são capazes de reduzir o CTT a formazan, que se apresenta como um precipitado de coloração avermelhada. Desta forma quanto mais intensa a coloração avermelhada, maior será a proporção de microrganismo viável. Entretanto, para concentrações do inóculo de 1.0%, a intensidade da coloração permaneceu praticamente constante (**Figura 5**).

Foi observado que em certa concentração de inóculo, quanto maior a quantidade de CTT, menor a intensidade da coloração avermelhada. Resultados similares foram obtidos utilizando diferentes concentrações de CTT, e uma concentração fixa de neomicina (**Figura 6**). Estes resultados sugerem que altas concentrações de CTT podem matar as células microbianas.

Figura 5. Efeitos das concentrações de *Escherichia coli* (ATCC 8539) (inóculo), e cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) no crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm), concentração fixa de neomicina a 4,5 µg/mL.

Figura 6. Efeitos das concentrações de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT), e neomicina no crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm), inóculo fixo a 1,0%.

A determinação colorimétrica baseia-se na redução do cloreto de trifeniltetrazólio a formazan, que irá formar um precipitado de coloração avermelhada. Foi observado que após um longo período de incubação o precipitado apresenta perda da coloração, o que pode aumentar as chances de erro na determinação fotométrica. Para solucionar esta questão, a leitura fotométrica foi padronizada, sendo realizada a 630 nm após um pequeno período de incubação ($37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 500 RPM / 5 minutos). Além disso, foi adotado o delineamento em quadrado latino para minimizar os erros devido à distribuição das posições de linhas e colunas na microplaca.

Por fim, as condições experimentais otimizadas obtidas do planejamento fatorial 2^4 e do planejamento compósito central foram:

- a)** *Escherichia coli* (ATCC 8539);
- b)** composição completa do meio de cultura (meio nº15: peptona 5,0 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, dextrose 1, g/L, fosfato de potássio monobásico 1,32 g/L, and fosfato de potássio dibásico 3,68 g/L);
- c)** proporção de inóculo de 0,5%;
- d)** concentração de cloreto de trifeniltetrazólio de 0,5% (m/v);
- e)** concentração da neomicina de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL.

OS resultados de CIM e CMB foram 8 e 32 µg/mL, respectivamente. As concentrações da solução de neomicina escolhidas, de 3 a 5 µg/mL para o ensaio desenvolvido fornecem um inibição gradual do crescimento microbiano. Esta inibição gradual permite a análise da potência de uma amostra desconhecida com uma substância química de referência. Apesar de diversos ensaios encontrados na literatura utilizarem sais de tetrazólio para a avaliação da susceptibilidade de um microrganismo a um antibiótico ou agente antimicrobiano (MOHAMMADZADEH et al., 2006; BRADY et al., 2007; TSUKATANI et al., 2009), não foi encontrado nenhum ensaio para a análise da potência de antibióticos e agentes antimicrobianos.

3.2 VALIDAÇÃO DO ENSAIO

O ensaio otimizado foi validado pela avaliação dos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez. O ensaio se mostrou linear (na faixa de 2,0 a 5,0 µg/mL), com equações lineares de $Y=0,335-0,482X$ e coeficiente de correlação (r) de 0,994 (**Figura 7**). O delineamento retas paralelas 3x3 foi escolhido para o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em micropacas, onde as curvas do padrão e amostra devem apresentar regressão significativa, além de serem lineares e paralelas (**Figura 8**). De acordo com a legislação, estes parâmetros devem ser verificados por testes válidos. (BRASIL, 2003; ICH, 2005). De acordo com o teste de análise de variância (ANOVA), as curvas de padrão e amostra apresentaram regressão significativa (valor de $p \leq 0.05$); linearidade (valor de $p > 0.05$) e paralelismo (valor de $p > 0.05$). Entretanto, é importante citar que foi necessário adotar o delineamento em quadrado latino para reduzir a variabilidade devido à posição das linhas e colunas, normalizando os resultados dos ensaios.

Figura 7. Linearidade do ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca usando *Escherichia coli* (ATCC 8539), composição completa do meio de cultura (#15), proporção de inóculo de 0,5%, concentração de CTT de 0,5% (m/v) e concentração de neomicina de 2,0 a 5,0 µg/mL.

Figura 8. Paralelismo do ensaio para neomicina, usando *Escherichia coli* (ATCC 8539), composição completa do meio de cultura (#15), proporção de inóculo de 0,5%, concentração de CTT de 0,5% (*m/v*) e concentração de neomicina de 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL.

O ensaio se mostrou preciso (desvio padrão relativo (DPR) de 2,8% e 4,0% para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente) e exato (média de recuperação = 100,2%). Além disso, durante o desenvolvimento e otimização do ensaio foram estudados os efeitos das concentrações de inóculo e cloreto de trifeniltetrazólio no crescimento microbiano. Os resultados mostraram que o ensaio foi significativamente sensível às pequenas mudanças nas concentrações de inóculo e CTT. O planejamento compósito central permitiu esclarecer como esses parâmetros (isolados ou simultaneamente) irão afetar o crescimento microbiano e consequentemente os resultados do ensaio.

3.3 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS

A comparação estatística entre ensaios é uma importante etapa para confirmar a intercambialidade ou substituição de um ensaio convencional por um novo ensaio. Para realizar esta comparação, foram analisadas seis amostras comerciais tanto pelo ensaio colorimétrico rápido, quando pelo ensaio

de difusão em ágar. A média da potência da neomicina obtida foi 99,9% para o ensaio colorimétrico rápido, e 101,0% para o ensaio de difusão em ágar (**Figura 9**). Foi realizado o teste T unicaudal (TOST) para equivalência considerando um nível de significância de 5%, e os limites de especificação de 90 a 135% de teor rotulado de neomicina.

Figura 9. Resultado da potência da neomicina (**média com desvio padrão amostral**), usando o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca (A) e o ensaio de difusão em ágar (B).

A análise estatística demonstrou equivalência entre os ensaios de difusão em ágar e o ensaio colorimétrico rápido (valor de p para TOST = 0.023), assim os ensaios podem ser considerados intercambiáveis uma vez que fornecem resultados analíticos similares. Além da análise estatística, é importante observar as diferenças entre os ensaios considerando suas vantagens e desvantagens.

Ambos os ensaios fornecem informações sobre a atividade antimicrobiana de produtos farmacêuticos, porém o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca apresentou vantagens em relação à sensibilidade (linearidade variando de 3,0 a 5,0 µg/mL e 5,0 a 20,0 µg/mL para o ensaio de difusão em ágar e o ensaio colorimétrico, respectivamente) e tempo de incubação (3 horas para o ensaio colorimétrico e 18-24 horas para o ensaio de difusão em ágar). Além disso, o ensaio em microplaca utiliza uma

quantidade reduzida de meio de cultura e soluções em relação ao ensaio de difusão em ágar.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca é linear, preciso, exato e robusto (para os parâmetros ensaiados) na faixa de 3,0 a 5,0 µg/mL. O planejamento fatorial e compósito central permitiu estudar como a escolha do microrganismo, composição do meio de cultura, concentração do cloreto de trifeniltetrazólio e de neomicina irão afetar o crescimento microbiológico e conseqüentemente, o resultado do ensaio. Ainda, análises estatísticas comprovaram a equivalência entre o ensaio colorimétrico e o ensaio de difusão em ágar, podendo ser considerados intercambiáveis.

O ensaio colorimétrico rápido apresentou vantagens em relação à sensibilidade, tempo de incubação, e quantidade de meio de cultura e soluções necessárias. Portanto, o ensaio de difusão em ágar pode ser substituído pelo ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca na análise de rotina de produtos contendo neomicina. Além disso, concluímos que o ensaio colorimétrico em microplaca pode ser uma alternativa promissora para a análise de outros antibióticos.

**PARTE II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO
MICROBIOLÓGICO RÁPIDO EM MICROPLACAS PARA AVALIAÇÃO DE
BACITRACINA EM FORMAS FARMACÊUTICAS**

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos estão entre as classes de medicamentos mais importantes mundialmente. Sua principal etapa de controle de qualidade é realizada por meio de um ensaio microbiológico convencional que permanece quase inalterado desde seu desenvolvimento. A avaliação da eficácia de um antibiótico frente a um microrganismo específico é essencial, uma vez que irá refletir no sucesso da terapia antimicrobiana, o que é essencial considerando o surgimento de bactérias multi-resistentes. (SILVA & SALGADO, 2015; BUTTLER & COOPER, 2011; FRANCISCO et al., 2014; GOTTARDI et al., 2015).

Nas últimas décadas poucos antibióticos têm sido desenvolvidos, e os antibióticos convencionais permanecem como a primeira escolha para o tratamento de doenças infecciosas. Além disso, é possível realizar a combinação de diferentes classes de antibióticos para aumentar a eficácia do produto, como no tratamento de infecções na pele, um caso clínico comum onde é utilizada a combinação de neomicina, um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, e bacitracina (LIO & KAYE, 2011; BRUNTON et al., 2006).

A bacitracina é um antibiótico polipeptídico produzido pelo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. É bactericida para uma variedade de microrganismos Gram-positivos e é amplamente utilizada em produtos de administração tópica como pomadas. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da síntese da parede celular pela inibição da desfosforilação do carreador lipídico. A bacitracina (**Figura 1**) é composta por diferentes componentes, porém os compostos B1, B2 e B3 aparentam serem os mais importantes terapeuticamente, fato que pode dificultar a quantificação da bacitracina em produtos farmacêuticos por métodos químicos ou físico-químicos (GRUMEZESCU et al., 2014; CIESIOLKA et al., 2014; SIN AND WONG, 2003)

Figura 1. Estrutura química da bacitracina

Diferentes métodos cromatográficos (HPLC) têm sido desenvolvidos (MASCHER et al., 2007; POTTS et al., 2012), mas o ensaio microbiológico permanece como método analítico oficial para a análise da bacitracina e outros antibióticos em produtos farmacêuticos (LALPURIA et al., 2012; UNITED STATES PHARMACOEIA, 2012, MAHMOUDI et al., 2015). O ensaio de difusão em ágar é um método microbiológico que determina a potência de um antibiótico de acordo com a zona de inibição formada pela difusão do antibiótico em um meio de cultura sólido inoculado. Apesar de ser o mais frequentemente utilizado, este ensaio apresenta algumas desvantagens como longo período de incubação necessário, e resultados que podem ser afetados por questões de difusão (SAVIANO et al., 2014; PEDROSO AND SALGADO, 2014; KARRI et al., 2006)

O ensaio turbidimétrico é um método microbiológico alternativo para a obtenção de resultados mais rápidos devido ao uso de meio de cultura líquido, o que o torna também um ensaio de operação mais fácil (CAZEDEY & SALGADO, 2013). O ensaio é realizado pela adição da substância ensaiada em uma suspensão de microrganismo. Após incubação da mistura, procede-se com a leitura fotométrica do crescimento microbiano, que será inversamente proporcional à concentração do antibiótico. Alguns fatores poderão influenciar no tempo de incubação necessário para o ensaio, como o microrganismo

escolhido, que deve ser sensível ao antibiótico e responder adequadamente as suas mudanças de concentração, e a proporção de inóculo. A composição do meio de cultura também pode influenciar na taxa de crescimento do microrganismo, e conseqüentemente no tempo de incubação necessário para o ensaio (KAVANAGH, 1963; KAVANAGH & RAGHEB, 1979; LOURENÇO & PINTO, 2011).

O uso do cloreto de trifeniltetrazólio é uma alternativa para a redução do tempo de incubação de um ensaio. Os sais de tetrazólio têm sido utilizados em ensaios de microplaca para a obtenção de resultados em tempo real, uma vez que são reduzidos por celular viáveis formando um precipitado de coloração avermelhada. A intensidade desta coloração é proporcional à quantidade de células viáveis, e assim será proporcional à concentração do antibiótico, o que permite permitindo leitura mais rápida da resposta do ensaio (SABAEIFARD et al., 2014; TSUKUTANI et al., 2008; BERRIDGE et al., 2005; YAMAMOTO AND PINTO, 1996)

Atualmente, o planejamento de experimentos (DoE – designs of experiments) tem sido utilizado para o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas. Esta metodologia consiste em uma abordagem racional que determina a relação entre os fatores de um ensaio e sua resposta final. O planejamento fatorial é uma ferramenta que permite identificar quais as variáveis importantes para o experimento. Já as metodologias de análise de superfície e resposta permitem estudar como essas variáveis irão afetar a resposta final do experimento. O delineamento de compósito central é um dos delineamentos de análise de superfície e resposta mais utilizados devido à sua eficiência (HANRAHAN & LU, 2006; SRINUBABU et al., 2007; BEZERRA et al., 2008; SHIVHARE & MCCREATH, 2010; SAVIANO et al., 2014).

Desta forma, objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca para a análise de bacitracina utilizando metodologias de planejamento fatorial e de compósito central para a otimização do ensaio. O ensaio foi validado de acordo com a legislação e comparado com o ensaio oficial de difusão em ágar (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOEIA, 2012). Metodologias de planejamento de experimentos foram utilizadas para otimizar os parâmetros críticos do ensaio, e uma região de *design space* foi estabelecida um para garantir a

reprodutibilidade do ensaio, utilizando o conceito de qualidade por *design* analítico (DHANDHUKIA & THAKKAR, 2008; PERAMAN et al., 2015; PALLAGI et al., 2015).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS E SOLUÇÕES

O meio de cultura e as soluções tampão foram preparados no laboratório utilizando peptona (Bacto BD, EUA), extrato de carne (BBL BD, EUA), extrato de levedura (Bacto BD, EUA), ágar (Bacto BD, EUA), digesto pancreático de caseína (Bacto BD, EUA), dextrose (Inlab, Brasil), fosfato de potássio monobásico (J.T. Baker, México) e fosfato de potássio dibásico (J.T. Baker, México).

As soluções de padrão de referência bacitracina foram preparadas utilizando o padrão de referência da USP (lote IOK22, potência 75,5 UI/mg). Quantidades do padrão foram pesados e diluídos com uma porção de ácido hidrocloreídrico 0,01, e posteriormente em tampão fosfato pH 6,0 para obter as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 UI/ml.

As amostras comerciais da pomada de sulfato de neomicina e bacitracina zíncica, assim como a mistura de excipientes utilizada como placebo, foram fornecidas pela FURP – Fundação para o Remédio Popular.

Amostras comerciais de pomada sulfato de neomina e bacitracina zíncica.

Quantidades da pomada equivalentes a 800 UI de bacitracina foram pesadas e transferidas para um balão de extração. Alíquotas de 50 ml de éter dietílico foram utilizadas para a dissolução da pomada, e a extração foi realizada com quatro porções de 20 ml de ácido hidrocloreídrico 0,01 M. Todo o conteúdo extraído foi transferido para um balão volumétrico de 100 ml, e o volume foi completado com ácido hidrocloreídrico 0,01 M. As soluções foram então diluídas com tampão fosfato pH 6,0 para a obtenção das concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 UI/ml.

2.2 EQUIPAMENTOS

O meio de cultura e as soluções tampão foram preparadas e esterilizadas no laboratório utilizando uma balança analítica AUY220 (Shimadzu, Japão), um pHmetro PG18000 (Gehaka, Brasil) e uma autoclave esterilizadora (Lutz Ferrando, Brasil). O agitador de microplacas bioshake iQ (Analytik Jena, Alemanha) foi utilizado para a agitação e incubação da microplaca, e um leitor de microplaca Polaris (Celer, Brasil) foi utilizado para a leitura da resposta do ensaio em absorbância a 630nm. Para o método de difusão em ágar foi utilizado uma estufa bacteriológica (Nova Ética, Brasil) e um leitor de halos (Lilly Fischer, EUA).

2.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO MICROBIOLÓGICO COLORIMÉTRICO RÁPIDO EM MICROPLACA

O ensaio foi desenvolvido e otimizado utilizando metodologias de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta para estudar os efeitos de cada condição experimental no crescimento microbiano. Após estudo das variáveis, foi estabelecido um *design space* para as concentrações de CTT e inóculo que fornecem resultados desejáveis para o crescimento microbiano para doses baixas, médias e altas (2,0; 1,0 e 0,5 UI/mL) de bacitracina, controles positivo e negativo, assim como intercepto, inclinação e coeficiente de correlação da curva dose-resposta.

Tempo de incubação e composição do meio de cultura

Foram testados os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus luteus* (ATCC 7468) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) para a escolha do microrganismo que fornece um crescimento mais rápido e intenso. Após a seleção do microrganismo, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 para estudar como a composição do meio de cultura afeta o crescimento microbiano, e verificar qual a composição adequada para fornecer um crescimento microbiano rápido e intenso (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição dos meios de cultura testados para o método colorimétrico rápido em microplaca, usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Meio de cultura	Peptona (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Extrato de carne (g/L)	Dextrose (g/L)
#01	5,0	0,0	0,0	0,0
#02	0,0	1,5	0,0	0,0
#03	0,0	0,0	1,5	0,0
#04	0,0	0,0	0,0	1,0
#05	5,0	1,5	0,0	0,0
#06	5,0	0,0	1,5	0,0
#07	5,0	0,0	0,0	1,0
#08	0,0	1,5	1,5	0,0
#09	0,0	1,5	0,0	1,0
#10	0,0	0,0	1,5	1,0
#11	5,0	1,5	1,5	0,0
#12	5,0	1,5	0,0	1,0
#13	5,0	0,0	1,5	1,0
#14	0,0	1,5	1,5	1,0
#15	5,0	1,5	1,5	1,0
#16	0,0	0,0	0,0	0,0

Todos os meios de cultura continham fosfato de potássio monobásico (1,32 g/L) e fosfato de potássio dibásico (3,68 g/L), e o pH foi ajustado entre 7,0.

Influência do microrganismo e concentração de cloreto de trifeniltetrazólio

O planejamento de compósito central foi utilizado para avaliar a influência das concentrações de microrganismo (inóculo. 3,0; 5,0; 10,0; 15,0; 17,0%), cloreto de trifeniltetrazólio (CTT, 0,0; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0 UI/ml) e bacitracina (0,5; 1,0; 2,0 UI/ml) no crescimento do microrganismo escolhido (**Tabela 2**). Este planejamento permite a obtenção de um modelo matemático que explica o efeito destas variáveis no crescimento microbiano, permitindo a

otimização do método. A validade desse modelo foi verificada pelo coeficiente de correlação ($r^2 \geq 0,70$) e ajuste (valor de $p \geq 0,05$). Todos os ensaios foram realizados com o microrganismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e a composição de meio de cultura previamente selecionada. A microplaca foi incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM, por 03h45min.

Tabela 2. Estudo da influência da concentração de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), cloreto de trifeniltetrazólio, e bacitracina no crescimento microbiano, usando o meio de cultura nº3 com composição alterada.

Ensaio	Inóculo (%)	CTT (%)	Bacitracina (UI/mL)
#01	5,0	0,2	0,5; 1 e 2
#02	5,0	0,8	0,5; 1 e 2
#03	15,0	0,2	0,5; 1 e 2
#04	15,0	0,8	0,5; 1 e 2
#05*	10,0	0,5	0,5; 1 e 2
#06	3,0	0,5	0,5; 1 e 2
#07	17,0	0,5	0,5; 1 e 2
#08	10,0	0,0	0,5; 1 e 2
#09	10,0	1,0	0,5; 1 e 2
#10	5,0	0,5	0,5; 1 e 2
#11	15,0	0,5	0,5; 1 e 2
#12	10,0	0,2	0,5; 1 e 2
#13	10,0	0,8	0,5; 1 e 2

* Esta condição foi ensaiada 6 vezes

Ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca

O ensaio foi realizado de acordo com as condições experimentais otimizadas. Alíquotas de 20µL das soluções de bacitracina ou da amostra comercial nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 UI/ml foram adicionadas nos poços da microplaca seguindo um delineamento em quadrado latino, que foi adotado para minimizar a variabilidade devido à posição dos poços na microplaca (**Figura 2**). A seguir, foram transferidas alíquotas de 180 µL do meio

de cultura inoculado (em uma proporção de 0,5% de *Staphylococcus aureus*), e a microplaca foi incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM por 03h45min. Após o período de incubação, foram adicionados 50 μL da solução de cloreto de trifêniltetrazólio a 0,2 % (w/v) em todos os poços, e a microplaca foi incubada por mais um período de 15 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM. A leitura da resposta colorimétrica foi realizada a 630 nm, e a potência das amostras comerciais foi calculada com a média das absorbâncias.

Figura 2. Esquema do delineamento em quadrado latino para a distribuição do padrão de bacitracina (P1, P2, e P3 – concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$) e amostras comerciais (A1/B1, A2/B2, e A3/B3 – concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$). CN = controle negativo e CP = controle positivo.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	CN	CN	CN	CP	CP	CP	CN	CN	CN	CP	CP	CP
B	P1	P2	P3	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3
C	P2	P3	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3	P1
D	P3	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3	P1	P2
E	A1	A2	A3	P1	P2	P3	B1	B2	B3	P1	P2	P3
F	A2	A3	P1	P2	P3	A1	B2	B3	P1	P2	P3	B1
G	A3	P1	P2	P3	A1	A2	B3	P1	P2	P3	B1	B2
H	CP	CP	CP	CN	CN	CN	CP	CP	CP	CN	CN	CN

2.4 VALIDAÇÃO DO ENSAIO

Após a otimização de todas as variáveis o ensaio foi validado pela análise dos parâmetros linearidade, precisão, exatidão e robustez. De acordo com a legislação, os limites de detecção e quantificação não são necessários para esta categoria de ensaio. (Brasil, 2003; ICH, 2005).

Linearidade. A linearidade foi avaliada pelo ensaio de diferentes concentrações do antibiótico, variando de 0,25 a 8,0 UI/mL. Os resultados foram analisados por análise de regressão. O paralelismo entre as curvas

obtidas para o padrão de referência e amostra comercial foi confirmado por análise de variância (ANOVA).

Precisão. A precisão foi avaliada como repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pelo desvio padrão do ensaio de seis amostras em um mesmo dia e sob as mesmas condições de trabalho. A precisão intermediária foi avaliada pelo desvio padrão de seis amostras analisadas em dois dias diferentes.

Exatidão. A exatidão foi determinada pela média de recuperação do ensaio, incluindo o processo de extração. Foram preparadas soluções com mistura de excipientes (placebo) e padrão de referência bacitracina, e a extração foi realizada de acordo com a seção **Amostras comerciais de pomada sulfato de neomina e bacitracina zíncica**, que foi realizada conforme monografia da Farmacopeia Americana.

Robustez. A robustez do ensaio foi avaliada durante seu desenvolvimento e otimização. Um planejamento de compósito central foi realizado para estudar os efeitos das diferentes concentrações de cloreto de trifeniltetrazólio e do microrganismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 7468) no crescimento microbiano, e consequentemente na resposta do ensaio.

2.5 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS

Ensaio de difusão em ágar. O ensaio desenvolvido e otimizado foi comparado com o ensaio de difusão em ágar, que foi realizado de acordo com a Farmacopeia Americana. No ensaio de difusão em ágar, 20 ml do meio de cultura ágar de triptona-soja (digesto pancreático de caseína 15,0 g/L, digesto papaínica de soja 5,0 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L, ágar 15,0 g/L) foram transferidos para placas de Petri. A seguir foram adicionados 5 ml do meio de cultura ágar de triptona-soja inoculado com uma suspensão de *Micrococcus luteus* (ATCC 7468) a 3 % ($25 \pm 2\%$ de transmitância a 580nm) sobre o meio de cultura já solidificado. Discos de papel foram imersos nas soluções do padrão de referência ou amostras comerciais (nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 UI/ml) e adicionados às placas de Petri, que foram então incubadas por 18-24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Comparação estatística dos ensaios. Seis amostras comerciais foram analisadas pelo ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca, e pelo ensaio de difusão em ágar. A potência das amostras foi comparada pelo teste T duplo unicaudal (TOST) para verificar a equivalência entre os ensaios. Neste teste, consideramos que dois ensaios são equivalentes se o intervalo de confiança de 90% de suas diferenças está dentro do limite estabelecido como analiticamente similar. Definiu-se que o intervalo para a equivalência do ensaio deveria ser o limite de especificação (90 a 135% do teor rotulado) do teor de bacitracina (LOURENÇO & PINTO, 2012)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO

O crescimento do microrganismo é uma questão de suma importância para o desenvolvimento de um ensaio microbiológico rápido, uma vez que irá refletir tanto na resposta do ensaio como no tempo de incubação necessário (KAVANAGH, 1963). Dentre os microrganismos testados, o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foi o único que apresentou um crescimento regular. Além disso, o *Staphylococcus aureus* apresentou o crescimento rápido e intenso em um curto período de tempo, e desta forma foi o microrganismo de escolha para o ensaio rápido. Experimentos indicaram ser necessário pelo menos 6 horas de incubação para obter um crescimento adequado para a leitura do ensaio.

A composição do meio de cultura é um fator que pode influenciar na taxa de crescimento do microrganismo. Desta forma, é possível minimizar o tempo de incubação necessário pela alteração da composição do meio de cultura (KAVANAGH AND RAGHEB, 1979). A influência de cada componente do meio de cultura no crescimento do microrganismo selecionado foi avaliada por um planejamento fatorial 2^4 , que gerou dezesseis combinações diferentes de meio de cultura. Os resultados deste experimento sugerem que o extrato de levedura é o componente mais significativo para o crescimento do *Staphylococcus aureus* (**Figura 3**).

Figura 3. Gráfico de Pareto para o efeito dos componentes do meio de cultura no crescimento microbiano, usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM, por 3h45min.

Experimentos adicionais mostraram que quanto maior a quantidade de extrato de levedura, maior o crescimento do microrganismo. A concentração de 3,5g/L foi suficiente para obter o mesmo crescimento microbiano em menor tempo, possibilitando reduzir o tempo de incubação de 6 horas para 3h45min (**Figura 4**). Além disso, a sensibilidade do método aumentou dez vezes (de 5,0 – 20,0 para 0,5 – 2,0 UI/ml) com a nova composição do meio de cultura (maior quantidade de extrato de levedura e a mesma proporção dos outros componentes).

A concentração da bacitracina utilizada no ensaio foi determinada baseando-se na inibição de 50% do crescimento microbiano (MIC50) na curva dose-resposta, assegurando o uso da faixa de concentração mais linear no ensaio. O MIC50 foi determinado por uma curva de regressão logística não linear de 4 parâmetros, como apresentado na **Figura 5**.

Figura 4. Efeitos da quantidade de extrato de levedura e tempo de incubação no crescimento microbiano, usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM.

Figura 5. Curva de regressão logística não linear de 4 parâmetros da concentração de bacitracina de 0,25 a 8,0 UI/mL, usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 300 RPM, por 3h45min

O planejamento de compósito central foi realizado para estudar como a concentração de *Staphylococcus aureus* (variando de 5% a 15%), cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) (variando de 0,2% a 0,8% w/v), e bacitracina (variando de 0,5 a 2,0 UI/ml) afetam o crescimento do microrganismo. Foi obtido um modelo matemático que explica o crescimento microbiano em função destas variáveis (**Tabela 3**). Este modelo apresentou valores de coeficiente de correlação (preditivo $r^2 = 0,855$) e ajuste (valor de p para falta de ajuste = 0,996) adequados. De acordo com os resultados do planejamento compósito central, quanto maior a concentração da bacitracina, menor o crescimento microbiano, confirmando que este crescimento será inversamente proporcional à concentração do antibiótico (**Figura 6**).

Tabela 3. Coeficientes do modelo matemático que explica o crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm) como função das concentrações de *Staphylococcus aureus*, cloreto de trifeniltetrazólio, e bacitracina.

Termo*	Coeficiente	p-value
Constante	0,0796	0,000
Concentration de inóculo (linear)	0,0630	0,000
Concentração de CTT (linear)	-0,0056	0,429
Concentração de bacitracina (linear)	-0,0949	0,000
Concentração de CTT (quadrático)	0,0162	0,191
Concentração de bacitracina (quadrático)	0,0439	0,001
Interação da concentração de CTT e bacitracina	-0,0383	0,000

* Termos linear e quadrático de concentração de CTT não foram significantes (p-value > 0.05)

Figura 6. Efeito das concentrações de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (inóculo), e bacitracina no crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm), concentração fixa de CTT a 0,5%.

A intensidade da coloração avermelhada permaneceu constante independente da concentração do cloreto de trifêniltetrazólio, enquanto o crescimento microbiano se mostrou proporcional à quantidade do inóculo (**Figura 7**). A proporção do inóculo deve ser ajustada para cada tipo de ensaio, sendo que ensaios rápidos necessitam de uma alta carga de microrganismo, que fornece maior crescimento microbiano, mas também menor inclinação da curva de calibração (KAVANAGH, 1963). Os resultados mostraram que uma proporção de inóculo de 10 % forneceu um crescimento microbiano suficiente para a leitura do ensaio, assim como inclinação da curva adequada.

Figura 7. Efeitos das concentrações de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (inóculo), e cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) no crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm), concentração fixa de bacitracina em 1,0 UI/mL.

O cloreto de trifeniltetrazólio é uma solução incolor que é reduzida por células viáveis, formando um precipitado de coloração avermelhado chamado formazan. A intensidade dessa coloração é proporcional à quantidade de células viáveis, e consequentemente proporcional a concentração do antibiótico (LIN ET AL., 2008). Os resultados mostraram que mudanças na concentração de cloreto de trifeniltetrazólio não alteraram significadamente a intensidade da coloração avermelhada. Desta forma, a menor concentração foi selecionada para o ensaio (**Figura 8**).

Figura 8. Efeitos das concentrações de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT), e bacitracina no crescimento microbiano (medido em absorbância a 630 nm), inóculo fixo a 10%.

Por fim, as condições experimentais otimizadas foram:

a) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);

b) meio de cultura com composição modificada (peptona 5,0 g/L, extrato de levedura 3,5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, dextrose 1,0 g/L, cloreto de sódio 2,5 g/L, fosfato de potássio monobásico 2,0 g/L and fosfato de potássio dibásico 8,0 g/L);

c) proporção de inóculo de 10%;

d) concentração de cloreto de trifeniltetrazólio de 0,2% (W/v);

e) concentração de bacitracina de 0,5; 1,0 e 2,0 UI/ml.

O estudo das variáveis do ensaio permitiu ainda estabelecer uma região de *design space* para as concentrações de CTT e inóculo que fornecem resultados desejáveis para o crescimento microbiano para doses baixas, médias e altas (2,0; 1,0 e 0,5 UI/mL) de bacitracina, controles positivo e negativo, assim como intercepto, inclinação e coeficiente de correlação da curva dose-resposta (**Figura 9**).

Figura 9. Determinação da região de *design space* para o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca considerando as respostas para as doses baixas, médias e altas de bacitracina (2,0; 1,0 e 0,5 UI/mL), para controles negativos e positivos, assim como para intercepto, inclinação e coeficiente de correlação das curvas dose-resposta.

3.2 VALIDAÇÃO DO ENSAIO

Após o otimizado, o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca foi validado pela avaliação da linearidade, precisão, exatidão e robustez, conforme a legislação vigente. O crescimento microbiano apresentou uma resposta sigmoidal, como pode ser observado na **Figura 3**. Os ensaios foram realizados na faixa da concentração de bacitracina entre 0,5 e 2,0 UI/mL, que corresponde à faixa linear da resposta. No ensaio foi utilizado um delineamento retas paralelas 3x3, e a análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a validade do ensaio. O modelo apresentou linearidade e paralelismo, assim como regressão significativa. Esses resultados foram obtidos com a aplicação do delineamento em quadrado latino, que foi utilizado

para reduzir a variabilidade devido às posições de linhas e coluna na microplaca.

A exatidão do ensaio foi adequada (media de recuperação = 98,7%), assim como a precisão (repetibilidade RSD = 1,3% e precisão intermediária RSD = 3,6 %). A robustez do ensaio foi estudada durante seu desenvolvimento e otimização por meio de um planejamento de compósito central que permitiu verificar como as concentrações de inóculo, cloreto de trifeniltetrazólio e bacitracina interferem no crescimento microbiano, e consequentemente na resposta do ensaio. O ensaio se mostrou robusto às mudanças nas concentrações do inóculo e do antibiótico, dentre da região de *design space*.

3.3 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS

O ensaio microbiológico de difusão em ágar é o ensaio oficial para análise da bacitracina. A comparação do ensaio desenvolvido e validado com o ensaio oficial foi realizada pela análise de seis amostras comerciais por ambos os ensaios. A potência das amostras foi analisada pelo teste T duplo unicaudal (TOST), e os resultados mostraram equivalência entre os ensaios, considerando que estão dentro dos limites de especificação (de 90 a 135% de teor do produto rotulado), conforme a **Figura 10**.

Figura 10. Comparação da potência da bacitracina analisada pelo ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca e o ensaio microbiológico de difusão em ágar.

Uma vez que ambos os ensaios fornecem resultados equivalentes, é importante considerar suas vantagens e desvantagens. Diferente dos ensaios físico-químicos, ambos os ensaios microbiológicos fornecem informação sobre a atividade antimicrobiana do antibiótico. Por outro lado, o ensaio colorimétrico rápido em microplaca apresenta algumas vantagens em relação ao ensaio convencional de difusão em ágar, como o tempo de incubação de 3h45min, enquanto o ensaio convencional necessita de 18 a 24 horas. Além disso, o ensaio colorimétrico necessita de menor quantidade de meio de cultura e soluções em geral que o ensaio convencional.

4. CONCLUSÃO

O ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca para a análise de bacitracina foi desenvolvido e otimizado com uma abordagem racional, onde foram utilizadas metodologias de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta para estudar o efeito da composição do meio de cultura e das concentrações de inóculo, cloreto de trifeniltetrazólio e bacitracina no crescimento microbiano. Este estudo possibilitou reduzir o tempo de incubação do ensaio pela alteração da composição do meio de cultura, além da obtenção das melhores condições experimentais para o ensaio. Depois de desenvolvido e otimizado, o ensaio foi validado e se mostrou preciso, exato, robusto e linear na faixa de 0,5 a 2,0 UI/mL. A comparação estatística com o ensaio de difusão em ágar apontou equivalência entre os ensaios, assegurando a intercambialidade entre eles. Além disso, o ensaio colorimétrico rápido apresentou algumas vantagens em relação ao ensaio convencional, como menor tempo de incubação, e menor quantidade de meio de cultura e soluções necessárias. Desta forma, consideramos que o ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca é uma alternativa considerável para a análise de produtos farmacêuticos contendo bacitracina. Ademais, destacamos que a abordagem racional para otimização das condições experimentais pode ser uma ferramenta útil tanto para a evolução dos ensaios convencionais, quanto para o desenvolvimento de novos ensaios mais rápidos para a análise de diferentes antibióticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplaca para a análise de neomicina e bacitracina foi desenvolvido e otimizado usando metodologias de análise fatorial e análise de superfície e resposta. Depois de desenvolvido e otimizado, o ensaio foi validado de acordo com a legislação, e comparado com o ensaio oficial de difusão em ágar.

- Para o ensaio de análise da neomicina foram testados os microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)). A *Escherichia coli* (ATCC 8739) demonstrou crescimento mais rápido e foi o microrganismo de escolha. Já para o ensaio de análise da bacitracina foram testados os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus luteus* (ATCC 7468) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Destes, o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foi aquele que apresentou um crescimento regular, rápido e intenso sendo o microrganismo de escolha.
- Para o ensaio de análise da neomicina, a composição completa do meio de cultura antibiótico n° 39 foi a composição mais adequada para fornecer um crescimento rápido e intenso da *Escherichia coli* (ATCC 8539). Para a análise da bacitracina, o extrato de levedura apresentou maior influência no crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), assim a composição do meio de cultura n° 3 alterada (maior quantidade de extrato de levedura) foi utilizada para proporcionar um ensaio mais rápido.
- Para o ensaio de análise da neomicina, um período de incubação de 3 horas forneceu respostas de crescimento microbiano adequadas. Inicialmente, o período de incubação para o ensaio de bacitracina foi de cerca de 6 horas, entretanto este período foi reduzido para 3 horas e 45 minutos após otimização da composição do meio de cultura.

- As condições estudadas no planejamento fatorial e análise de superfície e resposta foram otimizadas e as seguintes condições foram obtidas para o ensaio da neomicina: proporção do inóculo de 0,5%, cloreto de trifeniltetrazólio na concentração de 0,5% (w/v), e concentrações de neomicina de 3,0, 4,0 e 5,0 µg/mL; e para o ensaio da bacitracina: proporção do inóculo de 10,0%, cloreto de trifeniltetrazólio na concentração de 0,2% (w/v), e concentrações de bacitracina de 0,5; 1,0 e 2,0 UI/mL.
- O ensaio de análise da neomicina foi validado quanto à linearidade (faixa de 3.0 a 5.0 µg/mL, $r = 0.998$ e 0.994 para as curvas de padrão e amostra, respectivamente), precisão (repetibilidade = 2,8 % e precisão intermediária 4,0), exatidão (média de recuperação = 100,2%), e robustez. Da mesma forma, o ensaio para análise de bacitracina foi validado quanto à linearidade na faixa de 0,5 a 2,0 UI/ml, precisão (repetibilidade = 1,3% e precisão intermediária = 3,6 %), exatidão (média de recuperação = 98,7%) e robustez.
- Análises estatísticas demonstraram equivalência entre os ensaios de difusão em ágar e os ensaios microbiológicos colorimétricos rápidos em microplacas para análise de neomicina e bacitracina.
- O desenvolvimento racional, empregando ferramentas de planejamento de experimento (DoE), proporcionou um conhecimento profundo de como as condições experimentais influenciam a resposta. Além disso, possibilitou a otimização dos métodos, garantindo maior reprodutibilidade.
- O ensaio microbiológico colorimétrico rápido em microplacas apresentou vantagens em relação ao ensaio de difusão e pode ser uma alternativa interessante no controle de qualidade de medicamentos contendo outros agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, A. A.; ELBANNA, T. E.; GAMALELDEEN, N. M. Validated microbiological and HPLC methods for the determination of moxifloxacin in pharmaceutical preparations and human plasma. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 1291-1301. 2012.

ADAMS, E.; LIU, L.; DIERICK, K.; GUYOMARD, S.; NABET, P.; RICO, S.; LOUIS, P.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Neomycin: microbiological or liquid chromatography?. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 17, p. 757-766. 1996.

ADAMS, E.; SCHEPERS, R.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Determination of neomycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**. v. 741, n. 2, p. 233-240. 1996.

BARTLETT, R.C.; MAZENS, M.; GREENFILED, B. Acceleration of tetrazolium reduction by bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 3, p. 327-329. 1976.

BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Structure-activity relationship among the aminoglycoside antibiotics: rule of hydroxyl and amino groups. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v. 4, p. 402-409. 1973.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. v. 11, p. 127-152. 2005.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76, p. 956-977.2008.

BOTELHO, T. S.; LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. J. A. Vancomycin microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 9, n. 2, p. 172-176. 2013.

BRADY, A. J.; KEARNEY, P.; TUNNEY, M. M. Comparative evaluation of 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) and 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulphophenyl)-2*H*-tetrazolium, monosodium salt (WST-8) rapid colorimetric assays for antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and ESBL-producing clinical isolates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 71, p. 305-311. 2007.

BRAZIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Approves the guide for validation of analytical and bioanalytical methods. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

BRITISH Pharmacopoeia. **The Stationary Office**. V.4. London. 2010.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. **McGraw Hill Interamericana do Brasil**. 11 ed. Rio de Janeiro. 2006.

BUTLER, M.S.; COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. **Journal of Antibiotics**. v. 64, p. 413-425. 2011.

CAZEDEY, E. C. L.; SALGADO, H. R. N. A novel and rapid microbiological assay for ciprofloxacin hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 3, n. 5, p. 382-386. 2013.

CIESIOLKA, J.; JEZOWSKA-BOJCZUK, M.; WRZZESINSKI, J.; STOKOWA-SOLTYS, K.; NAGAJ, J.; KASPROWICS, A.; BLAZCYK, L.; SZCZEPANIK, W. Antibiotic bacitracin induces hydrolytic degradation of nucleic acids. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1840, p. 1782-1789. 2014

CLAROT, I.; REZAZZETI, A.; AUZEIL, N.; LAADANI, F.; CITTON, M.; NETTER, P.; NICOLAS, A. Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light-scattering detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1087, n. 1-2, p. 236-244. 2005.

DAFALE, N. A.; SEMWAL, U. P.; AGARWAL, P. K.; SHARMA, P.; SINGH, G. N. Quantification of ceftriaxone sodium in pharmaceutical preparations by a new validated microbiological bioassay. **Analytical Methods**. v. 4, p. 2490-2498. 2012.

DAFALE, N.A.; AGARWAL, P.K.; SEMWAL, U.P.; SINGH, G.N. Development and validation of microbial bioassay for the quantification of potency of the antibiotic cefuroxime axetil. **Analytical Methods**. v. 5, p. 690-698. 2013.

DART, R. K. Microbiology for the analytical chemist. **The Royal Society of Chemistry**. 1996.

DHANDHUKIA, P. C.; THAKKAR, V. R. Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasioidiplodia theobromae*. **Journal of Applied Microbiology**. v.105, p. 636-643. 2008.

DRISCOLL, A. J.; BATH, N.; KARRON, R. A.; O'BRIEN, K. L.; MURDOCH, D. R. Disk diffusion bioassays for the detection of antibiotic activity in body fluids: Applications for the pneumonia etiology research for child healthy project. **Clinical Infectious Diseases**. V. 54, p. 159-164. 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5 ed. Brasília. 2010.

FIORENTINO, F. A. M.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 49, n. 2, p. 351-358. 2013.

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

FRUTOS, P.; TORRADO, S.; PEREZ-LORENZA, M.E.; FRUTOS, G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 21, p. 1149-1159. 2000.

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

GOTTARDI, W.; PFLEIDERER, J.; NAGL, M. The Integral Method, a new approach to quantify bactericidal activity. **Journal of Microbiological Methods**. v. 115, p. 71-78. 2015

GRUMEZESCU, A. M.; GHITULICA, C. D.; VOICU, G.; HUANG, K.; YANG, C.; FICAI, A.; VASILE, B. S.; GRUMEZESCU, V.; BLEOTU, C.; CHITIRIUC, M. C. New silica nanostructure for the improved delivery of topical antibiotics used in the treatment of staphylococcal cutaneous infections. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 463, p. 170-176. 2014.

GUAN, B.; YUAN, D. X. Determination of neomycin in water samples by high performance anion chromatography with pulsed amperometric detection. **Chinese Chemical Letters**. v. 18, n. 2, p. 201-204. 2007.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. **Química Nova**. v. 33, p. 667-679. 2010.

HANKO, V. P.; ROHRER, J. S. Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, p. 131-141. 2007.

HANRAHAN, G.; LU, K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v.36, p. 141-151. 2006.

HEWITT, W. Microbiological assay: an introduction to quantitative principles and evaluation. **Academic Press**. 1977.

HOLOWACHUCK, S. A.; BAL'A, M. F.; BUDDINGTON, R. K. A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids. **Journal of Microbiological Methods**. v. 55, p. 441-446. 2003

HUIDOBRO, A. L.; GARCIA, A.; BARBAS, C. Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 49, n.5, p.1303-1307. 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. Geneva, 2005.

ISOHERRANEN, N.; SOBACK, S. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. **Journal of AOAC International** v. 82, p. 1017-1045. 1999.

JAPANESE Pharmacopoeia. **The society of Japanese Pharmacopoeia**. 16 ed. Tokio. 2011.

JUNILLON, T.; FLANDROIS, JP. Diminution of 2,3,6-triphenyltetrazolium chloride toxicity on *Listeria monocytogenes* growth by iron source addition to the culture medium. **Food Microbiology**. v. 38, p. 1-5. 2014.

JUNILLON, T.; MORAND, L.; FLANDROIS, JP. Enhanced tetrazolium violet reduction of *Salmonella* spp. by magnesium addition to the culture media. **Food Microbiology**. v. 42, p. 132-135. 2014.

JUNILLON, T.; VIMONT, A.; MOSTICONE, D.; MALLIN, B.; BARIL, f.; ROZAND, C.; FLANDROIS, JP. Simplified detection of food-borne pathogens: An in situ high affinity capture and staining concept. **Journal of Microbiological Methods**. v. 91, p. 501-505. 2012.

KAVANAGH, F. Analytical microbiology. **Academic Press**. 1963.

KAVANAGH, F. Analytical microbiology. v. 2. **Academic Press**. 1972.

KAVANAGH, F.; RAGHEB, H. S. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: Considerations for assuring accuracy. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**. v. 62, n.4, p. 943-950. 1979.

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**. v. 81, p. 121-126. 2010.

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

LEHTINEN, J.; JARVINEN, S.; VIRTÄ, M.; LILJUS, E.M. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multispot microplate assay. **Journal of Microbiological Methods**. v. 66, p. 381-389. 2006.

LIN, Y.-C.; AGBANYIM, C. N. M.; MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. J.; KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Tetrazolium reduction methods for assessment of substrate oxidation and strain differentiation among mycoplasmas, with particular reference to *Mycoplasma bovis* and some members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 492-501. 2008.

LIO, P. A., KAYE, E. T. Topical Antibacterial Agents. **Medical Clinics of North America**. v. 95, p. 703-721. 2011

LOURENÇO, F. R. **Doseamento microbiológico de apramicina – desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplacas**. São Paulo, 2009. 155p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. J. A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n.3, p. 574-584. 2011

LOURENÇO, F.R.; BARBOSA, E.A.; PINTO, T.J.A. Microbiological assay for apramycin soluble powder. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 30, p. 554-557. 2011.

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

LOURENÇO, F.R.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Validation of erythromycin microbiological assay using an alternative experimental design. **Journal of AOAC International**. v. 90, p. 1107-1110. 2007.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, p. 573-584. 2011.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Assessment of pharmaceutical equivalence: difference test or equivalence test? **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 31, p. 597-604. 2012.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, p. 559-566. 2009.

LOURENÇO, F.R.; TRAPLE, M.A.L.; OKAMOTO, R.T.; PINTO, T.J.A. Development and validation of microbiological assay for ceftriaxone and its application in photo-stability study. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 9, p. 77-81. 2013.

MAHMOUDI, A.; FOURAR, R. E. –A.; BOUKHECHEM, M. S.; ZARKOUT, S. Microbiological assay for the analysis of certain macrolides in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 491, p. 285-291. 2015.

MASCHER, D. G.; UNGER, C. P.; MASCHER, H. J. Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, p. 691-700. 2007.

MING, L.; EPPERSON, J. D. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 91, p. 46-58. 2002.

MASCHER, D. G.; URGER, C. P.; MASCHER, H. J. Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, n. 2, p. 691-700. 2007.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, p. 727-737. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Approves the guide for validation of analytical and bioanalytical methods. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brazil, 2003.

MOHAMMADZADEH, A.; FARNIA, P.; GHAZVINI, K.; BEHDANI, M.; RASHED, T.; GHANAAT, J. Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology** v. 55, p. 1657-1659. 2006.

OERTEL, R.; NEUMEISTER, V.; KIRCH, W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. **Journal of Chromatography A**. v. 1058, n. 1-2, p. 197-201. 2004

OERTEL, R.; RENNER, U.; KIRCH, W. Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, n. 3, p. 633-638. 2004.

OTHMAN, M.; LOH. H. S.; WIART, C.; KHOO, T. J.; LIM, K. H.; TING, K. N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**. v. 84, p. 161-166. 2011.

PALLAGI, E.; AMBRUS, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; CSÓKA, I. Adaptation of the quality by design concept in early pharmaceutical development of an intranasal nanosized formulation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 491, p. 384-392. 2015.

PAVLI, V.; KMETEC, V. Optimization of HPLC method for stability testing of bacitracin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, p. 977-982. 2001.

PEDROSO T. M.; SALGADO H. R. N. Development and validation of a microbiological assay by turbidimetry to determine the potency of cefazolin sodium in the lyophilized powder form. **Analytical Methods**. v. 6, p. 1391-1396. 2014.

PENDELA, M.; ADAMS, E.; HOOGMARTENS, J. Development of a liquid chromatography method for ear drops containing neomycin sulphate, polymyxyn B sulphate and dexamethasone sodium phosphate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 36, n. 4, p. 751-757. 2004.

PERAMAN, R.; BHADRAYA, K.; REDDY, Y.P. Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics. **International Journal of Analytical Chemistry**. v. 2015, p. 1-9. 2015.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3.ed. São Paulo: **Atheneu**. 2010.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A. F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 4. ed. São Paulo. **Manole**. 2015.

PINTO, Y.C.; FRANCISCO, F.L.; LOURENÇO, F.R. Relationship assessment among content of aminoglycoside antibiotic components by HPLC and C13-NMR and their microbiological assay potencies. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 22, p. 2823-2831. 2013.

POTTS, A. R.; PSUREK, T.; JONES, C.; PARRIS, L.; WISE, A. Validation of a quantitative HPLC method for bacitracin and bacitracin zinc using EDTA as a mobile-phase modifier. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 70, p. 619-623. 2012.

PROCTOR, L.M.; & SOUZA, A.C. Method for enumeration of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC)-active cells and cell-specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments. **Journal of Microbiological Methods**. v. 43, p. 213-222. 2001.

RIPPERE, R. A. Some principles of microbiological turbidimetric assays of antibiotics. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**. v. 62, n.4, p.951-956. 1979.

ROBERTSON, J.H.; BAAS, R.; YEAGER, R.L.; TSUJI, K. Antimicrobial activity of neomycin C against *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Chromatography B**. v.22, p.1164-1165. 1971.

SABAEIFARD, P.; ABDI-ALI, A.; SOUDI, M. R.; DINARVAND, R. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. **Journal of Microbiological Methods**. v. 105, p. 134-140. 2014.

SARRI, A. K.; MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. Development of a novel liquid chromatography – Evaporative light scattering detection method for bacitracins and applications to quality control of pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**. v. 573-574, p. 250-257. 2006.

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

SCHMIDT, C.A.; AGARRAYUA, D.A.; LAPORTA, L.V.; MACHADO, J.C.; MANFIO, M.L.; BITTENCOURT, C.F. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. **Journal of Microbiological Methods**. v. 77, p. 308-315. 2009.

SHIVHARE, M.; MCCREATH, G. Practical Considerations for DoE Implementation in quality by design. **Bioprocess Technical**. v. 8, p.22-30. 2010

SILVA, L. M.; SALGADO, H. E. N. Rapid turbidimetric assay to potency evaluation of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Microbiological Methods**. v. 110, p. 49-53. 2015.

SIN, D. W.; WONG, Y. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 22, p. 799-809. 2003.

SMITH, S.D.; WHEELER, M.A.; WEISS, R.M. Detection of urinary tract infections by reduction of nitroblue tetrazolium. **Kidney International**. v. 54, p. 1331-1336. 1998.

SRINUBABU, G.; RAJU, C.A.I.; SARATH, N.; KUMAR, P.K.; RAO, J.V.L.N.S. Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using an experimental design. **Talanta**. v. 71, p.1424-1429. 2007.

SRISOM, P.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S.; SLATER, J. M.; WANGKARN, A. Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, n. 3, p. 1013-1018. 2007.

STEAD, D. A.; RICHARDS, R. M. E. Sensitive high-performance liquid chromatography assay for aminoglycosides in biological matrices enables the direct estimation of bacterial drug uptake. **Journal of Chromatography B: Biomedical sciences and Applications**. v. 693, n. 2, p. 415-421. 1997.

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

STYPULKOWSKA, K.; BLAZEWICZ, A.; FIJALEK, Z.; WAEOWNA-GRZESKIEWICZ, M.; SREBRZYNSKA, K. Determination of neomycin and related substances in pharmaceutical preparations by reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometry and charged aerosol detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.76, p. 207-214. 2013.

TAWA, R.; MATSUNAGA, H.; FUJIMOTO, T. High-performance liquid chromatography analysis of aminoglycoside antibiotics. **Journal of Chromatography A**. v. 812, n. 1-2, p. 141-150. 1998.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution. **Analytical Methods**. v. 5, p.5923-5928. 2013.

TSUKATANI, T.; SUENAGA, H.; HIGUCHI, T.; AKAO, T.; ISHIYAMA, M.; EZOE, K.; MATSUMOTO, K. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. **Journal of Microbiological Methods**. v. 75, p. 109-116. 2008.

TSUKATANI, T.; HIGUCHI, T.; SUENAGA, H. AKAO, T.; ISHIYAMA, M.; EZOE, T.; MATSUMOTO, K. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. **Analytical Biochemistry**. v. 393, p. 117-125. 2009.

UNITED STATES Pharmacopeia. **United States Pharmacopoeial Convention**. 35 ed. Rockville. 2012

VASTRAD, B.M.; NEEGULAND, S.E. Optimization and production of neomycin from different agro industrial wastes in solid state fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drugs Research**. v.3, n.2, p. 104-111. 2011.

WHO. The International Pharmacopoeia. **World Health Organization**. 4 ed., 3rd Supplement. 2013.

YAMAMOTO, C. H.; PINTO, T. J. A. Rapid determination of neomycin by a microbiological agar diffusion assay using triphenyltetrazolium chloride. **Journal of AOAC International**. v. 79, n.2, p. 434-440. 1996

ZAWILLA, N. H.; DIANA, J.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Analysis of neomycin using an improved liquid chromatography method combined with pulsed electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**. v. 833, n. 2, p. 191-198. 2006.