

ANA GABRIELA REIS SOLANO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS
PARA DOSEAMENTO DE GRAMICIDINA MATÉRIA-PRIMA**

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2008

ANA GABRIELA REIS SOLANO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA DOSEAMENTO DE GRAMICIDINA MATÉRIA-PRIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elzília de Aguiar Nunan

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da Ufmg
2008

S684d Solano, Ana Gabriela Reis.
Desenvolvimento de método microbiológico analítico para
determinação de gramicidina em matéria-prima / Ana Gabriela Reis
Solano. – 2009.
262 f. : il.

Orientador: Prof^a. Elzília de Aguiar Nunan.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Antibióticos – Teses. 2. Gramicidina – Teses. 3. Medicamentos
– Controle de qualidade. I. Título. II. Nunan, Elzília de Aguiar. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD 615.19

*Quem, de três milênios,
Não é capaz de se dar conta
Vive na ignorância, na sombra,
À mercê dos dias, do tempo.*

Johann Wolfgang von Goethe

Dedico este trabalho a minha mãe lêda (*in memorian*),
a maior incentivadora de meus estudos, pelo exemplo
de bondade, caráter, coragem e tantas outras
qualidades que fazem me orgulhar de ser sua filha. Por
ter se dedicado de forma incondicional em minha
formação pessoal e profissional.

À Prof^a. Elzília pela orientação
e exemplo de competência e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível se não fosse a colaboração e apoio de muitas pessoas, as quais dedico meus sinceros agradecimentos.

A minha mãe, lêda (*in memorian*), pelo carinho, cuidado, apoio e amor incondicionais, por acreditar sempre em mim e por me ensinar a não desistir, mas sim, persistir em meus objetivos, enfim, pelo exemplo de vida. Te amo sempre.

A Prof^a. Dr^a. Elzília pela orientação, confiança depositada, amizade, carinho, ensinamentos e pela enorme contribuição em minha formação profissional.

Aos amigos do CEDAFAR, Eld, Sônia, Nilton, Mariinha, Luciano, Renan e Léo pelo apoio e auxílio. Em especial a Tânia, Márcia e Edna pela colaboração no desenvolvimento da parte experimental, e à Mirian pela idealização do projeto, sugestões, discussão de idéias durante a realização das análises no CEDAFAR e pelas vezes que me liberou mais cedo para execução dos experimentos.

Aos demais pós-graduandos, em especial ao André, Gui, Isabel, Paula, Martinha, Andrezinho, Taízia e Giovani pelos “momentos de confraternização do desespero” em que todos expunham a angústia dos problemas experimentais. Também pelos momentos de alegria, de troca de idéias e conhecimentos que contribuíram tanto para realização deste trabalho.

Aos farmacêuticos da farmacopéia, Fernando e Isabela, pela atenção dispensada e colaboração na realização das análises cromatográficas.

A todos os professores da graduação e da pós-graduação pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos professores do Controle de Qualidade, Ligia, Pianetti e Cristina pela atenção e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Rodrigo dos Reis (UERJ) pela disponibilidade e interesse em discutir sobre o fenômeno da difusão.

Aos membros do colegiado da Pós-graduação e da biblioteca pelo auxílio quando se fez necessário.

Ao Prof. Dr. Márcio Mattos e Rosemary Alves (Rose) pela dedicação ao programa de pós-graduação por vários anos.

A Larissa pela enorme contribuição no desenvolvimento das atividades práticas.

A Lúcia e aos estagiários do controle microbiológico (Michele, Fernando e Diana) pelo auxílio.

Ao laboratório Kinder pela doação da matéria-prima.

Aos meus avós (Abílio e Percília) e meu tio Gil por estarem sempre ao meu lado e se preocuparem tanto comigo.

Ao meu pai (Humberto) e minha irmã (Michelle) pelo apoio, carinho e torcida.

Aos meus amigos, Cris, Ceci, Silvio, Mary, Miroca, Thais (Maninha), Kelly (Mãe) e tantas outras pessoas pela paciência e apoio durante essa caminhada.

Ao Ricardo (Ri) pelo apoio, “puxões de orelha” ao me lembrar que dormir faz bem a saúde, pela paciência ao me escutar discursar sobre os ensaios que ora produziam resultados adequados, ora não e pela compreensão dos fins de semana que não nos encontramos por eu estar trabalhando com meus “bichinhos”.

Ao Toninho, Elisa, Iêda e toda família que me acolheram de forma tão carinhosa.

A Deus que nos deu a vida e sem o qual nada seria possível.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

A gramicidina é um pentadecapeptídeo linear antimicrobiano produzido pelo *Bacillus brevis* e ativo contra bactérias Gram positivo. O método microbiológico turbidimétrico é preconizado para o doseamento de gramicidina (USP 31 e BP 2007). Contudo, não se conseguiu reproduzir a metodologia farmacopéica em laboratório. Além disso, o método por difusão em ágar, uma outra alternativa para o doseamento, não é descrito para este antibiótico. Em vista do exposto, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar os métodos microbiológicos, por difusão em ágar e turbidimétrico, para o doseamento da gramicidina. O método em placas foi desenvolvido empregando o ágar nutriente e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como microrganismo teste. Foram utilizados dois delineamentos: retas paralelas 3x3 e 5x1. A validação do método demonstrou ser linear a relação entre o diâmetro dos halos de inibição e o logaritmo da concentração numa faixa de 5 a 25,3 µg/ml. Os resultados obtidos por ambos os delineamentos foram precisos (desvio padrão relativo, DPR, para precisão intra-dia: 0,81 – 3x3; 1,90 – 5x1; DPR inter-dias: 1,35 – 3x3; 2,64 – 5x1), exatos (intervalo de tolerância a 95% dentro dos limites permitidos) e com veracidade adequada (erros sistemáticos não significativos). Além disso, o método foi seletivo com limites de detecção e quantificação inferior e superior iguais a 2,00; 5,00 e 25,3 µg/ml, respectivamente. Não foi observada diferença entre a precisão dos delineamentos empregados no método de difusão em ágar ($p > 0,05$). O método turbidimétrico utilizando caldo GCLT (formulação desenvolvida no laboratório) e *Enterococcus hirae* ATCC 10541 foi validado. Também foram empregados os delineamentos 3x3 e 5x1. A curva analítica demonstrou ser linear a relação entre a porcentagem de inibição do crescimento microbiano e a concentração de gramicidina no intervalo de 0,08 a 0,88 µg/ml. Os resultados obtidos por ambos os delineamentos também foram precisos (DPR intra-dia: 0,18 – 3x3; 2,32 – 5x1; DPR inter-dias: 0,69 – 3x3; 2,47 – 5x1), exatos e com veracidade adequada. Os limites de detecção, de quantificação inferior e superior foram iguais a 0,06; 0,08 e 0,88 µg/ml, respectivamente. Quando o delineamento 3x3 foi utilizado para o método turbidimétrico, resultados mais precisos foram obtidos. Foi verificada a inexistência de diferença significativa entre as precisões dos dois métodos quando o delineamento 3x3 foi empregado e nem quando o 5x1 foi utilizado.

Palavras chaves: gramicidina, método por difusão em ágar, método turbidimétrico.

ABSTRACT

Gramicidin is a linear N-formylated pentadecapeptide-ethanolamide complex and active against Gram-positive organisms. It was first isolated from *Bacillus brevis*. The turbidimetric method is described in the United States Pharmacopoeia and British Pharmacopoeia to analyze gramicidin. Moreover, the results obtained in this assay were no satisfactory. The diffusion method is no described to analyze gramicidin. The present study reports the development and validation of the microbiological assays, applying the cylinder-plate and tube-assay, for the quantitation of gramicidin in raw material. The cylinder-plate method was developed using nutrient agar and a strain of *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 as the test organism. The 3x3 and 5x1 experimental designs were applied. The validation of the method demonstrated that the method was precise (intra-assay: R.S.D. 0.81 – 3x3; 1.90 – 5x1; inter-assay: R.S.D. 1.35 – 3x3; 2.64 – 5x1), accurate (the 95% tolerance interval obtained was totally included within the acceptance limits) and selective. The calibration curve was linear from 5.00 to 25.3 µg/ml. The detection, lower and upper quantification limit were 2.00; 5.00 and 25.3 µg/ml, respectively. The F-test indicated that there is no significant difference between the two designs applied in the diffusion assay. The turbidimetric method was developed using GCLT broth (formulated in the laboratory) and *Enterococcus hirae* ATCC 10541 as the test organism. Also the 3x3 and 5x1 experimental designs were applied. The calibration curve was linear from 0.08 to 0.88 µg/ml. The results obtained in this assay were precise (intra-assay: R.S.D. 0.18 – 3x3; 2.32 – 5x1; inter-assay: R.S.D. 0.69 – 3x3; 2.47 – 5x1) and accurate (the 95% tolerance interval obtained was totally included within the acceptance limits). The detection, lower and upper quantitation limit were 0.06; 0.08 and 0.88 µg/ml, respectively. When turbidimetric assay was used, the 3x3 design was more precise than 5x1. The F-test indicated that there is no significant difference between the precision of two methods ($p>0,05$).

Keywords: gramicidin, diffusion assay, turbidimetric method.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Origem e obtenção de gramicidinas	28
3.2 Gramicidina – propriedades físico-químicas.....	29
3.3 Mecanismos de ação.....	31
3.4 Especialidades farmacêuticas e seu emprego	34
3.5 Métodos de doseamento microbiológico	35
3.6 Delineamentos de ensaios microbiológicos.....	54
3.7 Métodos para doseamento da tirotricina e gramicidina	57
3.8 Validação de métodos analíticos	65
4 MATERIAIS	75
4.1 Microrganismos padrão	76
4.2 Amostra	76
4.3 Reagentes	76
4.4 Meios de cultura	76
4.5 Vidrarias e outros materiais	76
4.6 Equipamentos.....	77
4.7 Soluções	77
5 MÉTODOS	78
5.1 Controle da matéria-prima	79
5.2 Preparo de material	80
5.3 Desenvolvimento do método de difusão em ágar com meio de cultura para antibióticos nº1.....	80
5.4 Desenvolvimento do método de difusão com ágar nutriente.....	84
5.5 Validação do método de difusão com ágar nutriente	86
5.6 Doseamento de gramicidina matéria-prima empregando o método de difusão em ágar nutriente.....	94
5.7 Cálculo de potência pelo método de difusão em ágar.....	96
5.8 Método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina segundo compêndios oficiais	97
5.9 Desenvolvimento do método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina	99
5.10 Validação do método turbidimétrico	101
5.11 Doseamento de gramicidina matéria-prima empregando o método turbidimétrico	110
5.12 Cálculo de potência	112
5.13 Estudo da interferência de peptonas na atividade de gramicidina contra <i>E. hirae</i>	112
5.14 Cálculos estatísticos	113

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
6.1 Controle da matéria-prima utilizada	117
6.2 Desenvolvimento do método de difusão em ágar com meio de cultura para antibióticos nº1.....	119
6.3 Desenvolvimento do método de difusão utilizando ágar nutriente	126
6.4 Validação do método de difusão com ágar nutriente	135
6.5 Doseamento de gramicidina matéria-prima empregando o método de difusão em ágar nutriente.....	154
6.6 Método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina segundo compêndios oficiais	157
6.7 Desenvolvimento do método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina	160
6.8 Validação do método turbidimétrico	168
6.9 Doseamento da gramicidina matéria-prima empregando o método turbidimétrico ..	184
6.10 Comparação entre os métodos desenvolvidos: difusão em placas e turbidimétrico	186
6.11 Estudo da interferência de peptonas na atividade de gramicidina contra <i>E. hirae</i> . 186	
7 CONCLUSÕES	190
7.1 Método por difusão em ágar.....	191
7.2 Método turbidimétrico	192
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
APÊNDICES	207
ANEXOS	252

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Apresentações farmacêuticas comercializadas no Brasil, contendo a associação gramicidina, nistatina, sulfato de neomicina e acetono de triancinolona, e seus respectivos produtores.....	22
Tabela 2. Atividade biológica da gramicidina S.....	59
Tabela 3. Atividade biológica da gramicidina S contra bactérias Gram-positivo, Gram-negativo e levedura.	59
Tabela 4. Descrição dos métodos turbidimétrico existentes para doseamento da tirotricina ⁽ⁱ⁾ e gramicidina ⁽ⁱⁱ⁾	62
Tabela 5. Condições cromatográficas para determinação de polimixina B, neomicina e gramicidina.	65
Tabela 6. Classificação dos testes segundo sua finalidade.....	66
Tabela 7. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.	66
Tabela 8. Concentrações das soluções de trabalho e diluentes utilizados.....	81
Tabela 9. Concentrações das soluções de trabalho de gramicidina, diluentes e número de placas utilizadas (n).....	84
Tabela 10. Concentrações das soluções de teste e diluentes utilizados.....	97
Tabela 11. Concentrações de inóculos testadas.	98
Tabela 12. Concentrações das soluções de teste e diluentes utilizados.....	100
Tabela 13. Valores médios \pm dp dos halos de inibição (mm) obtidos para <i>K. rhizophila</i> empregando inóculo a 0,25% e soluções de gramicidina a 15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 μ g/ml preparadas em diferentes diluentes (n=5).....	124
Tabela 14. Valores médios \pm dp do diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos para <i>K. rhizophila</i> empregando inóculo de concentração 0,25% e soluções de etanol 0,48 a 7,60% (V/V) preparadas em tampão n ^o 3 (n=6).....	129
Tabela 15. Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, coeficiente de correlação - r e coeficiente de determinação - r ²) para gramicidina na faixa de 5,00 a 25,3 μ g/ml.....	137
Tabela 16. Diâmetro médio \pm dp dos halos de inibição obtido para polissorbato 80 1%; produto de degradação a 5,00; 10,0; 11,3 e 20,0 μ g/ml (n=8).	141
Tabela 17. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão intra-dia de gramicidina em três níveis de concentração.....	143

Tabela 18. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão inter-dias de gramicidina em três diferentes níveis de concentração.	144
Tabela 19. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão intra-dia de gramicidina em três concentrações (n=3).	147
Tabela 20. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão inter-dias de gramicidina em três concentrações.	148
Tabela 21. Média das médias corrigidas do diâmetro dos halos de inibição \pm dp obtida para polissorbato 80 1% e soluções de gramicidina a 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).	150
Tabela 22. Valores de potências percentuais, concentração calculada e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação inferior (n=2).	151
Tabela 23. Valores de potências percentuais, concentração calculada e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação superior.	152
Tabela 24. Valores de potência, limite de confiança a 95 % calculado e crítico para doseamento de gramicidina.	155
Tabela 25. Valores de potência e limite de confiança a 95 % calculado e crítico para doseamento de gramicidina.	157
Tabela 26. Valores médios de absorvância (unidade de absorvância) \pm dp obtidos para <i>E. hirae</i> em meio n ^o 3, utilizando soluções de gramicidina 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$ (n=3) e tempo de incubação de 2h30min.	158
Tabela 27. Valores médios de absorvância \pm dp obtidos para <i>S. aureus</i> e <i>E. hirae</i> em meio n ^o 3, utilizando soluções de gramicidina 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).	159
Tabela 28. Valores dos parâmetros da equação das sigmóides obtidas nos ensaios com tampão n ^o 2 e álcool etílico a 95%.	162
Tabela 29. Parâmetros de linearidade (intercepto - <i>a</i> , inclinação - <i>b</i> , coeficiente de correlação - <i>r</i> e coeficiente de determinação - <i>r</i> ²) para as curvas analíticas de gramicidina na faixa de 0,08 a 0,88 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).	169
Tabela 30. Leitura média de absorvância \pm dp obtida para branco inoculado e produto de degradação a 0,28; 0,48 e 0,68 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).	171
Tabela 31. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão intra-dia de gramicidina em três níveis de concentração.	172
Tabela 32. Valores de potências percentuais, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão inter-dias de gramicidina em três diferentes níveis de concentração.	173

Tabela 33. Valores de potências e intervalo de confiança percentuais, potências médias e desvio padrão relativo para precisão intra-dia de gramicidina em três concentrações.	176
Tabela 34. Valores de potências e intervalo de confiança a 95% percentuais, potências médias e desvio padrão relativo para precisão inter-dias de gramicidina em três concentrações.	177
Tabela 35. Leitura média de absorvância \pm dp obtida para álcool etílico a 95% e soluções de gramicidina a 0,01; 0,02; 0,04 e 0,06 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).	179
Tabela 36. Valores de potências percentuais e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação inferior (n=3).	180
Tabela 37. Valores de potências percentuais, concentração calculada e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação superior.	181
Tabela 38. Valores de potência, limite de confiança a 95 % calculado e crítico para gramicidina matéria-prima.	185
Tabela 39. Valores de potência, limite de confiança a 95% calculado e crítico para gramicidina matéria-prima.	185
Tabela 40. Concentração de gramicidina inibitória a 50% (IC50) determinada para <i>E. hirae</i> , empregando diferentes meios de cultura.	189

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado do fracionamento de substâncias antimicrobianas de cultura de *Bacillus brevis*. 28
- Figura 2.** Estruturas das gramicidinas A₁, A₂, B₁, C₁, C₂, S e tirocidina. Estes peptídeos são sintetizados pelo *Bacillus brevis* e apresentam atividade antimicrobiana. 29
- Figura 3.** As duas principais conformações do dímero da gramicidina: (A) dímero helicoidal e (B) dupla-hélice..... 30
- Figura 4.** Características da distribuição dos resultados de uma medida: x_0 , valor verdadeiro; m , valor mais provável (esperado); x_i , valor observado a i medida; e_i , erro aleatório; δ , erro sistemático (bias), σ , desvio..... 71
- Figura 5.** Erros sistemáticos fixo e relativo: m_c , concentração determinada; c_e , concentração esperada..... 71
- Figura 6.** Posicionamento dos cilindros na placa de Petri. 82
- Figura 7.** Posicionamento dos cilindros na placa de Petri. (P₃) solução padrão de gramicidina 11,3 µg/ml; (P) solução padrão de gramicidina 5,00; 7,50; 16,9 ou 25,3 µg/ml. 87
- Figura 8.** Posicionamento dos cilindros na placa de Petri. (P₁, P₂ e P₃) soluções padrão de gramicidina 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml; (A₁, A₂ e A₃) soluções teste de gramicidina..... 89
- Figura 9.** Esquema da obtenção das cepas de *E. hirae* de diferentes idades..... 109
- Figura 10.** Foto da cromatoplaça obtida pela aplicação de 1, 10 µL de solução de matéria-prima (A e C) e 1, 10 µL de solução de referência (B e D)..... 117
- Figura 11.** Cromatograma obtido por CLAE com eluição em água:metanol (29:71) de gramicidina padrão (a) e matéria-prima (b). Em (c) sobreposição dos cromatogramas de gramicidina padrão (____) e matéria-prima (_ _ _). 118
- Figura 12.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. hirae* empregando tampão n^o1 como diluente, inóculos a 0,25% (A) e 0,5% (B) e meios base e superfície. 120
- Figura 13.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,25%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 15,0 a 100 µg/ml em acetona pa $y = (7,81 \pm 0,20) + (1,23 \pm 0,12)x$, acetona 80% $y = (7,66 \pm 0,28) + (1,37 \pm 0,17)x$ e acetona 60% $y = (8,22 \pm 0,29) + (0,95 \pm 0,18) x$. 124
- Figura 14.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,25%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 15,0 a 100 µg/ml em tampões n^o1, 2 e 3. 125

- Figura 15.** Logaritmo da concentração de gramicidina (15,0 a 100 µg/ml) versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando tampão n°3 como diluente, inóculo a 0,25% e ágar nutriente base e superfície (n = 4). Equação da reta: $y = (13,78 \pm 0,33) + (1,07 \pm 0,20) x$. Coeficiente de correlação (r) 0,78. 127
- Figura 16.** Logaritmo da concentração de gramicidina (5,00 a 80,0 µg/ml) versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando tampão n°3 como diluente, inóculo a 0,25% e ágar nutriente base e superfície (n = 6). Equação da reta: $y = (11,34 \pm 0,23) + (2,29 \pm 0,16) x$ Coeficiente de correlação (r) 0,93. 128
- Figura 17.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,25%, soluções de gramicidina 5,00 a 80,0 µg/ml em polissorbatto 80 1% e como meios base e superfície: ágar nutriente contendo glicerol a 3% $y = (3,32 \pm 0,25) + (7,98 \pm 0,42) x + (-1,77 \pm 0,16) x^2$, (n=5); e ágar nutriente $y = (6,28 \pm 0,67) + (6,31 \pm 1,10)x + (-1,92 \pm 0,42)x^2$, (n=5). 131
- Figura 18.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 8,00 a 40,5 µg/ml em polissorbatto 80 1% (n=4). 134
- Figura 19.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml em polissorbatto 80 1%; $y = (9,18 \pm 0,15) + (3,57 \pm 0,13)x$; coeficiente de correlação $r=0,988$; (n=4). 135
- Figura 20.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus média corrigida do diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície e soluções de gramicidina 5,00 a 25,3 µg/ml em polissorbatto 80 1%. Dia 1 A e B são retas de um mesmo dia; dia 2, 3 e 4 são retas obtidas em dias diferentes. 137
- Figura 21.** Cromatograma obtido por CLAE com eluição em água:metanol (29:71 V/V) de gramicidina matéria-prima (a) e hidrolisado (b). Em (c) sobreposição dos cromatogramas de matéria-prima (___) e hidrolisado (_ _ _). 139
- Figura 22.** Logaritmo da concentração de gramicidina e de seu produto de degradação versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície; soluções padrão de gramicidina e de produto de degradação a 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml em polissorbatto 80 1%. Curva do padrão: $y = (8,15 \pm 0,14) + (3,55 \pm 0,13) x$; n=8. 140
- Figura 23.** Placa com halos de inibição produzidos pelas soluções do produto de degradação (seco) e de gramicidina (P₃) a 11,3 µg/ml. 141
- Figura 24.** Gráfico de potência verdadeira versus potência determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (0,46 \pm 2,10) + (1,00 \pm 0,02)x$ 145

- Figura 25.** Gráfico de erro relativo versus potência relativa, com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho). 146
- Figura 26.** Gráfico de potência verdadeira versus potência determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Retas ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (0,19 \pm 0,096) + (0,99 \pm 0,01)x$ 149
- Figura 27.** Gráfico de erro relativo versus concentração de gramicidina, com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho). 149
- Figura 28.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus média corrigida do diâmetro dos halos de inibição, empregando inóculo a 0,1% de *K. rhizophila*, soluções de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml em polissorbato 80 1%. Camadas base e superfície de ágar nutriente pH 6 $y = (7,05 \pm 0,27) + (3,61 \pm 0,25)x$; ágar nutriente pH 8 $y = (7,05 \pm 0,22) + (3,21 \pm 0,20)x$; ágar nutriente pH 7 $y = (7,99 \pm 0,10) + (0,59 \pm 0,09)x$; camada base com ágar para antibióticos nº1 $y = (8,04 \pm 0,20) + (3,32 \pm 0,19)x$ 153
- Figura 29.** Placa utilizada no doseamento de gramicidina matéria-prima, sendo 1,2,3 os halos correspondentes às soluções de gramicidina padrão a 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml, respectivamente. Os halos A₁, A₂ e A₃ referem-se às soluções de matéria-prima a 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml, respectivamente. 155
- Figura 30.** Placa utilizada no doseamento de gramicidina matéria-prima, sendo A correspondente aos halos da solução de matéria-prima a 11,3 µg/ml e P3 aos halos da solução padrão de referência a 11,3 µg/ml. 156
- Figura 31.** Logaritmo da concentração de gramicidina versus absorvância para *E. hirae* empregando tampão nº2 e álcool etílico a 95% como diluentes, inóculo a 0,75% e caldo GCLT (n=3). 162
- Figura 32.** Gráfico de resíduos segundo modelo Durbin-Watson para dados obtidos utilizando como diluente álcool etílico a 95% (A) e tampão nº2 (B). 163
- Figura 33.** Concentração de gramicidina versus absorvância para *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95% $y = (0,527 \pm 0,004) + (-0,529 \pm 0,012) x + (0,129 \pm 0,005) x^2$; e tampão nº2 $y = (0,453 \pm 0,001) + (-0,278 \pm 0,004) + (0,048 \pm 0,002)$ 164
- Figura 34.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento para *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95% $y = (0,56 \pm 0,44) + (97,36 \pm 1,40) x + (-23,36 \pm 0,55) x^2$; e tampão nº2 $y = (-0,76 \pm 0,27) + (61,84 \pm 0,87) x + (-10,59 \pm 0,34) x^2$ 164

- Figura 35.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento (A), concentração versus absorvância (B), inóculo de *E. hirae* a 0,75%, caldo GCLT e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95%. A reta vermelha delimita a faixa de concentração (0,08 a 1,08 µg/ml) em que possivelmente há uma relação linear com a absorvância (ou porcentagem de inibição do crescimento)..... 166
- Figura 36.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento para, inóculo de *E. hirae* a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 1,08 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes tempos de incubação. O tracejado verde corresponde à faixa de concentração de 0,08 a 1,08 µg/ml, cujo modelo linear não foi adequado. Enquanto a reta azul corresponde ao intervalo em que há relação linear..... 167
- Figura 37.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento empregando inóculo de *E. hirae*, a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes tempos de incubação: 3h $y = (48,89 \pm 1,33)x + (13,77 \pm 0,74)$; 3h30min $y = (48,56 \pm 1,44)x + (9,71 \pm 0,80)$; 4h $y = (58,60 \pm 2,00)x + (0,39 \pm 1,02)$ e 4h30min $y = (48,32 \pm 1,26)x + (-2,68 \pm 0,70)$ 168
- Figura 38.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e 4h de incubação. Dia 1 A e B são retas de um mesmo dia; dia 2 e 3 são retas obtidas em dias diferentes. 170
- Figura 39.** Concentração de gramicidina e de seu produto de degradação versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT, soluções padrão de gramicidina e de produto de degradação a 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml em álcool etílico a 95%. Curva do padrão: $(-9,64 \pm 1,71) + (52,30 \pm 3,36) x$; n=3. ... 171
- Figura 40.** Gráfico de potência verdadeira versus potência determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (4,02 \pm 2,04) + (0,97 \pm 0,02)x$ 174
- Figura 41.** Gráfico de erro relativo versus potência relativa, com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho). 175
- Figura 42.** Gráfico de concentração de gramicidina teórica versus concentração determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (0,001 \pm 0,005) + (1,01 \pm 0,01)x$ 178
- Figura 43.** Gráfico de erro relativo versus concentração de gramicidina (µg/ml), com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho). 178
- Figura 44.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento, empregando inóculo a 0,75% de *E. hirae*, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e caldo GCLT pH 7 $y = (-4,18 \pm 0,93) + (58,40 \pm 1,67)x$; pH 6 e 8 (n=3). 182

- Figura 45.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento para *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes tempos de incubação: 3h45 $y = (56,69 \pm 1,35)x + (-1,04 \pm 0,75)$; 4h $y = (57,24 \pm 1,04)x + (-2,98 \pm 0,58)$; 4h15 $y = (55,24 \pm 1,35)x + (-3,61 \pm 0,75)$ 183
- Figura 46.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento empregando caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95%, 4h de incubação e inóculo a 0,75% de *E. hirae* de diferentes idades..... 184
- Figura 47.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo para antibiótico nº3 sem peptona de carne e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95%. $y = (0,69 \pm 1,33) + (83,30 \pm 4,26)x + (-20,26 \pm 1,68)x^2$ 187
- Figura 48.** Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes meios de cultura: caldo para antibiótico nº3 sem peptona $y = (0,69 \pm 1,33) + (83,30 \pm 4,26)x + (-20,26 \pm 1,68)x^2$; caldo com lactalbumina $y = (5,05 \pm 1,73) + (89,71 \pm 5,55)x + (-24,13 \pm 2,20)x^2$; com triptona $y = (6,55 \pm 1,83) + (109,1 \pm 5,85)x + (-29,91 \pm 2,32)x^2$ e com casamino $y = (5,67 \pm 1,78) + (101,6 \pm 5,71)x + (-24,95 \pm 2,26)x^2$ 188

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCOVA	Análise de covariância
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of official analytical chemistis
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infuso cérebro coração
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DA	Método de difusão em ágar
DM	Método de difusão em micro-gel
DMSO	dimetilsulfóxido
dp	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EC50	Concentração efetiva a 50%.
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International conference on harmonisation
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de metrologia
HIV	Human immunodeficiency virus
HSV	Herpes simplex virus
MT	Método turbidimétrico adaptado para microplacas
NCTC	National Collections of Type Cultures
NT	Nistatina/acetono de triancinolona
NTNG	Sulfato de neomicina, nistatina, acetono de triancinolona e gramacidina
pa	Para análise
Rf	Fator de retenção
TFE	Trifluoretano
µM	Micromolar

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Centenas de peptídeos com ação antimicrobiana foram descritas no século passado. Estes compostos podem ser classificados em peptídeos não sintetizados por ribossomos, como gramicidinas, polimixinas, bacitracinas, glicopeptídeos e em peptídeos sintetizados por ribossomos como a nisina (HANCOCK e CHAPPLE, 1999). Os peptídeos não sintetizados por ribossomos são produzidos por bactérias e fungos por meio de complexos multi-enzimáticos presentes em suas células. É o caso da gramicidina, peptídeo sintetizado pelo *Bacillus brevis* Dubos durante a transição da fase vegetativa para a esporulação.

Em 1939, René Dubos descobriu a gramicidina, o primeiro antimicrobiano testado clinicamente. Em seu estudo, Dubos tinha como objetivo pesquisar microrganismos do solo que fossem capazes de produzir agentes antimicrobianos que poderiam ser empregados no tratamento de infecções bacterianas. Dubos descobriu que o *Bacillus brevis* produzia uma substância que apresentava atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivo. As análises químicas deste composto revelaram a presença de dois polipeptídeos: um capaz de provocar a lise de membranas de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, que foi chamado tirocidina, e outro que inibia seletivamente o crescimento de bactérias Gram-positivo, denominado gramicidina. Dubos acreditava ter descoberto um novo e poderoso medicamento. A substância se mostrou ativa para camundongos por via intraperitoneal, mas se apresentava tóxica pela via intravenosa. Desta forma, não poderia ser empregada no tratamento de infecções sistêmicas. Contudo, por via tópica, a gramicidina teve sua eficácia comprovada, sendo utilizada durante a II Guerra Mundial no tratamento de feridas e ulcerações (HEATHER, 2006).

O termo gramicidina é empregado para denominar uma família de pentadecapeptídeos antimicrobianos lineares, que foi primeiramente chamada de gramicidina D para distinguir da gramicidina S, um decapeptídeo cíclico, também produzido pelo *Bacillus brevis*, que exibe uma potente atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bem como, contra vários fungos patogênicos.

A preparação comercial de gramicidina é constituída pelas gramicidinas A, B e C, sendo o principal componente a gramicidina A₁, junto com A₂, B₁, C₁ e C₂ em particular, usualmente obtida por extração a partir da tirotricina.

A gramicidina é um peptídeo hidrofóbico constituído de quinze aminoácidos alternando configurações L e D. O grupo N-terminal é formilado (HOC-N) e o C-terminal é ligado a um grupo etanolamina (C-NHCH₂CH₂OH).

Na sua forma dimérica, a gramicidina atua como um canal transmembrana que aumenta a permeabilidade da membrana celular bacteriana, causando o desequilíbrio do gradiente iônico entre o citoplasma e o meio extracelular, levando à morte da célula. Outros mecanismos de ação do antibiótico ainda não estão bem definidos (RAWAT *et al*, 2004; Koo *et al*, 2001; WALLACE, 2000).

A gramicidina em preparações farmacêuticas é freqüentemente associada a outras substâncias, como é o caso da associação com acetono de triancinolona, sulfato de neomicina e nistatina. Essa formulação é comercializada sob a forma de creme ou pomada e na Tabela 1 estão indicadas algumas apresentações farmacêuticas comercializadas no Brasil.

Tabela 1. Apresentações farmacêuticas comercializadas no Brasil, contendo a associação gramicidina, nistatina, sulfato de neomicina e acetono de triancinolona, e seus respectivos produtores.

Medicamento	Laboratório produtor
Omcilon-A M	Bristol-Meyers Squibb
Genocilon	Genoma
Londerm-N	Kinder
Neolon D	Neo Quimica
Onciplus	Prodotti

O uso de produtos contendo a associação sulfato de neomicina, nistatina, acetono de triancinolona e gramicidina (NTNG) tem sido especialmente prevalente no tratamento de doenças dermatológicas devido à sua natureza multifacetada (ZAIAS *et. al.*, 1981).

No entanto, para assegurar a eficácia de qualquer tratamento terapêutico se faz necessário um controle de qualidade eficiente em termos de métodos seguros, confiáveis e simples, se possível.

Em relação ao controle de qualidade, a farmacopéia americana (THE UNITED..., 2008), britânica (BRITISH..., 2007) e mexicana (FARMACOPEA..., 2004) possuem monografia da gramicidina matéria-prima. Nestas é preconizado para o doseamento da gramicidina o método microbiológico turbidimétrico.

As farmacopéias, em geral, preconizam dois métodos para realização de doseamentos microbiológicos de antibióticos: o método por difusão em ágar e o turbidimétrico. Vários antibióticos têm os dois métodos descritos, apresentando a vantagem de poder ser escolhido o método que melhor se adequa a uma determinada situação.

No método turbidimétrico, o meio de cultura líquido é inoculado com microrganismo teste e concentrações seriadas da amostra e do padrão do fármaco são adicionadas para permitir o contato entre o meio e a solução. A resposta do microrganismo teste a ação do antimicrobiano é evidenciada pela alteração da turvação do meio de cultura, sendo medida em espectrofotômetro. Os resultados obtidos para as soluções da amostra são comparados aos do padrão, permitindo assim, a determinação da concentração ativa do fármaco presente no produto. O método de turbidimetria apresenta a vantagem de ser mais sensível que o por difusão em ágar, já que responde às concentrações menores de antibiótico. Por outro lado, tem desvantagens como: soluções turvas e coloridas interferirem na determinação da resposta; a necessidade das soluções da amostra e do padrão estarem estéreis; a interferência causada pela presença de substâncias inibidoras e ativadoras de crescimento microbiano, como por exemplo, solventes orgânicos utilizados em processos extrativos e substâncias presentes na amostra (HEWITT, 2007).

No método de difusão em ágar, a substância em análise se difunde em um meio de cultura sólido inoculado com o microrganismo teste. Observa-se após sua difusão, uma zona de inibição de crescimento do microrganismo, cujo diâmetro é uma função da concentração da amostra. A potência desta é obtida por comparação com os dados do padrão. Sua desvantagem encontra-se no fato de que substâncias que apresentam baixas difusibilidade (PM) e hidrossolubilidade produzem pequenos halos de inibição, o que reduz a precisão dos resultados. No entanto, esse método apresenta vantagens em relação ao método turbidimétrico, como por exemplo, a

possibilidade de se trabalhar com soluções do padrão e da amostra não estéreis, a não interferência de soluções turvas e coloridas e a não interferência direta de contaminantes microbiológicos (HEWITT, 2007).

O método de difusão em ágar é o mais utilizado na rotina de controle de qualidade e é preconizado juntamente com o turbidimétrico para dosar vários antibióticos tendo-se então a opção de utilização de um ou outro método, o que não acontece com a gramicidina.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia para o doseamento microbiológico de gramicidina matéria-prima.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Pesquisar solvente e diluente para o preparo das diluições das soluções da amostra e do padrão utilizadas no doseamento.
- ✓ Determinar o microrganismo teste investigando a sua sensibilidade em relação à gramicidina em meios sólidos.
- ✓ Determinar a densidade adequada do inóculo para realização do doseamento.
- ✓ Montar o protocolo para o doseamento de gramicidina pelo método de difusão em ágar.
- ✓ Validar o método de doseamento microbiológico desenvolvido em relação aos parâmetros de exatidão, precisão, curva analítica, seletividade, limites de detecção e quantificação e robustez.
- ✓ Montar o protocolo para o doseamento da gramicidina pelo método turbidimétrico para permitir comparação com o método desenvolvido.
- ✓ Realizar o doseamento da gramicidina matéria-prima utilizando o método desenvolvido e validado.

Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Origem e obtenção de gramicidinas

Bactérias Gram-positivo do gênero *Bacillus* produzem uma variedade de oligopeptídeos antibióticos e lipo-peptídeos. Entre essas, o *Bacillus brevis* é capaz de sintetizar peptídeos antimicrobianos cíclicos e lineares. Estes antibióticos são produzidos simultaneamente e se acumulam na célula do microrganismo (NAKAI *et al*, 2005). Essas substâncias foram descobertas por René Dubos em 1939. Dubos pesquisava no solo, novos agentes para combater infecções bacterianas e descobriu que o *Bacillus brevis* (ATCC 8185, cepa B.G.) produzia um composto, posteriormente denominado tirotricina, que testado contra bactérias Gram-positivo promovia a lise das células. A natureza química desse composto foi investigada e duas substâncias cristalinas foram obtidas: gramicidina e tirocidina (Figura 1) - HOTCHKISS e DUBOS, 1941.

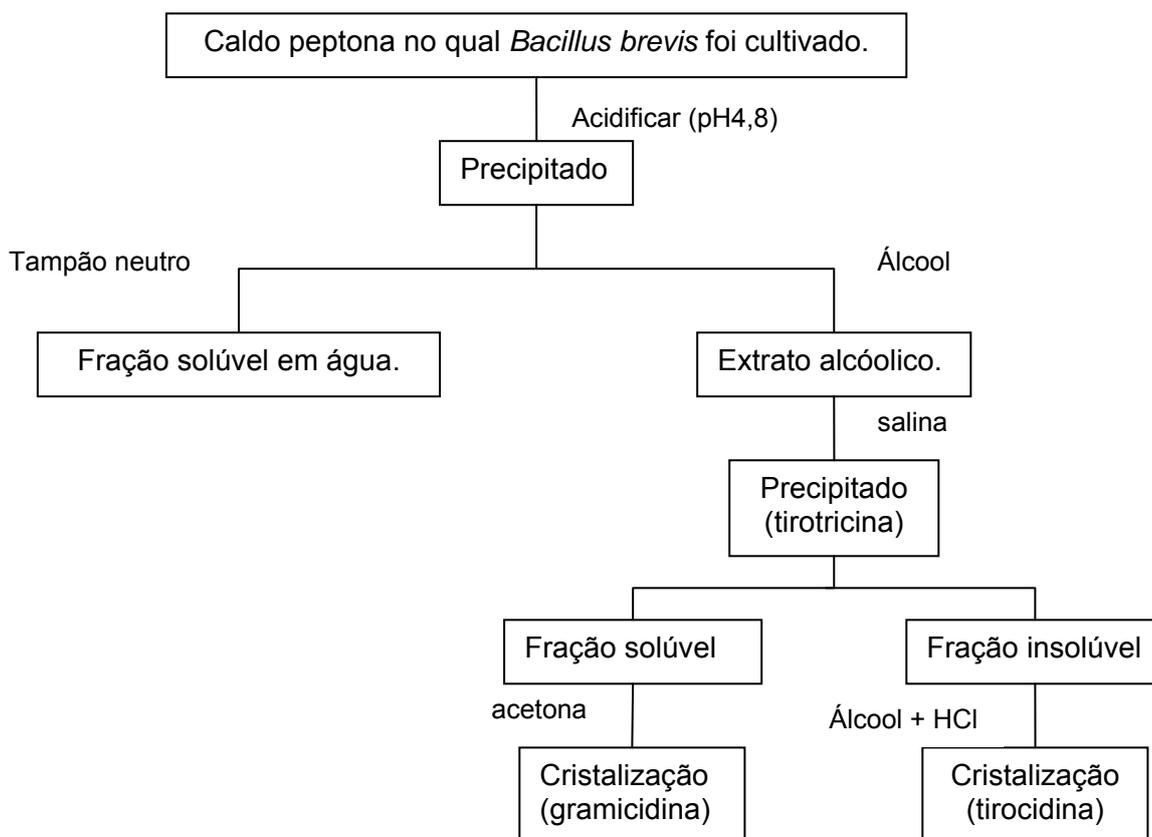
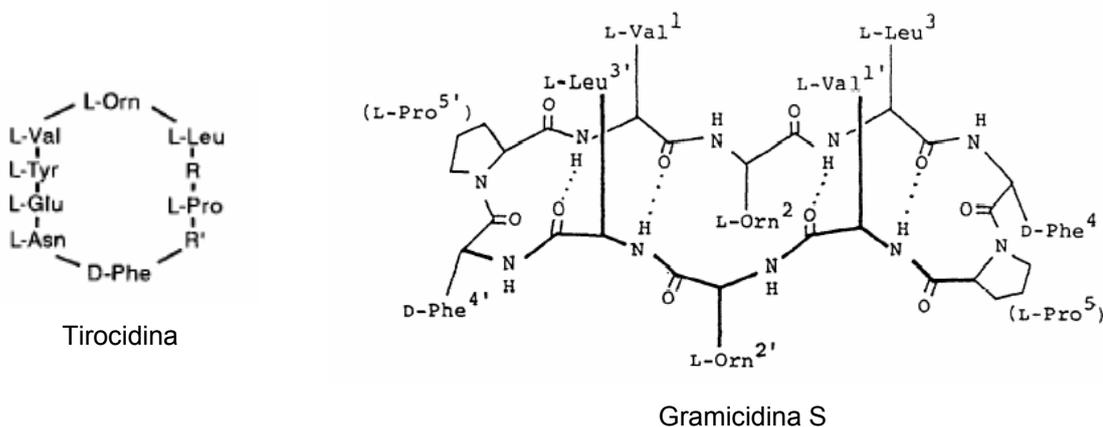


Figura 1. Esquema simplificado do fracionamento de substâncias antimicrobianas de cultura de *Bacillus brevis*.

Fonte: HOTCHKISS, 1944.

O termo gramicidina é empregado para denominar uma família de pentadecapeptídeos antimicrobianos lineares, a qual foi primeiramente chamada de gramicidina D para distinguir da gramicidina S (Figura 2), um decapeptídeo cíclico, também produzido pelo *Bacillus brevis*. Estes dois peptídeos diferem em relação ao seu espectro de ação, sendo que a gramicidina age, principalmente, contra bactérias Gram-positivo, enquanto a gramicidina S apresenta uma potente atividade antimicrobiana com um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivo e negativo, bem como, contra vários fungos patogênicos. Porém, ambos os antibióticos não são específicos em suas ações e apresentam apreciável atividade hemolítica, o que restringe seu uso em produtos para aplicação tópica (KIRICSI *et al*, 2002; NIARAK *et al*, 2000; RAUTENBACH *et al*, 2006).



HOC – X – Gly – L-Ala – D-Leu – L-Ala – D-Val – L-Val – D-Val – L-Trp – D-Leu – Y – D-Leu – L-Trp – D-Leu – L-Trp – NHCH₂CH₂OH

Gramicidina	X	Y	Fórmula molecular	Massa molecular
A ₁	L-Val	L-Trp	C ₉₉ H ₄₀ N ₂₀ O ₁₇	1882
A ₂	L-Ile	L-Trp	C ₁₀₀ H ₄₂ N ₂₀ O ₁₇	1896
B ₁	L-Val	L-Phe	C ₉₇ H ₁₃₉ N ₁₉ O ₁₇	1843
C ₁	L-Val	L-Tyr	C ₉₇ H ₁₃₉ N ₁₉ O ₁₈	1859
C ₂	L-Ile	L-Tyr	C ₉₈ H ₄₁ N ₁₉ O ₁₈	1873

Figura 2. Estruturas das gramicidinas A₁, A₂, B₁, C₁, C₂, S e tirocidina. Estes peptídeos são sintetizados pelo *Bacillus brevis* e apresentam atividade antimicrobiana.

3.2 Gramicidina – propriedades físico-químicas

A gramicidina apresenta uma estrutura primária com cadeia linear constituída por quinze aminoácidos alternando as configurações L e D, sendo que N e C-terminais estão ligados a um grupo formil e a uma etanolamina, respectivamente (ROMEU *et al*, 2005). Das gramicidinas lineares existem os subtipos A, B e C que diferem entre

si quanto à seqüência de aminoácidos (Figura 2). A composição da gramicidina D varia, mas tipicamente é de 80 a 85% de gramicidina A, de 6 a 7% de B e de 5 a 14% de C (RAGHU e GROSS, 2004).

Em relação à solubilidade, a gramicidina é um peptídeo hidrofóbico que não apresenta cadeias laterais carregadas ou hidrofílicas. Como ambos, N e C-terminais estão bloqueados, a gramicidina não se torna carregada em qualquer valor de pH do meio, o que explica sua baixa solubilidade em água. Contudo, é solúvel em vários solventes orgânicos (RAGHU e GROSS, 2004). Assim a adição de solventes orgânicos, como glicerina (10% p/V), aumenta a solubilidade da gramicidina em meio aquoso (HEILMAN e HERRELL, 1941).

A gramicidina é capaz de formar estruturas diméricas, sendo que as duas principais conformações são um dímero helicoidal e uma dupla hélice (Figura 3). Na forma helicoidal, dois monômeros estão ligados via seus N-terminais no centro da membrana para formar um dímero transmembrana com um poro interno de diâmetro igual a 3 a 4 Angstroms. A estrutura dupla hélice consiste de duas β -folhas que unidas por ligações de hidrogênio estão dobradas para formar uma dupla hélice. Devido à alternância da conformação L e D dos aminoácidos, o dímero resultante em ambas as conformações apresenta todas as cadeias laterais na superfície de um dos lados da molécula, que ao se dobrar, produz estruturas com o polipeptídeo hidrofílico no interior do dímero e cadeias laterais hidrofóbicas cobrindo a superfície (RAWAT *et al*, 2004; WALLACE, 2000).

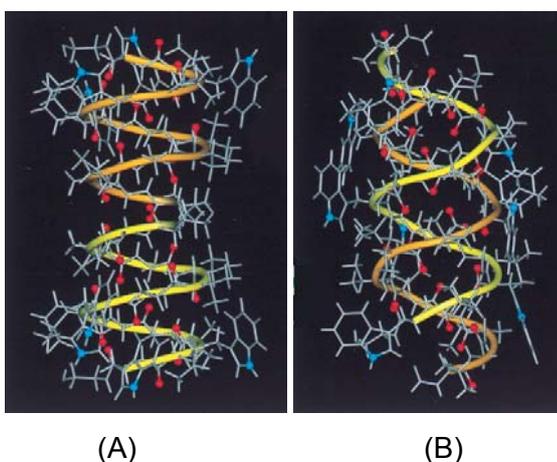


Figura 3. As duas principais conformações do dímero da gramicidina: (A) dímero helicoidal e (B) dupla-hélice.

Fonte: KOVACS *et al*, 1999.

Ainda não há um consenso quanto à capacidade das duas conformações conduzirem íons, sendo que o dímero helicoidal é a principal conformação condutora (WALLACE, 2000).

Estudos demonstraram que os resíduos de triptofano na gramicidina são cruciais para manutenção da estrutura e funcionamento do canal dímero helicoidal. Tal importância é demonstrada pela redução da condutividade de cátions quando uma ou todas as moléculas de triptofano são substituídas por fenilalanina, tirosina ou naftilalanina. Assim, tem sido proposto que o triptofano aumenta a permeabilidade dos íons por interações eletrostáticas (RAWAT *et al*, 2004).

Detalhes do mecanismo molecular pelo qual a gramicidina adota várias conformações nas membranas não são conhecidos. Contudo, tem-se relatado que a conformação inicial que a gramicidina adota quando incorporada na membrana depende da natureza do solvente no qual foi solubilizada (RAWAT *et al*, 2004). Em vista disso, Bouchard e colaboradores (2000) examinaram a estrutura da gramicidina A em diferentes solventes, sendo testados etanol, mistura de etanol e água 1:1, trifluoretano (TFE), dimetilsulfóxido (DMSO). Em DMSO, TFE e mistura de etanol e água 1:1, o peptídeo apresentou-se na forma de monômeros. Enquanto em etanol, foram encontrados dímeros não covalentes da gramicidina. Outras condições que também influenciam a conformação da gramicidina são a presença de íons e a extensão da cadeia alquila dos lipídeos da bicamada (ROMEU, 2005).

Recentemente, a gramicidina tem sido utilizada como modelo protótipo para vários canais iônicos, já que se trata de um pequeno peptídeo, de fácil obtenção, no qual se podem realizar modificações químicas.

3.3 Mecanismos de ação

Muitos peptídeos antimicrobianos interagem, inicialmente, com a membrana da célula bacteriana alterando-a e promovendo uma seqüência de eventos, tais como: perda de solutos intracelulares (como K^+ e aminoácidos); dissipação do potencial transmembrana; inibição da respiração; redução do *pool* de ATP; diminuição da síntese de DNA, RNA e proteínas. Embora a perda de metabólitos provavelmente resulte em uma inibição das principais funções intracelulares, ainda não foi

estabelecido se somente o aumento da permeabilidade da membrana é suficiente para matar os microrganismos sensíveis ou se outros eventos ou sítios de ação estão envolvidos. Estudos sugerem que a parede celular também possa estar envolvida no mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos.

Xiong *et al* (2005) estudaram a relação entre a permeabilidade da membrana induzida pela gramicidina e a morte de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 27217 (resistente a meticilina) e protoplasmas sem parede celular. Foi verificado que a atividade antimicrobiana da gramicidina sobre as células de *S. aureus* é concentração e tempo dependente. Relação semelhante foi observada para a permeabilidade da membrana induzida pela gramicidina em todas as concentrações testadas (4; 10; 20 e 40 µg/ml). Apesar de a gramicidina promover a morte de todas as células do microrganismo em concentrações mais altas (20 e 40 µg/ml), o aumento da permeabilidade da membrana foi observado apenas em 60 a 70% dessas células. Em vista disso, a permeabilidade da membrana parece ser necessária, mas não é o suficiente para induzir a letalidade. Em relação aos protoplasmas, a inibição promovida pelo antimicrobiano foi baixa. Como justificativa para tal fato, foi sugerido pelos autores que uma adaptação da membrana citoplasmática (mudança da composição da membrana e de propriedades biofísicas) possa ter ocorrido na ausência da parede celular, uma vez que foi observado que a gramicidina é incapaz de promover o aumento da permeabilidade em lipossomas constituídos por fosfatidilglicerol e cardiolipina.

A relação entre o aumento da permeabilidade da membrana e a morte de cepas de *S. aureus* (cepas mutantes ISP479C e ISP479R) promovida pela gramicidina também foi estudada por Koo *et al* (2001). Neste estudo observou-se que o mecanismo antimicrobiano varia significativamente dependendo da concentração de gramicidina e do tempo de exposição. Foi verificado que baixas concentrações de gramicidina (0,5 e 5 µg/ml) promovem a redução da viabilidade das células do microrganismo, mas sem aumento da permeabilidade da membrana. Contudo, significativo aumento de permeabilidade da membrana ocorreu em altas concentrações (25 e 50 µg/mL). Esta relação variável entre o aumento da permeabilidade da membrana e a atividade antimicrobiana sugere que a gramicidina age através de múltiplos mecanismos.

A ação da gramicidina sobre células de *Streptococcus faecalis* ATCC 9790 foi estudada por Harold e Baarda (1967). Foi verificada que a inibição do crescimento microbiano estava associada à perda de Rb^+ e K^+ pelas células, o que pôde ser revertido pela adição de excesso de íons K^+ . Também foi observado nessas células o aumento da permeabilidade a certos cátions, contudo a penetração de pequenas moléculas não foi verificada. O mecanismo da perda de Rb^+ foi definido como uma troca passiva com cátions externos, incluindo o H^+ . Por fim, os autores concluíram que o aumento da permeabilidade da membrana induzido pela gramicidina foi uma explicação suficiente para inibição do crescimento de *Streptococcus faecalis*.

Esse antimicrobiano foi capaz de promover o desacoplamento da fosforilação oxidativa em bactérias e mitocôndrias isoladas (WEINSTEIN *et al*, 1964).

Dubos e Hotchkiss (1941) estudaram o efeito da gramicidina sobre o metabolismo bacteriano e verificaram que este antibiótico causa uma injúria limitada nas células, estimulando ou inibindo certas funções metabólicas dependendo das condições experimentais do ensaio.

Takada e colaboradores (2008) verificaram que a gramicidina A é capaz de inibir a atividade da Na^+/K^+ ATPase em mamíferos, responsável por manter o gradiente eletroquímico de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática. Os ensaios foram realizados empregando Na^+/K^+ ATPase originária do rim e do córtex cerebral de suínos e a resposta foi avaliada através da redução da produção de fosfato inorgânico. Foi observado que a inibição é dose-dependente, sendo que a atividade reduziu de 60 a 80% quando foram testadas concentrações de 10 a 100 μM . Ensaio também foram realizados com a gramicidina S, que promoveu uma inibição menos pronunciada, cerca de cinco vezes menor quando comparado com a gramicidina linear. Além disso, os autores verificaram que a inibição pelo antimicrobiano foi promovida por ligação deste tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima – substrato.

A gramicidina tem sido identificada como um potencial agente anti-HIV não tóxico. Quando comparada ao 9-nonoxinol, o mais comum espermicida e agente anti-doenças sexualmente transmissíveis, a gramicidina foi mais ativa. A gramicidina age como um ionóforo e promove um efluxo de potássio citoplasmático a partir das

células alvo e causam a despolarização da membrana celular. Por outro lado, a infecção por muitos vírus envelopados, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da herpes humana simplex (HSV), leva a um drástico aumento do potássio intracelular. Dois eventos separados, a entrada e germinação do vírus, são dependentes da polaridade da superfície da célula mantida pelo gradiente iônico transmembrana. Assim, a alteração do balanço de potássio pelo canal formado pela gramicidina afetaria o processo de infecção viral (BOURINBAIAR e COLEMAN, 1997).

3.4 Especialidades farmacêuticas e seu emprego

Em formulações farmacêuticas, a gramicidina pode estar associada à nistatina, ao sulfato de neomicina e ao acetonido de triancinolona. Tal associação é comercializada sob a forma de creme ou pomada.

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro de ação, incluindo algumas bactérias Gram-positivo e muitas Gram-negativo (CAI *et al*, 2005). A nistatina é um antifúngico macrolídeo poliênico e o acetonido de triancinolona é um antiinflamatório esteroide sintético. Zaias e colaboradores (1981) realizaram um estudo clínico, do tipo duplo-cego, comparando a eficácia do creme contendo a associação nistatina, acetonido de triancinolona, sulfato de neomicina e gramicidina com formulações apresentando seus componentes e placebo no tratamento de candidíase cutânea. 293 pacientes com candidíase cutânea foram divididos em cinco grupos de tratamento, sendo que cada grupo recebeu uma das formulações: nistatina/acetonido de triancinolona/sulfato de neomicina/gramicidina (NTNG), nistatina/acetonido de triancinolona (NT), nistatina, acetonido de triancinolona e placebo. Os autores observaram que as diferenças entre os grupos foram mais pronunciadas entre os pacientes com isolados bacterianos clinicamente significativos: a porcentagem de cura após uma semana de tratamento foi significativamente maior ($p < 0,05$) para os pacientes no grupo tratado com NTNG (39,3%) do que naqueles do grupo tratados com NT (14,3%) ou no grupo do acetonido de triancinolona (8,7%). Após duas semanas de tratamento, 64,3% dos pacientes no grupo tratado com NTNG estavam curados, o que foi significativamente maior do que a porcentagem de cura nos grupos tratados com nistatina, triancinolona e placebo. Desta forma, Zaias e colaboradores concluíram que o creme

contendo a associação NTNG oferecia vantagens sobre seus componentes, especialmente entre pacientes com lesões infectadas com bactérias patogênicas.

A gramicidina associada à polimixina B e sulfato de neomicina na forma de colírio não é comercializada no Brasil, contudo é empregada no tratamento de ulceração da córnea com suspeita de infecção bacteriana em outros países. Bosscha e colaboradores (2004) avaliaram a eficácia e segurança deste tratamento em 91 pacientes. Destes, 46 apresentaram cultura bacteriana positiva, sendo isoladas 51 espécies de microrganismos, das quais os mais freqüentes foram o *S. aureus* e *Pseudomonas*. Apenas 69 pacientes completaram o tratamento com o colírio, contudo 99% apresentaram reconstituição do epitélio da córnea em média de 12,6 dias. Foram observados somente poucos efeitos adversos (reações alérgicas) e nenhum deles classificados como graves. Dos 91 pacientes, quatro perfurações da córnea e uma evisceração foram verificadas. Assim, os autores concluíram que a associação é eficaz e segura quando utilizada no tratamento de ulceração da córnea com suspeita de infecção bacteriana.

3.5 Métodos de doseamento microbiológico

Um ensaio microbiológico é definido como um procedimento prático no qual a potência desconhecida de um material é estimada por comparação de seus efeitos em um sistema biológico (que neste caso se trata de uma cultura de microrganismos) com aqueles do padrão de referência, cuja potência é conhecida (HEWITT, 2007).

O principal uso dos doseamentos microbiológicos é na determinação da potência de substâncias inibidoras de crescimento (principalmente antibióticos) e de compostos promotores de crescimento (aminoácidos e vitaminas). Existem duas principais técnicas: o ensaio de difusão em ágar e o ensaio de tubos (HEWITT, 2007).

A Método de difusão em ágar

No método de difusão em ágar utiliza-se um meio de cultura sólido inoculado uniformemente com adequado microrganismo sensível à substância a ser dosada. A substância se difunde no ágar a partir de uma solução aquosa contida em um reservatório. Após incubação, áreas de inibição são formadas. Assim, o

microrganismo funciona como um indicador que permite identificar baixas concentrações do antibiótico que limita seu crescimento. O diâmetro dessas áreas de inibição depende da concentração da substância ativa e este fato é o princípio deste método (FINN, 1959; HEWITT, 1989).

✓ A teoria da difusão na formação dos halos de inibição

Em 1930, Friedman estudou a difusão de algumas substâncias em ágar e verificou que alguns fatores influenciavam no processo de difusão como a concentração de ágar, a adição de algumas substâncias (como glicerol) ao meio de cultura e o peso molecular do difusor.

Cooper e Woodman (apud HEWITT, 1977) em estudo para elucidar os princípios da difusão trabalharam com a difusão do cristal violeta em tubos contendo ágar. Neste estudo foi verificado que uma concentração particular era atingida em um tempo (T), a um ponto de distância (x) a partir da superfície, quando uma concentração inicial era adicionada à superfície do tubo contendo ágar em um tempo inicial (T_0).

Vesterdal (apud COOPER e LINTON, 1952), ao contrário de Cooper e Woodman, considerou que a concentração do antibiótico presente em um cilindro de pequena área era constantemente reduzida por sua difusão no ágar.

Em 1949, Mitchison e Spicer empregaram tubos contendo ágar nutriente inoculado com *S. aureus* NCTC 7361 para determinar a potência de estreptomicina em líquidos corporais. Neste estudo foram testados alguns fatores que poderiam influenciar o doseamento de antibióticos, como pH do líquido ensaiado e a concentração do inóculo empregado. A difusão nesse caso foi dita linear e descrita pela equação diferencial de Fick. Os autores concluíram que tanto a teoria quanto a prática demonstraram que o quadrado da profundidade da zona de inibição apresentou uma relação aproximadamente linear com o logaritmo da concentração de estreptomicina.

Gavin (1957a) considerou esse método desvantajoso pela necessidade das soluções serem estéreis, do microrganismo ser anaeróbio facultativo e pela dificuldade em se observar o ponto final. Contudo, a maior vantagem era a possibilidade de melhor definição e controle da geometria do sistema de difusão.

Cooper e Gillespie (1952) também utilizaram o método com tubos para verificação das alterações promovidas pela variação da temperatura de incubação. Foi observado que o principal efeito da temperatura sobre a zona de inibição ocorreu devido à mudança na velocidade de crescimento do microrganismo. Efeitos mínimos foram observados sobre a concentração inibitória mínima e sobre o coeficiente de difusão da substância.

Embora o ensaio em placas tenha sido válido para penicilina e estreptomicina, os resultados para alguns outros antibióticos não foram satisfatórios. As fórmulas desenvolvidas por Cooper e Woodman consideraram a difusão como sendo linear e que a concentração do antibiótico no reservatório foi constante durante as oito primeiras horas. Em vista disso, Humphrey e Lightbown (1952) derivaram uma equação teórica, considerando a difusão radial da substância, que relacionava a quantidade inicial da substância difusora, a espessura da camada de ágar, a constante de difusão, o tempo de difusão e a concentração da substância em uma determinada distância (r) a partir do centro. Para confirmar a validade da equação, esta foi utilizada para determinar o raio do halo de inibição para alguns antibióticos que tiveram os outros termos da equação determinados (constante de difusão de penicilina, estreptomicina e aureomicina; concentração crítica desses antibióticos para os microrganismos teste e tempo crítico). Esses autores concluíram que o quadrado do raio do halo de inibição é proporcional ao logaritmo da concentração para a maioria dos antibióticos testados e que a constante de difusão do antibiótico é o principal fator que determina a inclinação da reta. No entanto, esta pode ser aumentada ao se prolongar o tempo de difusão.

Gavin (1956) classificou em dois tipos os ensaios em que ocorre a difusão radial (horizontal): aquele em que o halo de inibição depende da concentração do antibiótico e o que o halo é dependente da quantidade da substância ensaiada. Duas técnicas podem ser incluídas no primeiro grupo: a dos cilindros e a dos pocinhos. Neste caso a substância se difunde a partir de uma fonte central. No método do cilindro a solução é contida em um cilindro, enquanto nos pocinhos, uma depressão no ágar é feita para conter a solução. No caso dos ensaios que dependem da quantidade de substância ensaiada insere-se a técnica dos discos, que contêm o antibiótico. Por ser possível adicionar às placas os discos secos ou

úmidos, pode-se empregar solventes orgânicos no preparo das soluções.

Brock (1957) avaliou a velocidade de difusão e os fatores que influenciavam esta velocidade para dois antibióticos: sulfato de neomicina e clavacina. A técnica consistiu em impregnar quadrados de papel de filtro com soluções de diferentes concentrações do antibiótico. Esses quadrados foram colocados em contato com o ágar inoculado por diferentes tempos e em seguida removidos. Então as placas foram incubadas e o diâmetro dos halos de inibição medidos. Para clavacina, foi verificado que o diâmetro do halo é dependente da concentração e do tempo de difusão. Este antibiótico difunde rapidamente nos cinco primeiros minutos, não ocorrendo aumento do diâmetro dos halos após esse período, provavelmente, devido à depleção do antibiótico. Pela difusão ocorrer rapidamente, uma inclinação adequada foi obtida. Para o sulfato de neomicina, o diâmetro não parece ser em função do tempo. A difusão ocorre rapidamente nos primeiros segundos e reduz drasticamente em seguida. Assim, a neomicina foi considerada um pobre difusor, provavelmente, por adsorção das moléculas de neomicina, que apresentam seis grupos básicos, pelo ágar que é carregado negativamente. Em vista disso, os autores adicionaram cloreto de sódio no ágar e observaram um aumento na difusão da neomicina.

Em 1974, Kavanagh utilizou a equação de Cooper para estudar a influência de variações da técnica sobre o ensaio de antibióticos. Variações no tempo de pré-difusão, temperatura de incubação, densidade do inóculo, composição do meio de cultura e espessura da camada de ágar afetaram o halo de inibição.

A cinética de difusão da ceftazidima em ágar foi estudada por Arcelloni e colaboradores (1996). A concentração de ceftazidima em ágar inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pontos fixos a partir do centro do disco (3, 6, 9, 12 e 15 mm) e a determinados tempos após a deposição do disco no ágar (2, 4, 6, 16 e 24h). Com o objetivo de determinar diferenças devido ao metabolismo do microrganismo, o procedimento também foi realizado em placas contendo ágar não inoculado. Foi evidenciada diferença estatística entre as concentrações determinadas na presença e ausência do microrganismo depois de 16 e 24 horas. Tal resultado, provavelmente, ocorreu devido à hidrólise induzida pela β -lactamase.

✓ Fatores que influenciam a formação do halo de inibição

Vários fatores influenciam a formação dos halos de inibição, dentre eles a espessura da camada de meio inoculado, o volume de solução de antibiótico empregado, tempo de pré-difusão, densidade do inóculo e outros.

▪ Volume de solução de antibiótico adicionado ao cilindro

É um fator crítico, principalmente, quando se emprega os discos de papel. O volume aplicado deve ser o suficiente para saturar o disco. Deve ser evitado volume muito alto que o papel não seja capaz de absorver rapidamente. Loo e colaboradores (1945) verificaram que um volume de 80 µl foi suficiente para impregnar discos de papel Schleicher e Schuel.

A variação do volume de solução adicionado ao cilindro foi avaliada por Ragheb (1988). Dez antibióticos foram testados e o diâmetro dos halos de inibição produzidos por diferentes volumes de solução amostra (100; 200 e 300 µl) foi comparado ao obtido por 200 µl da solução padrão. Nove das dez substâncias testadas apresentaram uma recuperação de 95 a 102% quando se utilizou o mesmo volume das soluções amostra e padrão. Um desvio positivo, de aproximadamente 50%, na potência foi verificado ao se empregar o volume de 300 µl para amostra. Contudo, 100 µl produziram um desvio negativo na potência de aproximadamente 25%, exceto para alguns antibióticos (neomicina, monensina e bacitracina) que foi de 50%. A higromicina B foi o único antimicrobiano cujo efeito de variação do volume de solução sobre os resultados foi pequeno.

Brady e Katz (1990) também estudaram a influência do volume de solução, sendo testados os volumes de 100; 150; 200 e 250 µl das soluções amostras e padrão. Foi avaliada a inclinação da curva analítica para clortetraciclina e os valores de potência obtidos. Valores de inclinação próximos, bem como os resultados de potência, foram verificados para os diferentes volumes de soluções testados.

▪ Microrganismo teste

O microrganismo teste deve ser sensível à substância ensaiada e facilmente cultivado. Além disso, é desejável que apresente uma resposta específica e que não

seja patogênico (GAVIN, 1956).

Turcinov e Pepeljnjak (1998) ao desenvolverem o método de difusão em ágar para a azitromicina, testaram diferentes microrganismos (incluindo bactérias Gram-negativo e positivo) para selecionar o mais sensível. Vários fatores foram avaliados para determinação do microrganismo teste, entre eles, a nitidez dos halos de inibição formados, a razão entre o diâmetro dos halos formados pelas diferentes concentrações testadas, já que a sensibilidade aumenta com a elevação do valor da razão, a concentração mínima detectável (quanto menor a concentração mais sensível é o microrganismo) e o erro associado às medidas.

- *Idade da cultura*

A cultura deve ser mantida de modo que uma resposta similar seja obtida em todo doseamento realizado. Isto envolve a idade e condições da cultura. Culturas mais velhas não respondem adequadamente aos antibióticos (GAVIN, 1956).

A farmacopéia americana (THE UNITED..., 2008) recomenda que, no máximo, cinco passagens sejam realizadas. Este procedimento evita variações na resposta produzida pelo microrganismo teste.

- *Densidade do inóculo*

Halos maiores foram obtidos com inóculos menos concentrados de *S. aureus* para doseamento de penicilina. Contudo, quando Schmidt e Moyer (1944) utilizaram densidades muito baixas, os halos formados não apresentaram bordas definidas

Stansly e Schlosser (1947) ao desenvolverem um método de difusão em placas para doseamento de polimixina verificaram que uma menor concentração de microrganismos originava halos de inibição maiores.

Em 1968, Richardson e colaboradores também avaliaram diferentes densidades de inóculo ao desenvolver o método para doseamento das colicinas. Os autores verificaram que a densidade do inóculo afetava o diâmetro dos halos de inibição, a forma da regressão e a inclinação da curva analítica. Um inóculo de aproximadamente $3,3 \times 10^5$ células/ml foi adequado para o ensaio de todas as outras

colicinas, exceto para a colicina V. Para cada colicina, o tamanho do halo de inibição foi inversamente proporcional ao logaritmo da concentração de microrganismo.

▪ Emprego de mono ou dupla camada de meio de cultura

Richardson e colaboradores (1968) desenvolveram o método para doseamento de colicinas empregando placas com apenas uma camada de meio inoculado. No entanto, ao testarem a utilização de placas contendo dupla-camada, não foi observada nenhuma vantagem.

Resultados diferentes foram obtidos por Marques e colaboradores (1988) que compararam o diâmetro dos halos de inibição e a curva analítica obtidos para o sulfato de neomicina testado em três diferentes condições: placas com dupla camada (base – 20 ml e superfície – 5 ml) seguindo o procedimento da farmacopéia brasileira (FARMACOPÉIA..., 1988); dupla camada reduzindo o volume da camada base para 10 ml e monocamada (10 ml). Os autores concluíram que melhores resultados foram obtidos quando o volume de camada base foi reduzido para 10 ml.

▪ Meio de cultura

O ensaio em placas é fundamentalmente dependente da difusão da substância no ágar. Assim, o meio de cultura torna-se um importante fator neste tipo de doseamento (GAVIN, 1957a).

- Espessura das camadas de meio de cultura

Uma camada fina de meio de cultura produzirá halos de inibição maiores, aumentando assim a sensibilidade do ensaio. Gavin (1957a) em sua revisão sobre o ensaio por difusão citou que muitos autores recomendavam o emprego de camadas de 3 a 5 mm. Contudo, um estudo de Hayes (apud GAVIN, 1957a) indicou que uma camada de 8 mm gerava resultados mais reprodutíveis. Por fim, Gavin (1957a) concluiu que o importante não é o valor exato da espessura de meio de cultura, mas sim, a necessidade de uma espessura constante ao longo da placa.

Schmidt e Moyer (1944) testaram dois diferentes volumes de meio de cultura para o doseamento de penicilina em placas com monocamadas e observaram halos nítidos

quando 25 ml foram empregados. No entanto, com 15 ml de ágar, não foi possível distinguir os halos de inibição.

No doseamento das colicinas foram utilizadas placas com monocamada, sendo testadas espessuras de 2 a 6 mm. Verificou-se, neste caso, uma pequena redução no diâmetro do halo de inibição com o aumento da espessura do meio inoculado. Não existiu correlação entre a inclinação da regressão e a espessura da camada de ágar usado no ensaio. No entanto, quando camadas de espessura menor que 2 mm foram utilizadas, o diâmetro dos halos foi maior. Contudo, a espessura da camada foi desigual ao longo da placa, o que causou aumento do erro residual (RICHARDSON *et al*, 1968).

Brady e Katz (1990), para o doseamento da clortetraciclina, utilizaram diferentes volumes de ágar inoculado (7, 9, 12, e 15 ml) em placas com monocamada e verificaram que maiores halos foram conseguidos com camadas menos espessas (isto é, menor volume de meio).

- *Quantidade de ágar*

Existem estudos que reportam que a sensibilidade do método de difusão pode ser aumentada pela redução do conteúdo de ágar no meio (GAVIN, 1957a).

Richardson e colaboradores (1968) testaram diferentes concentrações de ágar (0,5 e 1,0% p/V) no doseamento das colicinas. O resultado mais satisfatório foi obtido quando o conteúdo de ágar no meio foi suficiente para formar um gel firme, isto é com uma concentração de 1,0% (p/V). Com concentrações mais baixas, considerável quantidade de água permaneceu na superfície do ágar durante o período de pré-difusão, o que gerou um erro maior que o obtido com o meio com maior conteúdo de ágar. Além disso, com este último, os pontos observados se ajustaram melhor a regressão teórica.

- *pH do meio de cultura*

O pH do meio de cultura deve ser ajustado a um valor que permita o crescimento adequado do microrganismo teste, a atividade e estabilidade da molécula ensaiada (GAVIN, 1957a).

Meios de cultura com pH ajustados para 6, 7 e 8 foram testados por Schmidt e Moyer (1944) para o doseamento de penicilina. Halos maiores e com bordas bem definidas foram observados quando o meio com pH 6 foi empregado. Ao aumentar o valor de pH, os halos se tornaram menos nítidos.

No doseamento de estreptomicina, verificou-se que a sensibilidade do ensaio aumentou quando condições alcalinas (pH $7,9 \pm 0,1$) foram utilizadas (LOO *et al*, 1945).

Stansly e Schlosser (1947) testaram meios com pH 5, 7 e 9 no doseamento de polimixina com *Escherichia coli*. Os autores observaram crescimento do microrganismo teste no meio com pH 5, contudo não houve formação de halos de inibição. Já em meio com pH 9, os halos de inibição formados foram menores que os observados em pH 7.

Foram testados 71 isolados clínicos de cinco espécies do gênero *Streptococcus* (atual *Enterococcus*) com quinze antibióticos em meios de cultura com valores de pH ajustados para 5; 7,4 e 8,5. Penicilina, ampicilina, cefalosporina, cefaloridina e novobiocina foram consideravelmente mais ativas contra todas as cepas em um pH 5 do que em meios mais alcalino. Por outro lado, lincomicina, cindimicina, eritromicina e gentamicina foram moderada a marcadamente mais ativas em pH 8,5. Nenhuma importante diferença foi notada na susceptibilidade das cepas a kanamicina e estreptomicina aos níveis de pH testados (TOALA *et al*, 1970).

O doseamento de tiocianato de eritromicina pelo método de difusão em ágar foi realizado por Bernabéu e colaboradores (1999) que testaram a influência de valores de pH (6,4; 8; 8,5 e 9) do meio de cultura sobre o diâmetro dos halos de inibição. Eles verificaram que a inclinação da curva analítica aumentava com a elevação de pH, tornando o método mais sensível.

- *Influência de diferentes lotes de meio de cultura*

Loo e colaboradores (1945) verificaram a variação do halo de inibição da estreptomicina quando diferentes lotes de meio de cultura foram empregados.

Fujihara *et al* (1994) estudaram o efeito do meio de cultura de diferentes produtores na determinação da potência de sulfato de polimixina B. Os resultados demonstraram que não existiu diferença entre a potência de sulfato de polimixina obtida por lotes diferentes de um mesmo fabricante. Contudo, a diferença torna-se significativa quando são comparados resultados originados pelos meios de diferentes fabricantes. Os dois maiores componentes de sulfato de polimixina B, as frações polimixina B1 e B2, foram isoladas e purificadas por cromatografia preparativa líquida de alta eficiência. O efeito do ágar na determinação de potência destes dois componentes foi individualmente analisado. Os resultados mostraram que a diferença foi significativa na determinação de potência relativa de polimixina B2, sendo a diferença de 1,3 vezes de um fabricante para outro.

Um método por CLAE desenvolvido para quantificação de gentamicina foi capaz de separar cinco picos correspondentes aos derivados de sulfato de gentamicina (C1, C1a, C2, C2a e C2b). Este método foi empregado para comparar a cinética de difusão do antibiótico em ágar Mueller-Hinton de quatro diferentes produtores. Foi verificado que após 24h de difusão do antimicrobiano, as concentrações encontradas no ágar a 9 mm do disco impregnado foram significativamente diferentes para os quatro fabricantes. Tal ponto (9 mm) corresponde à distância próxima do diâmetro do halo de inibição para *P. aeruginosa* e gentamicina (16 – 21 mm) – COMUZZI, 2001.

- Composição

É conhecido que a composição do meio de cultura pode afetar a atividade de antimicrobianos.

Dubos e Hotchkiss (1941) verificaram que a atividade da gramicidina é parcialmente inibida por peptonas. A ação antimicrobiana deste composto contra *S. aureus* foi estudada em tampão fosfato pH 7,3 e em caldo metabolizado (meio cultura filtrado, no qual a cepa de *E. coli* foi cultivada). Dubos e Hotchkiss verificaram que a gramicidina foi mais efetiva quando testada em tampão do que na presença de constituintes do caldo peptona infusão de carne.

Waksman *et al* (1942) verificaram que a ação antimicrobiana da gramicidina foi mais

bem demonstrada em caldo nutriente que em ágar devido à baixa solubilidade desta substância em água e sua pobre difusão em ágar. Além disso, testaram diferentes ágares: ágar nutriente, ágar infusão cérebro coração e ágar Czapek (sacarose, nitrato de sódio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, sulfato de ferroso, fosfato de potássio monobásico e ágar). A principal diferença entre estes meios foi que o último não possui peptona em sua composição. Os autores verificaram que a atividade da gramicidina foi maior no meio sem peptona.

Em 1949, Reedy e Wolfson investigaram a atividade antimicrobiana da tirotricina e suas frações (gramicidina e tirocidina) contra *S. faecalis* e *S. aureus* em três diferentes meios de cultura: Edamin[®] 0,8% (lactalbumina), Bacto Peptona 1,0% e Infusão cérebro coração 3,7%. Foi observada que a CIM de tirotricina para o *S. faecalis* e *S. aureus* foi menor quando se empregou o meio Edamin[®]. Ao ser adicionado soro de cavalo a 5% aos meios, a CIM aumentou drasticamente. Os autores verificaram que a cepa de *S. faecalis* foi mais sensível a tirotricina que o *S. aureus*. Assim, a tirocidina e gramicidina foram testados contra *S. faecalis* em meio Edamin[®] com e sem soro sanguíneo. A gramicidina foi 10000 vezes mais ativa que a tirocidina na ausência de soro. Contudo, a presença deste causou o aumento da CIM para ambos os antibióticos.

Curry (1963) também testou diferentes meios para realização do doseamento de tirotricina com *S. faecalis* ATCC 10541. Dentre os meios, o ágar tioglicolato (preparado com fluido tioglicolato adicionado de ágar a 1,5%) foi o que permitiu o crescimento do microrganismo teste e a atividade da tirotricina. Aparentemente nos meios Stock culture[®] (Difco) e Micro Inoculum agar[®] (BBL) a atividade antimicrobiana foi inibida.

A inibição do crescimento de *S. faecalis* pela gramicidina e valinomicina está associada à perda de íons rubídio e potássio. Contudo, a inibição foi revertida quando um meio de cultura rico em potássio foi empregado (HAROLD e BAARDA, 1967).

Woodruff e Foster (1946) observaram que a atividade da bacilina foi reduzida na presença de infusão cérebro coração, triptona, sangue de coelho e soro sanguíneo. As peptonas promoveram a inibição da atividade antimicrobiana, contudo tal fato não

foi verificado com o extrato de carne. Hidrolisados ácidos e enzimáticos de gelatina e caseína também reduziram a ação da bacilina.

Stansly e Schlosser (1947) investigaram se a adição de substâncias que reduzem a tensão superficial poderia aumentar a difusão do antibiótico no ágar e assim tornar o diâmetro do halo de inibição maior. Polissorbato 60 foi incorporado ao ágar e verificou-se aumento dos halos de inibição nas placas em que esse meio foi utilizado. Por efeito de comparação, polissorbato 80 também foi testado, não sendo observada diferença entre os halos obtidos por ambos tensoativos.

A atividade da neomicina em soro sangüíneo e em várias preparações de plasma foi testada pelo método de difusão em ágar por Fedorko e Katz (1965). Eles verificaram que a ação do antimicrobiano reduziu grandemente em presença de veículos contendo anticoagulantes. Tal fato foi atribuído à depressão da difusibilidade do antibiótico em ágar pelo anticoagulante.

Em 1971, Raymond e Traub testaram a sensibilidade à gentamicina de isolados de enterococos empregando diferentes meios de cultura. Com poucas exceções, os isolados foram resistentes ao antibiótico quando a susceptibilidade foi testada em caldo ou ágar infusão cérebro coração e caseína soja. Contudo, a adição de sangue a 5% aos ágares caseína soja e infusão cérebro coração promoveu acentuada atividade do antibiótico, indicando que a ação antimicrobiana da gentamicina depende da composição do meio de cultura.

Pursiano, e colaboradores (1973) estudaram o efeito de meios com diferentes composições sobre a atividade de algumas penicilinas e cefalosporinas, cujas estruturas químicas apresentavam uma cadeia lateral nas posições 6 ou 7 do anel β -lactâmico. A composição do meio realmente afetou a ação antimicrobiana, sendo que no caso destes compostos, o efeito foi aparentemente governado pela natureza química das cadeias laterais das penicilinas e cefalosporinas. Em comparação com suas atividades em caldo nutriente, a atividade de alguns β -lactâmicos que possuem um grupo básico ou levemente básico na cadeia lateral foi reduzido por quarenta vezes em um ou mais meios: Mueller-Hinton, caseína-soja, meio para antibióticos e caldos infusão cérebro coração. Em contraste, o meio do ensaio não apresentou nenhum efeito sobre a atividade de compostos que possuíam funções ácidas ou não

ionizáveis na cadeia lateral. A extensão pelo qual o meio influenciava a atividade antimicrobiana foi também dependente do microrganismo e do método de ensaio. O efeito foi mais pronunciado no método de diluição em caldo do que difusão em ágar e ocorreu mais frequentemente em bactérias Gram-negativo.

Estudos demonstraram que a susceptibilidade da *P. aeruginosa* a gentamicina é influenciada pela concentração de magnésio e cálcio no meio bacteriológico. Ronda e colaboradores (1975) estudaram o efeito de cátions divalentes, como magnésio e cálcio, na ligação de aminoglicosídeos às células bacterianas bem como a influência das proteínas do soro humano. Foi verificado que a ligação da gentamicina e de outros aminoglicosídeos às proteínas do soro humano variava significativamente com a carga do meio empregado. Os autores observaram que as ligações às proteínas aumentavam com a redução da concentração de cátions divalentes. A interação da gentamicina com as células de *P. aeruginosa* também aumentava e sua atividade antimicrobiana era acentuada na ausência dos cátions. Em contrapartida, a ligação do aminoglicosídeo às células de *E. coli* e sua ação bactericida não variaram na presença ou ausência de cátions divalentes. Os autores sugeriram que a interferência com a captação de gentamicina seria uma plausível explicação para a observação de que a CIM de gentamicina para a *P. aeruginosa* aumentou com a elevação da concentração de cálcio ou magnésio.

Brady e Katz (1990) variaram o conteúdo de nutrientes do meio de cultura (75, 100, 125% da composição) empregado no doseamento de clortetraciclina, contudo a concentração de ágar permaneceu inalterada. Maiores halos de inibição foram formados no meio com menor conteúdo de nutrientes.

Em 2000, Butaye *et al* investigaram a influência de diferentes compostos na atividade *in vitro* da flavomicina contra espécies de *Enterococcus* e verificaram que a adição de proteínas ao meio Mueller-Hinton inibiu fortemente a atividade antimicrobiana. A presença de glicose não teve nenhum efeito, já o amido promoveu a redução da ação da flavomicina. Outras substâncias como polissorbato 80 e tributirina aumentaram a atividade contra várias espécies de enterococos.

- Tempo de pré-difusão

O tempo decorrente entre adicionar as soluções às placas e colocá-las para incubar

pode variar. A taxa de difusão da substância no ágar determina o tamanho do halo de inibição que também está correlacionado com a taxa de crescimento do microrganismo. A atividade da substância é medida somente pela extensão da difusão do antimicrobiano antes de começar a proliferação do microrganismo. Se halos maiores são desejados, então a fase lag do crescimento microbiano deve ser alterada. Isto pode ser obtido pela permanência das placas a temperatura ambiente ou por sua refrigeração antes de incubá-las. Para reduzir a fase lag, resultando em halos menores, as placas podem ser incubadas antes da adição das soluções teste (GAVIN, 1957a).

Cooper e Linton (1952) verificaram que quando as placas permaneceram por um determinado tempo a temperaturas mais baixas antes da incubação, os halos obtidos eram maiores como previsto pela equação de Cooper.

No doseamento das colicinas desenvolvido por Richardson e colaboradores (1968), para cada colicina o diâmetro do halo de inibição e a inclinação da regressão foram maiores quando o período de pré-difusão foi mais prolongado. O efeito da pré-difusão em ambos, tamanho do halo e inclinação, foi marcadamente afetado quando a duração foi de 24h. Em períodos maiores que este, o diâmetro do halo e a inclinação foram proporcionais ao logaritmo do tempo de pré-difusão. Os autores definiram que o período de pré-difusão de 24h foi o ideal para o ensaio.

Kavanagh (1974) verificou que o tempo de pré-difusão causou um aumento no halo de inibição. O autor comparou os halos de inibição da estreptomicina obtidos em placas que permaneceram por 1 hora a 25 °C com halos de placas que não foram submetidas a esta condição. O tempo gasto para distribuição das soluções nos cilindros foi considerado como uma fonte de erro, já que as primeiras soluções adicionadas teriam um maior tempo para se difundir que as últimas. Este erro pôde ser reduzido com a rápida distribuição das soluções nas placas.

- Soluções do padrão e amostra

O pH das soluções da amostra e do padrão também segue a mesma linha de raciocínio do meio de cultura: devem favorecer a atividade e estabilidade do antibiótico. Soluções tampões são recomendadas como diluente para prevenir a

decomposição de substâncias pH-sensíveis. Portanto, os valores de pH do meio de cultura e das soluções devem ser se possível similares (Gavin, 1957a).

Loo e colaboradores (1945) compararam os halos de inibição obtidos com soluções de estreptomicina, na mesma concentração, preparadas em diluentes de diferentes pH. O aumento do halo de inibição foi nítido quando a solução foi preparada em meio alcalino. Neste estudo também foram empregadas soluções de estreptomicina preparadas em diluentes contendo diferentes concentrações de sais. A adição de fosfato causou marcado aumento no diâmetro dos halos de inibição quando comparado ao controle (soluções de estreptomicina preparadas em diluente sem fosfato). Um aumento no efeito também foi observado quando cloreto de sódio, bicarbonato de sódio e sulfato de sódio foram adicionados. Contudo, na presença de tampão fosfato 0,1 M o efeito destes sais foi minimizado.

Para o doseamento de tobramicina foram testados diferentes diluentes, tais como água, tampão fosfato pH 8, pH 7 e pH 6. Os autores verificaram que a sensibilidade do ensaio aumentou com a elevação do pH das soluções teste (LAMB *et al*, 1972).

▪ Temperatura de incubação

Kavanagh (1974) empregou a equação de Cooper para estudar a influência de alguns fatores sobre o ensaio de antibióticos. A temperatura influencia dois fatores da equação: o coeficiente de difusão (D) e o tempo crítico (t). O valor de D aumenta com a elevação da temperatura, enquanto o t reduz. Como a redução de t ocorre mais rapidamente que o aumento de D, o fator Dt da equação de Cooper diminui com o aumento da temperatura. Sendo o termo Dt diretamente proporcional ao tamanho do halo, espera-se redução deste com o aumento da temperatura de incubação, o que realmente ocorreu na prática quando as temperaturas de 36 e 37 °C foram empregadas para estreptomicina.

Em 1990, Brady e Katz incubaram as placas com clortetraciclina às temperaturas 28, 30 e 32 °C e observaram que os halos aumentaram quando a temperatura de incubação foi menor.

B Método de diluição em série

O ensaio de diluição em série é simples em seu princípio, de fácil execução e com resposta do tipo tudo ou nada. Várias diluições do antibiótico em tubos pequenos são inoculadas com o microrganismo teste, incubados e a menor concentração da substância que causa aparentemente completa inibição do crescimento microbiano é considerada como a concentração inibitória mínima. A CIM da amostra é comparada à do padrão para determinar a atividade das substâncias (KAVANAGH, 1963).

Schmidt e Moyer (1944) determinaram a potência de amostras de penicilina pelo método de difusão em ágar e pelo diluição em série, e verificaram que os resultados obtidos pelo último método confirmaram os resultados do primeiro.

Donovick e colaboradores (1945) empregaram o método de diluição em série para quantificação de amostras de estreptomicina e verificaram que o desvio padrão das potências determinadas em dias diferentes foi de 7,5%. O aumento da precisão das medidas foi conseguido por preparo em duplicata dos tubos. Os autores consideraram como desvantagem do método o fato das soluções serem estéreis. Além disso, observaram que a CIM do padrão de estreptomicina modificou com a variação do lote de triptona empregado.

C Método turbidimétrico

Neste método, concentrações graduadas do antibiótico são adicionadas aos tubos contendo meio de cultura líquido inoculado com o microrganismo teste. Os tubos são incubados por determinado tempo e a resposta do microrganismo é evidenciada pela turvação do meio de cultura, a qual é medida por meio de um espectrofotômetro. O crescimento microbiano é função da concentração, sendo, portanto, a resposta graduada. Por comparação da resposta obtida para amostra com a da substância padrão determina-se a potência desconhecida (GAVIN, 1957b).

Em 1943, Foster e Wilker investigaram a influência de alguns fatores sobre o método turbidimétrico para penicilina desenvolvido por eles. Foi verificado que a alteração de pH do caldo nutriente não modificou a quantidade de penicilina necessária para inibir 50% do crescimento de *S. aureus*. A adição de glicose no meio também foi pesquisada e observou-se a obtenção de curvas de inibição irregulares. Neste

mesmo trabalho foi descrito outro procedimento turbidimétrico para doseamento da penicilina empregando como microrganismo teste o *Bacillus adhaerans*. Em ambos os métodos, a curva analítica foi obtida por plotar a porcentagem de transmitância *versus* a concentração do antibiótico.

McMahon (1944) testou a influência do tempo de incubação na potência obtida pelo método turbidimétrico para a penicilina e verificou não haver diferença entre os resultados obtidos para os tempos de 3h; 3h30min e 4h de incubação.

O doseamento turbidimétrico para cloranfenicol foi descrito por Smith e colaboradores (1948) que utilizaram a porcentagem de crescimento da *Shigella paradysenteriae* como resposta. Esta foi plotada contra o logaritmo da concentração para obtenção da curva analítica.

Joslyn e Galbraith (1950) investigaram vários fatores (densidade do inóculo, composição do meio de cultura e presença e ausência de substâncias antimicrobianas) com o objetivo de desenvolver um método turbidimétrico que seria adequado para determinar a atividade de compostos que não possuíam substâncias de referência disponíveis. No caso dos testes com antibióticos foram empregados o cloranfenicol e *Shigella sonnei* como microrganismo teste. O fim da incubação foi determinado pelo crescimento microbiano do tubo controle (sem antibiótico) que deveria alcançar 72% T. A curva analítica foi obtida pela relação entre a porcentagem de crescimento microbiano e o logaritmo da concentração.

Em 1973, Stankewich e Upton desenvolveram um método turbidimétrico para quantificação da carbenicilina empregando a *E. coli* como microrganismo teste. A curva analítica relacionando a absorvância e a concentração de carbenicilina foi obtida e a análise de regressão demonstrou que o desvio de linearidade não foi significativo. Influência do pH do meio e tempo de incubação foram testados. A precisão do método foi determinada por análise de dois diferentes lotes de carbenicilina em cinco dias consecutivos. Essas amostras também foram analisadas pelo método de placas. O desvio padrão relativo foi calculado para ambos os métodos, sendo igual a 1,1% para o turbidimétrico e 3,8% para o de difusão. Os autores concluíram que o método é mais preciso que o de placas, no entanto, os resultados obtidos pelos dois não foram significativamente diferentes.

✓ Teoria quantitativa do crescimento e inibição microbiano

A leitura de turbidez dos tubos pode ser feita em absorvância (densidade óptica) ou porcentagem de transmitância. No entanto, Treffers (1956) em seu trabalho preferiu usar a leitura em densidade óptica que em porcentagem de transmitância, uma vez que em uma faixa apropriada de concentração, a densidade óptica é diretamente proporcional à massa microbiana em condições padronizadas. Neste trabalho várias curvas concentração-resposta foram mostradas, sendo que a mais vantajosa foi obtida ao se plotar o logaritmo da concentração versus probito (desvio unitário da curva normal x 5).

Contudo, Kavanagh (1968) questionou o uso do gráfico log-probabilidade, introduzido por Treffers (1956) por se tratar de uma relação empírica entre a concentração do antibiótico e o crescimento microbiano observado. Uma nova equação relacionando a turbidez e a concentração do antibiótico foi desenvolvida assumindo quatro suposições: (i) a fase lag é zero ou a mesma para todas as concentrações do antibiótico; (ii) as condições de incubação são idênticas para todos os tubos ensaiados; (iii) as bactérias em todos os tubos estão em fase logarítmica do crescimento quando a incubação é finalizada, e a taxa de geração no tubo individual é constante durante a incubação; (iv) a constante da taxa de crescimento aparente é função linear da concentração do antibiótico. A equação resultante demonstrou uma relação linear entre o logaritmo da concentração de células (em um tempo t) e a concentração do antimicrobiano. Os dados fotométricos não se ajustaram plenamente à equação porque a suposição (iii) foi violada.

Segundo Rippere (1979), quando uma faixa extensa de concentração é testada, uma sigmóide é obtida ao se plotar o logaritmo da concentração versus a absorvância. A porção central da curva demonstra uma relação linear entre a concentração e a resposta e somente esta porção pode ser utilizada para prever com exatidão a potência de amostras. Esta porção linear, idealmente, apresenta uma inclinação de -0,4 a -1,2 unidades de absorvância, baseada no aumento de 10 vezes na concentração. A inclinação deve ser reprodutível em dias diferentes, bem como a linearidade da resposta na faixa ensaiada. A inclinação menor que -0,4 não é desejável por gerar medidas de crescimento inexatas em tubos após a incubação, o que irá refletir em uma inapropriada estimativa da potência da amostra com um

desvio positivo de 3%. Por outro lado, inclinações maiores que -1,4 ou -1,5 são usualmente acompanhadas por uma ampla variação no crescimento de tubo para tubo gerando resultados imprecisos.

✓ **Fatores que influenciam o método turbidimétrico**

Vários fatores influenciam o método turbidimétrico, sendo que alguns são similares aos do método por difusão em ágar. É o caso das soluções do ensaio e do pH e da composição do meio de cultura (GAVIN, 1957b).

▪ Substâncias a serem ensaiadas

As substâncias devem ser solúveis em água ou em solvente miscível em água que não interfira no crescimento microbiano na concentração usada; não devem causar turvação ou precipitar. As soluções preparadas devem ser estéreis.

▪ Incubação

A incubação pode ser realizada em banho-maria ou em estufa. Contudo, em banho-maria a variação de temperatura é menor, principalmente se um banho com circulação de água é empregado.

▪ Término da incubação

Ensaio de antibióticos são finalizados por adição de uma substância que interrompe o crescimento microbiano, geralmente formaldeído a 12%, ou aquecimento a 80 °C. Segundo Kavanagh e Ragheb (1979), o aquecimento em banho-maria a 80 °C é o melhor método, pois todos os tubos podem ser imersos ao mesmo tempo no banho. Quando se emprega a adição de formaldeído tubo a tubo, a diferença de tempo existente entre o primeiro e o último tubo a receber a solução promove um erro na medida do crescimento, o qual é evitado com o uso do banho-maria. Em um experimento em que os dois métodos foram utilizados, o desvio padrão para o método de aquecimento (0,0077) foi menor que para o outro (0,010).

▪ Medida de turbidez

As células devem estar homogeneamente distribuídas no caldo, portanto, o tubo

deve ser invertido várias vezes e a leitura realizada 15 minutos após a ressuspensão. O tempo gasto para realizar a leitura dos tubos deve ser menor que 15 minutos para 80 tubos (KAVANAGH e RAGHEB, 1979).

- Limpeza da vidraria

Um fator importante para a boa performance do método turbidimétrico é a limpeza da vidraria utilizada no procedimento, além de outras questões, como o resíduo das substâncias usadas no processo de limpeza. O resíduo de ácidos crômico e sulfúrico originados da solução de limpeza pode ser tão efetivo em reduzir o crescimento microbiano como o antibiótico. A utilização de uma mistura de ácido sulfúrico e nítrico (95:5) é mais eficaz que a solução crômica, além de evitar problemas com os íons de cromo. Após imersão da vidraria na solução ácida por 24 horas, o enxágüe deve ser realizado treze vezes em água corrente e duas vezes em água destilada (KAVANAGH, 1963).

3.6 Delineamentos de ensaios microbiológicos

Em muitos ensaios, é necessária uma inspeção preliminar dos dados experimentais para verificar se estes seguem as suposições particulares de cada ensaio. No caso dos doseamentos microbiológicos é considerado que: a relação entre o logaritmo da concentração e a resposta pode ser representada por uma linha reta na faixa empregada; as respostas obtidas para cada concentração são normalmente distribuídas; o desvio padrão de cada resposta é independente do efeito em si e a distribuição dos tratamentos é um processo randômico (INTERNATIONAL..., 1979).

- ✓ **Retas paralelas 3x3 e 2x2**

O delineamento retas paralelas 3x3 é dito simétrico, pois a razão entre as concentrações adjacentes e o número de concentrações ensaiadas do padrão e da amostra são iguais. Ao se plotar as respostas obtidas para o padrão e amostra contra o logaritmo da concentração, duas retas são obtidas. Estas devem ser paralelas, uma vez que padrão e amostra contêm a mesma substância. Além disso, devem apresentar regressão significativa, isto é, o microrganismo deve responder de forma diferente às concentrações do antibiótico. E por fim, a relação entre o logaritmo da concentração e o diâmetro do halo deve ser linear. Baseado nestes três

fatores, as fórmulas para o cálculo de potência foram desenvolvidas (BLISS, 1956; HEWITT, 1977).

No trabalho de Bliss (1956), são descritas as fórmulas para o cálculo de potência e dos parâmetros de validade do ensaio. Também é explicada a necessidade do cálculo de intervalo de confiança, o qual é uma medida da precisão de cada potência determinada. Neste intervalo espera-se que esteja incluído o valor verdadeiro da potência da amostra com certo nível de confiança (geralmente 95%). Ensaio simétricos, como o caso do 3x3, geram intervalo de confiança mais estreito.

Laska e Meisner (1987) em sua revisão sobre métodos estatísticos para bioensaios demonstraram a dedução das fórmulas de cálculo de potência. Neste trabalho é nitidamente perceptível que o logaritmo da potência relativa corresponde à distância horizontal entre as retas do padrão e da amostra.

O delineamento 3x3 foi utilizado no método de difusão em placas para doseamento de cetoconazol em xampu desenvolvido por Staub e colaboradores (2005). Salgado *et al* (2006) também empregaram este delineamento em seu trabalho sobre o doseamento de gatifloxacino em formas farmacêuticas.

Um delineamento de execução mais simples é o retas paralelas 2x2, uma vez que são utilizadas apenas duas concentrações de cada preparação. Contudo, é preconizado na farmacopéia brasileira (FARMACOPÉIA..., 1989) que seu emprego somente possa ser feito após o desenvolvimento do ensaio 3x3.

✓ Delineamento 5x1

É um delineamento descrito na farmacopéia americana (THE UNITED..., 2008) em que se empregam cinco concentrações do padrão para obtenção da curva analítica e uma da preparação amostra. Portanto, é um ensaio assimétrico.

Foi classificado por Hewitt (2007) como sendo um ensaio de retas paralelas devido à base do cálculo ser a mesma do ensaio de retas paralelas: a resposta deve ser diretamente proporção ao logaritmo da concentração.

Neste delineamento cada placa contém apenas dois tratamentos: a solução do

padrão correspondente à concentração intermediária da curva analítica (solução de referência) e uma das outras quatro soluções do padrão ou a solução da amostra. Devido à variação entre as placas, as respostas do padrão devem ser corrigidas a partir da resposta da solução de referência presente em todas as placas.

O procedimento de correção do FDA consiste em calcular a média das respostas de todas as placas para cada concentração do padrão (\bar{P}_i); a média da solução de referência para cada nível de concentração (\bar{P}_{3i}) e a média de todas as respostas da solução de referência (\bar{P}_3).

A correção é feita pelas equações 1 e 2:

$$F_{ci} = \bar{P}_3 - \bar{P}_{3i} \quad (\text{equação 1})$$

$$\bar{P}_c = \bar{P}_i + F_{ci} \quad (\text{equação 2})$$

As respostas corrigidas são empregadas para obtenção da curva analítica. O método da farmacopéia americana (THE UNITED..., 2008) consiste em calcular as respostas para as concentrações mais baixa e mais alta da curva, a partir das respostas corrigidas de todas as concentrações. A inclinação da reta resultante da união desses dois pontos será utilizada no cálculo da potência. A partir deste procedimento, não é possível avaliar o ajuste dos dados ao modelo linear proposto.

A farmacopéia mexicana (FARMACOPEA..., 2004) e o Hewitt (2007) apresentam um cálculo em que se faz a correção individual dos halos e todas as respostas são empregadas para obtenção da curva analítica, o que permite avaliar se o modelo é adequado.

Em 1979, Kavanagh empregou o delineamento 5x1 para o doseamento de cefalexina e avaliou a forma de correção das respostas segundo o método do FDA. Ele verificou que este procedimento não acarreta erro somente quando a média do diâmetro da solução de referência for idêntica ao ponto central da melhor curva analítica. Quando a correção foi realizada tanto nos halos do padrão quanto da amostra, a estimativa da potência a partir da equação de regressão evitou estes erros.

3.7 Métodos para doseamento da tirotricina e gramicidina

A Método baseado na hemólise

O método de doseamento da tirotricina desenvolvido por Dimick (1943) foi baseado na propriedade hemolítica do antimicrobiano. Uma suspensão de eritrócitos foi preparada e distribuída em tubos, nos quais se adicionaram as soluções de tirotricina de 8 a 20 µg/ml. A porcentagem de transmitância dos diferentes tubos foi determinada a 660 nm. O valor da diferença de transmitância de um tubo contendo os eritrócitos não hemolisados daquele com a tirocidina foi utilizado como resposta para obtenção da curva analítica. Segundo o autor, o método apresentou boa precisão.

B Métodos microbiológicos

A tirotricina, produzida pelo *Bacillus brevis*, é constituída pelos antibióticos tirocidina e gramicidina. Nos vários métodos microbiológicos descritos para doseamento da tirotricina, somente a gramicidina interfere nas medidas das respostas, uma vez que a tirocidina pode ser inativada por certos componentes do meio de cultura, além de ser menos ativa que a gramicidina sobre o microrganismo teste. Desta forma, a tirocidina não contribui para atividade antimicrobiana observada (LECLERCQ, 1968).

✓ Método de difusão em ágar

A aplicação do método de difusão em ágar para o doseamento da tirotricina é dificultada pelos fatos do antibiótico não se difundir bem no meio de cultura sólido e pela baixa solubilidade em água (LECLERCQ, 1968; VIOLA e CANESTRINI, 1966). Contudo, tal método foi desenvolvido por Vuilleumier e Anker (1958) que empregaram como microrganismo teste a *Sarcinea lutea* ATCC 9341 (atual *Kocuria rhizophila* ATCC 9341), em placas com monocamada, com um intervalo de 5 a 15 µg/ml de tirotricina e utilizando um tempo de pré-difusão de 8 horas a temperatura ambiente. Este método foi modificado por Viola e Canestrini (1966) que aumentaram o tempo de pré-difusão para 20 horas a temperatura de aproximadamente 5 °C. A reta obtida por Viola e Canestrini (1966) apresentou uma inclinação menos acentuada que a encontrada pelo método de Vuilleumier e Anker (1958), no entanto halos de maior diâmetro foram observados.

Curry, J. (1963) também desenvolveu um método para doseamento da tirotricina empregando a técnica de gradiente em placa que consistiu na utilização de placas com três camadas: a primeira contendo apenas o meio de cultura que forma uma camada inclinada; a segunda constituída por ágar adicionado de tirotricina cuja solidificação foi feita em superfície plana; e por fim, uma camada de pequena espessura de meio de cultura inoculado com *S. faecalis* ATCC 10541 (atual *Enterococcus hirae* ATCC 10541). Após incubação, o comprimento da área em que ocorreu o crescimento microbiano na placa foi medida e a potência, em porcentagem, calculada pela relação:

$$\frac{\text{resposta}_{\text{padrão}}}{\text{resposta}_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{equação 3}).$$

Para gramicidina S, Toit e Rautenbach (2000) desenvolveram um método por difusão em micro-gel (DM) para determinação da atividade antimicrobiana deste antibiótico. Neste estudo, o método desenvolvido foi comparado aos métodos por difusão em ágar (DA) e ao turbidimétrico adaptado para microplacas (MT). Nesses experimentos, empregou-se como microrganismo teste *Micrococcus luteus* NCTC 8340. A gramicidina S foi solubilizada em água. A resposta foi determinada medindo os halos de inibição em DA e determinando a dispersão da luz ($\lambda=620$ nm) em DM e MT. Os três métodos foram comparados, sendo que DM e MT foram aproximadamente duas vezes mais sensíveis que DA. Os resultados obtidos para os três métodos foram altamente reprodutíveis.

Rautenbach *et al* (2006) avaliaram a influência da estrutura de peptídeos sobre a magnitude da resposta antimicrobiana empregando entre eles a gramicidina S. Uma curva dose-resposta foi obtida utilizando o método de difusão em micro-gel e *Escherichia coli* HB101 como microrganismo teste.

✓ Método de diluição em série

Reedy e Wolfson (1950) desenvolveram o método de diluição em série para doseamento da tirotricina. Utilizou-se como microrganismo teste o *S. faecalis* M 19 (atual *E. hirae* ATCC 10541) que foi altamente sensível a gramicidina (respondeu a concentração de 0,0004 $\mu\text{g/ml}$), porém não respondeu tão bem a tirocidina

(0,3 µg/ml). Os autores destacaram a identificação de variantes resistentes à gramicidina quando transferências diárias em caldo foram realizadas. Neste estudo foram descritas técnicas para extração da tirotricina de formas farmacêuticas em que os excipientes poderiam interferir no doseamento do antibiótico. Foi relatado que a recuperação em alguns casos, como em pomadas, foi de no mínimo 80%.

Em 1983, Ando e colaboradores utilizaram a metodologia de diluição em série para avaliar a atividade antimicrobiana da gramicidina S em estudo de relação estrutura-atividade deste peptídeo. A CIM foi determinada para bactérias Gram-positivo e Gram-negativo conforme informações contidas na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade biológica da gramicidina S.

Microrganismo	CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> FDA 209P	6,25
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	3,13
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	> 100
<i>Salmonella typhosa</i> Boxhill 58	> 100
<i>Shigela flexneri</i> EW-10	6,25
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DT	12,5
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3988	>100

FONTE: ANDO *et al*, 1983.

Niaraki *et al* (2000) ao estudarem a relação estrutura-atividade em análogos da gramicidina S, também avaliaram a atividade antimicrobiana desta contra vários microrganismos: bactérias Gram-positivo e negativo e levedura. Neste sentido, a CIM para cada microrganismo foi determinada empregando o método microbiológico turbidimétrico (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade biológica da gramicidina S contra bactérias Gram-positivo, Gram-negativo e levedura.

Microrganismo	CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> SAP0017	1,5
<i>S. aureus</i> K147	1,5
<i>S. epidermidis</i>	1,5
<i>Bacillus subtilis</i>	3,1
<i>E. faecalis</i>	1,5
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,5
<i>Candida albicans</i>	4,0
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> K799	25
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> Z61	6,2
<i>Salmonella typhimurium</i> C587	18
<i>Salmonella typhimurium</i> C610	9,0
<i>Escherichia coli</i> UB1005	9,0
<i>Escherichia coli</i> DC2	3,1

FONTE: NIARAKI *et al*, 2000.

Kiricsi e companheiros (2002) avaliaram análogos da gramicidina S, (que se diferenciavam pelo tamanho do anel da molécula), em relação à inibição do crescimento de *Acholeplasma laidlawii* B utilizando método turbidimétrico.

Em 1996, Tanimoto *et al* estudaram a ação da gramicidina S sobre esporos dormentes de *Bacillus subtilis*, determinando a concentração inibitória mínima da gramicidina S utilizando o método turbidimétrico (resposta do tipo tudo ou nada).

✓ Método turbidimétrico

Um método turbidimétrico para tirotricina foi desenvolvido utilizando o *S. hemolyticus* ATCC 9854 na fase logarítmica do crescimento. Soluções de tirotricina na faixa de 0,06 a 0,225 µg/ml foram preparadas e adicionadas (200 µl) aos tubos com 5 ml de meio inoculado (inóculo a 2%). O delineamento 4x1 foi empregado e a curva analítica obtida ao plotar a resposta versus a concentração de antibiótico no meio de cultura. A precisão do ensaio foi avaliada pela determinação de potência nos níveis 80, 100 e 120% em seis doseamentos realizados em três semanas. A variabilidade dos resultados foi menor que a obtida pelo método descrito na farmacopéia americana XIV (MILLER *et al*, 1952).

O método turbidimétrico desenvolvido por Kramer e Kirshbaum (1955) empregava 9 ml de meio de cultura inoculado com *S. faecalis* ATCC 10541 (inóculo a 1%) e 1 ml de soluções de tirotricina de 0,008 a 0,032 µg/ml. Após a incubação a porcentagem de transmitância foi lida em um colorímetro com filtro de 580 nm, cujos 100 e 0% foram ajustados com os tubos com a maior e menor concentração de tirotricina padrão, respectivamente. A concentração de tirotricina versus a porcentagem de transmitância foi plotada para obtenção da curva analítica. O erro padrão do doseamento da amostra a 0,02 µg/ml foi de 0,0006 µg/ml. O método foi aplicado no ensaio de várias formas farmacêuticas contendo tirotricina e não foi verificada interferência dos demais compostos da formulação. Também foi realizado o doseamento de gramicidina em soluções nasais empregando a técnica descrita e os resultados foram satisfatórios.

Os fatores que influenciam o doseamento da tirotricina pelo método turbidimétrico foram discutidos por Leclercq (1956), que realizou um procedimento empregando

S. aureus 209 P e *S. faecalis* M 19 como microrganismos teste (inóculo a 2%). A relação entre o logaritmo da concentração e a resposta foi utilizada para obtenção da curva analítica. A interferência causada pela presença de brometo de cetiltrimetilamônio nas formulações foi estudada e verificou-se que em uma concentração cinquenta vezes superior a da tirotricina, o quaternário de amônio não influencia nos resultados.

Em 1966, Leclercq publicou uma revisão dos métodos de doseamento turbidimétrico para tirotricina e descreveu procedimentos para quantificação de gramicidina e tirocidina isoladas e misturas dos dois antibióticos em diferentes proporções.

Em 1965, Casilli e colaboradores também desenvolveram um método turbidimétrico para quantificar a tirotricina em presença de brometo de cetiltrimetilamônio, que apresenta atividade antimicrobiana podendo interferir nos resultados de potência da tirotricina. Foi utilizado como microrganismo teste uma cepa de *S. aureus* resistente ao brometo de cetiltributilamônio.

A farmacopéia americana (THE UNITED..., 2008), a britânica (BRITISH..., 2007) e a mexicana (FARMACOPEA..., 2004) trazem a monografia da gramicidina matéria-prima. Os três compêndios preconizam o doseamento microbiológico turbidimétrico para a quantificação da gramicidina (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição dos métodos turbidimétrico existentes para doseamento da tirotricina ⁽ⁱ⁾ e gramicidina ⁽ⁱⁱ⁾.

(continua)

Autores, ano	Microrganismo teste	Composição do meio de cultura	Solvente	Concentração do antimicrobiano (µg/ml)	Duração de incubação	Modo de leitura	Fim de crescimento microbiano
REEDY e WOLFSON, 1950 ⁽ⁱ⁾	<i>Streptococcus faecalis</i> M-19	Digesto trípico de lactalbumina	Álcool etílico a 95%	0,1	18 – 24 horas	Turvação do meio de cultura	...
MILLER <i>et al</i> , 1952 ⁽ⁱ⁾	<i>Streptococcus hemoliticus</i> ATCC 9854	Triptona; fosfato de potássio bibásico; glicose adicionado de albumina	Álcool etílico a 95% (solução estoque); Propilenoglicol 50% (v/v) e álcool etílico (87,5:12,5) – solução de trabalho	0,225; 0,150; 0,100; 0,066 (curva analítica); 0,125 (amostra)	Quando a diferença de turvação entre o tubo com a maior e a menor concentração de tirotricina for de 30 a 40 unidades de turbidez de Klett (em torno de 5h – 5h30min)	colorímetro	Banho de gelo seguido de adição de solução de formaldeído a 12%
KRAMER e KIRSHBAUM, 1955 ⁽ⁱ⁾	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	Peptona, extrato de levedura, de carne, cloreto de sódio, glicose, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico (Penassay broth)	Álcool etílico a 95% (solução estoque); água (soluções de trabalho).	0,032; 0,028; 0,024; 0,020; 0,016; 0,012; 0,008 (curva analítica); 0,020 (amostra)	3 horas	Colorímetro (filtro 580 nm)	Adição de solução de formaldeído a 12%

Autores, ano	Microrganismo teste	Composição do meio de cultura	Solvente	Concentração do antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$)	Duração de incubação	Modo de leitura	Fim de crescimento microbiano
LECLERCQ, 1956 ⁽ⁱ⁾	<i>Streptococcus faecalis</i> M-19 ou <i>Staphylococcus aureus</i> 2090	Extrato de carne, de levedura, peptona bacteriológica, glicose, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, peptona de caseína	Álcool etílico a 60% (solução estoque); solução de propilenoglicol 50% e álcool etílico 95% (87,5:12,5) – soluções de trabalho	0,026; 0,040; 0,060; 0,090 (curva analítica); 0,033; 0,050; 0,075 (amostra)	Aspecto adequado da curva analítica (em torno de 4 horas)	nefelômetro	Adição de formaldeído
CASILLI e RAGNI, 1965 ⁽ⁱ⁾	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente ao brometo de cetiltrimetilamônio	Caldo Penassay	Álcool etílico a 95% (solução estoque); água (soluções de trabalho)	10	Quando os tubos sem tirotricina apresentarem 42 – 46% de transmitância	Espectrofotômetro (530 nm)	Adição de formaldeído 40% e 30 minutos de repouso antes da leitura.
THE UNITED..., 2008 ⁽ⁱⁱ⁾	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	Meio nº3	Álcool etílico a 95%	1000 (solução estoque); 0,04 (concentração intermediária)	Quando o tubo contendo a solução de 0,04 $\mu\text{g/ml}$ apresentar absorvância de 0,35.	Espectrofotômetro (530 ou 580 nm)	Adição de formaldeído a 12%
BRITISH..., 2007 ⁽ⁱⁱ⁾	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 ou <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Meio C	Metanol (estoque) Tampão pH 7,0 com polissorbato 80 a 0,1 mg/ml (solução de trabalho)	Espectrofotômetro	Adição de formaldeído.

✓ Método espectrofotométrico

Um método baseado no efluxo de Rb^+ pelas células de *S. faecalis* ATCC 10541 promovido pela gramicidina foi desenvolvido por Miller (1979). É conhecido que as células do microrganismo teste são capazes de acumular íons Rb^+ durante o crescimento, portanto, esse foi cultivado em meio de cultura rico em Rb^+ . Em seguida, as células foram lavadas e utilizadas no preparo de uma suspensão distribuída em tubos contendo soluções de gramicidina em diferentes concentrações. Após 30 minutos de contato, a suspensão foi filtrada e a concentração de Rb^+ no filtrado determinada por espectrofotometria de absorção atômica. A concentração de Rb^+ apresentou uma boa correlação com a concentração de gramicidina, exceto quando o número de células utilizadas no preparo da suspensão foi baixo.

C Método cromatográfico

Boyer e colaboradores (1995) desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para doseamento de tirotricina, benzocaína e mentol presentes em pastilhas para infecções de garganta. Contudo, verificou-se que a sensibilidade ao mentol foi baixa, e assim, desenvolveu-se para este composto um método por cromatografia gasosa (CG) empregando cânfora como padrão interno. As condições cromatográficas para o doseamento de benzocaína e tirotricina por CLAE foram: coluna cromatográfica de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano, tamanho de partícula 5 μm ; fase móvel composta por metanol, tampão fosfato pH 3,31 (75:25 v/v), fluxo de 1 ml/min; volume de injeção de 20 μl e detecção a 270 nm. Nestas condições foram observados três picos referentes à tirotricina, sendo que somente o pico de maior área foi utilizado para obtenção da curva analítica. A seletividade, precisão e linearidade foram avaliadas pelos autores.

Em 1997, Adams *et. al.* desenvolveram um método por CLAE para o doseamento de gramicidina, polimixina B e neomicina presentes em formas farmacêuticas líquidas. Este método utilizou como fase estacionária uma coluna de poliestirenodivinilbenzeno. As condições cromatográficas para determinação de polimixina B, neomicina e gramicidina estão mostradas na Tabela 5. A seletividade,

repetibilidade, linearidade e robustez foram avaliadas e os autores concluíram que tais parâmetros foram adequados.

Tabela 5. Condições cromatográficas para determinação de polimixina B, neomicina e gramicidina.

Condições cromatográficas	Polimixina B	Gramicidina	Neomicina
Volume de injeção (µL)	100	100	20
Fase móvel	7 g de sulfato de sódio, 50 ml de ácido fosfórico 1 M, 160 ml de acetonitrila, água para 1000 ml	180 ml de Tetra-hidrofurano, água para 1000 ml.	70 g de sulfato de sódio, 1,4 g de octanossulfonato de sódio, 50 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 3,0, água para 1000 ml
Fluxo (ml min ⁻¹)	1,0	1,0	1,0
Temperatura da coluna (°C)	60	65	35
Detecção	UV a 215 nm	UV a 215 nm	Detecção por pulso eletroquímico

FONTE: ADAMS *et al*, 1997

3.8 Validação de métodos analíticos

A demonstração da habilidade de um método analítico para quantificar é de grande importância para assegurar a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Consequentemente, antes de um método analítico ser implementado na rotina, deve primeiro ser validado para demonstrar que é adequado para seu propósito (ROZET *et al*, 2007).

O estudo de validação consiste na determinação de parâmetros de desempenho do método, tais como especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

Existem legislações e guias sobre a validação de métodos analíticos. No Brasil, a resolução RE nº899 de 2003 é um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Além dessa, existem guias do Food and Drug Administration (FDA), da International conference on harmonisation (ICH), do Instituto Nacional de metrologia (INMETRO), da Association of official analytical chemists (AOAC) e outros.

O processo de validação deve ser aplicado a métodos novos ou àqueles descritos em compêndios oficiais que tenham sido utilizados fora dos escopos para os quais

foram concebidos, ou ainda, em casos de alterações das condições já validadas. Os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, adequadamente calibrados e validados. Da mesma forma, o operador que realiza os estudos deve ter conhecimento suficiente sobre o trabalho e ser capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo (INSTITUTO..., 2003).

Segundo a Resolução RE nº899 de maio de 2003, os testes são classificados em quatro categorias conforme seu objetivo (Tabela 6) e os parâmetros a serem avaliados (Tabela 7) durante o processo de validação dependem de sua classificação (AGÊNCIA..., 2003).

Tabela 6. Classificação dos testes segundo sua finalidade.

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

Fonte: AGÊNCIA..., 2003.

Tabela 7. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	(i)	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	(i)	Não
Intervalo	Sim	Sim	(i)	(i)	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	(ii)	(ii)	Não	(ii)	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	(i)	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	(i)	Não
Exatidão	Sim	Sim	(i)	(i)	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: AGÊNCIA..., 2003.

(i) pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

(ii) se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

A Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (AGÊNCIA..., 2003). A legislação brasileira não distingue o conceito de especificidade e seletividade. Rozet (2007) discute em seu trabalho a diferença existente entre esses dois parâmetros, exemplificando que uma reação específica ou teste é aquele que ocorre somente com a substância de interesse, enquanto uma reação ou teste seletivo é aquele que ocorre com outras substâncias, mas exibe um grau de preferência pela substância de interesse.

Para o INMETRO (INSTITUTO..., 2003), um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

Como poucos métodos respondem somente a um analito, o termo seletividade ao invés de especificidade deve ser utilizado para a maioria dos casos de metodologias analíticas (ROZET *et al*, 2007).

Para análise quantitativa, a seletividade pode ser determinada realizando o procedimento com amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas. Além dessas, devem ser incluídas amostras armazenadas sob condições de estresse (por exemplo, luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação). Para comparação dos resultados obtidos com amostras sem alteração e amostras contaminadas, submetidas às condições de estresse ou placebos podem ser aplicados os testes F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e, em seguida, o teste t (*Student*) de comparação de médias (INSTITUTO..., 2003).

B Linearidade e curva analítica

Segundo a resolução RE nº899 (AGÊNCIA..., 2003) em sua primeira parte referente à validação de métodos analíticos, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Contudo,

na parte referente aos métodos bioanalíticos o conceito de curva analítica é inserido como sendo a representação da relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito.

Para Rozet (2007) a linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida e a quantidade calculada a partir da curva analítica, enquanto a curva analítica (ou função resposta) é a relação entre a resposta instrumental e a concentração. Nesta linha de raciocínio, o guia do FDA (U.S. FOOD..., 2001) não emprega mais o termo linearidade, mas sim curva analítica. A linearidade é requerida para a avaliação da tendência (HUBERT *et al*, 2007a).

No mínimo seis diferentes concentrações do analito devem ser utilizadas para obtenção da curva analítica no caso de métodos bioanalíticos. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para as curvas obtidas devem ser calculados o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta. Como critério de avaliação, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (AGÊNCIA..., 2003).

Quando o método dos mínimos quadrados ordinário é utilizado alguns requisitos devem ser cumpridos: as variâncias das respostas nos diferentes níveis de concentração devem ser homogêneas e os resíduos independentes. A normalidade dos resíduos deve ser comprovada para que a análise de variância seja utilizada na análise de regressão. Desta forma, testes estatísticos são empregados para comprovar tais premissas. Além disso, o teste de desvio de linearidade também é realizado com o objetivo de verificar se o modelo linear é adequado. Assim, não somente o coeficiente de correlação (r) é empregado na avaliação da curva analítica (MONTGOMERY *et al*, 2001; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

Outro parâmetro associado à relação entre resposta e concentração é o coeficiente de determinação, r^2 , que expressa a proporção da variância total das respostas explicada pelo modelo proposto. Este coeficiente é frequentemente interpretado como uma avaliação da qualidade do ajuste do modelo. No entanto, a imposição de um valor de r^2 maior que 0,99 não é garantia de qualidade dos resultados a serem obtidos pelo procedimento analítico (HUBERT *et al*, 2007b).

C Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Deve ser determinada utilizando, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração. É preconizado que seja determinada a exatidão intra e inter-dias e a variação máxima permitida é de $\pm 15\%$ do valor de referência, exceto para o limite quantificação, cuja variação é de $\pm 20\%$. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (AGÊNCIA..., 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração}_{\text{experimental}}}{\text{concentração}_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (\text{equação 4}).$$

A proximidade dos resultados encontrados ao valor aceito como verdadeiro é resultante da soma de erros sistemáticos e randômicos ou aleatórios, isto é, do erro total associado ao resultado. Portanto, a exatidão é estudada como duas componentes: veracidade - *trueness (bias)* e precisão (desvio padrão) (HUBERT *et al*, 2007a; ROZET *et al*, 2007).

O erro de um procedimento analítico avalia sua habilidade de produzir resultados exatos. Assim, a estimativa de erro total do procedimento é fundamental para se avaliar a validade do método (HUBERT *et al*, 2007b).

A veracidade está relacionada com os erros sistemáticos do procedimento analítico. É a proximidade entre o valor médio obtido por uma ampla série de determinações (\bar{x}_i) e um valor aceito como referência (μ_T). É usualmente expresso como *bias* (viés). A veracidade tem sido referenciada como exatidão, mas este uso não é recomendado (HUBERT *et al*, 2007b; ROZET *et al*, 2007).

O *bias* a cada nível de concentração é obtido pelo cálculo da diferença entre a média da concentração calculada (\bar{x}_i) e a introduzida (μ_T). Pode ser expresso como *bias* absoluto, relativo ou recuperação (HUBERT *et al*, 2007a; ROZET *et al*, 2007).

$$\mathbf{bias} = \bar{x}_i - \mu_T \quad (\text{equação 5})$$

$$\mathbf{bias\ relativo\ (\%)} = 100 * \left(\frac{\bar{x}_i - \mu_T}{\mu_T} \right) \quad (\text{equação 6})$$

$$\mathbf{recuperação\ (\%)} = 100 * \frac{\bar{x}_i}{\mu_T} = 100 - \mathbf{bias\ relativo\ (\%)} \quad (\text{equação 7})$$

A linearidade permite avaliar a veracidade, isto é, ao se plotar o valor esperado versus o observado, espera-se obter uma reta cujo intercepto seja igual a zero e a inclinação igual a um (CAULCUTT e BODDY, 1983; JARDY e VIAL, 1999). No entanto, a relação linear entre a concentração calculada e a introduzida não garante a ausência de *bias* em um procedimento analítico (HUBERT *et al*, 2007a).

✓ *Erros em um procedimento analítico*

Caulcutt e Boddy (1983) classificaram em três tipos os erros que podem afetar determinações repetidas realizadas em um laboratório (Figura 4):

- erros aleatórios ou randômicos que são irregulares, não preditos e resultam em variabilidade nas medidas repetidas;
- erros sistemáticos que, se presente, afetam a seqüência de determinações igualmente. Isto é, se as determinações são feitas em lotes, como ocorre frequentemente, então o erro sistemático deverá resultar em um aumento ou redução de uma quantidade fixa em todas as determinações do lote. Neste caso, o erro é dito sistemático fixo para distinguir do erro sistemático relativo, no qual todas as determinações de um lote serão aumentadas ou reduzidas por uma mesma porcentagem. Erros sistemáticos fixos não levam à variação dentro de cada lote, mas sim, entre os lotes (Figura 5);
- erros grosseiros que são raros de ocorrer.

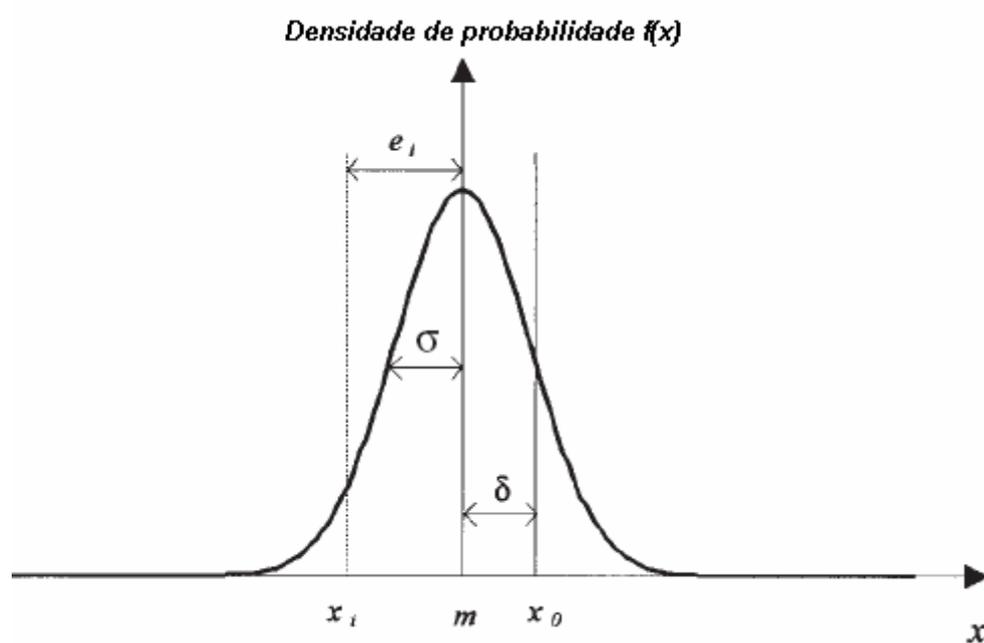


Figura 4. Características da distribuição dos resultados de uma medida: x_0 , valor verdadeiro; m , valor mais provável (esperado); x_i , valor observado a i medida; e_i , erro aleatório; δ , erro sistemático (bias), σ , desvio.

Fonte: JARDY e VIAL, 1999.

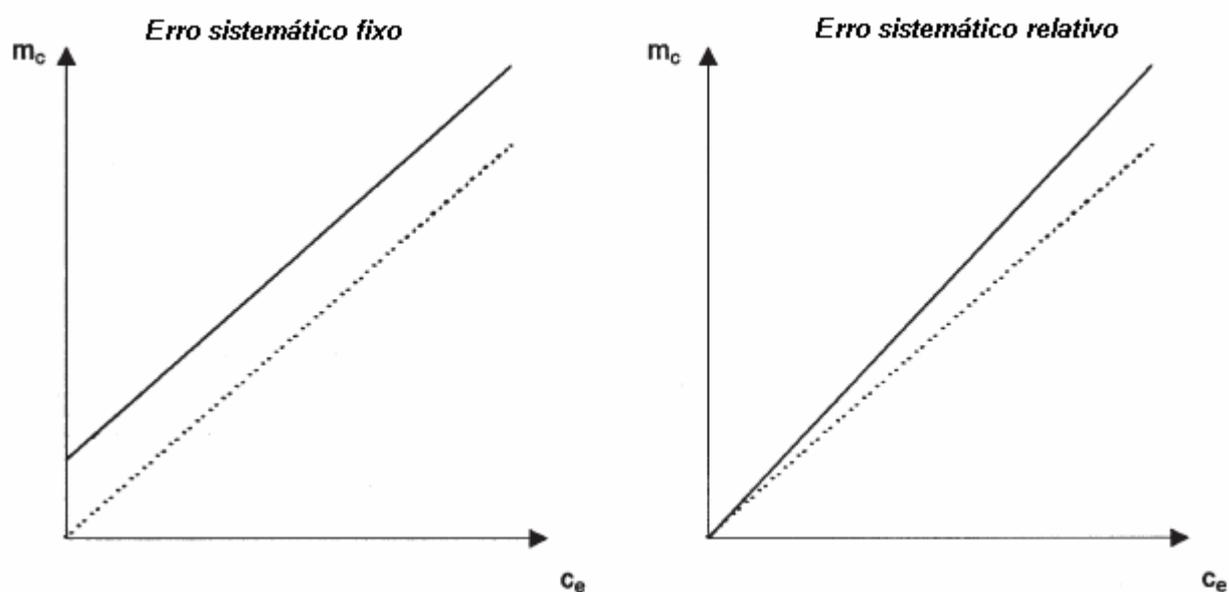


Figura 5. Erros sistemáticos fixo e relativo: m_c , concentração determinada; c_e , concentração esperada.

Fonte: JARDY e VIAL, 1999.

D Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra em condições definidas. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão (dp) ou desvio padrão relativo (DPR) – INSTITUTO..., 2003.

$$\text{DPR} = \frac{\text{dp}}{\bar{c}} \times 100; \quad (\text{equação 8})$$

no qual, dp é o desvio padrão e \bar{c} é a concentração média determinada.

A precisão estima o erro aleatório associado ao procedimento analítico, isto é a dispersão dos resultados em torno do valor médio. A estimativa da precisão independe do valor verdadeiro (ROZET *et al*, 2007). Esta deve ser considerada em três níveis:

- repetibilidade (precisão intra-corrída) - concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. É verificada utilizando-se, no mínimo, três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração;
- precisão intermediária (precisão inter-corrídas) - concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) - concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

Como critério de avaliação, o desvio padrão relativo (DPR) não deve assumir valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (AGÊNCIA..., 2003).

✓ *Comparação da precisão de dois métodos*

Quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) tem diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste *F* bilateral. Este se baseia

no cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos ($F_{\text{calc}} = s_A^2 / s_B^2$), colocando-se a maior no numerador, de modo que a razão seja maior ou igual a um. Em seguida, compara-se este valor obtido com o valor tabelado de F. Se $F_{\text{calculado}}$ for menor ou igual ao F_{tabelado} , os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões (INSTITUTO..., 2003).

✓ *Intervalo de tolerância*

Contudo a questão da validação não é a validade do resultado obtido pela média do erro total calculado, mas a garantia de que o resultado produzido pelo mesmo procedimento analítico no futuro será confiável. Este é o papel de β -intervalo de tolerância, que é o intervalo que contém $\beta\%$ dos resultados individuais futuros. Dois termos são contidos no intervalo de tolerância, sendo que um deles é a veracidade e o outro é o coeficiente de variação da precisão intermediária. Por esta razão, o intervalo de tolerância deve ser assim considerado como uma expressão da exatidão dos resultados. Então o método pode ser considerado exato, a β nível de confiança, para a concentração no nível em questão, se o intervalo de tolerância está incluído nos limites pré-definidos (HUBERT *et al*, 2007b).

E Limite de quantificação

Segundo a legislação brasileira, é o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Deve ser determinado por meio da análise de soluções de concentrações decrescentes do fármaco.

No guia do INMETRO (INSTITUTO..., 2003), o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (*trueness*). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se as exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias.

No guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA (U.S. FOOD..., 2001), encontra-se a distinção entre o limite de quantificação inferior e superior, que é respectivamente, a menor e maior quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com adequada precisão e exatidão.

F Limite de detecção

É a menor concentração do fármaco que pode ser detectada empregando o método analítico desenvolvido. A resposta produzida por tal concentração é diferente estatisticamente da resposta do branco (solução que não contém o fármaco). Pode ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável.

G Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (AGÊNCIA..., 2003).

Materials



4 MATERIAIS

4.1 Microrganismos padrão

Enterococcus hirae ATCC 10541; *Kocuria rhizophila* ATCC 9341; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4.2 Amostra e padrão

gramicidina matéria-prima (Fabricante: Alpharma; lote: 810108; potência: 1043 µg/mg validade: 06/2009 - doação Laboratório Kinder Ltda); gramicidina padrão de referência (Fabricante: Sigma-Aldrich; lote:058K1473; potência: 960 µg/mg; validade: 05/2010).

4.3 Reagentes

fosfato de potássio dibásico (Synth); fosfato de potássio monobásico (Synth); cloreto de sódio (Synth); acetona (Synth); polissorbato 80 (Synth); álcool etílico (Merck); formaldeído (Synth); dimetilaminobenzaldeído (Synth); metanol (Merck); ácido clorídrico (Merck); ácido acético glacial (Merck).

4.4 Meios de cultura

caldo para antibiótico n° 3 (Merck); caldo infuso cérebro coração (Difco); ágar para antibiótico n° 1 (Difco); ágar nutriente (Prodimol); caldo GCLT (extrato de carne – 3,0 g; extrato de levedura – 5,0 g; triptona – 1,0 g; glicose – 1,0 g e água para 1000 ml); Lactalbumina (Difco); Casamino (Difco); Ágar (Difco).

4.5 Vidrarias e outros materiais

placas de Petri de fundo plano (100 x 20 mm) - Pyrex; cilindros de aço inoxidável (8 x 9 x 10 mm); tubos com rosca (16 x 125 mm) - Pyrex ; alça de cultivo; coluna cromatográfica Lichrospher® 100 Merck C18 capeada, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm.

4.6 Equipamentos

estufa bacteriológica (Forma Scientific); autoclave vertical modelo 415 para esterilização de material (FANEM); autoclave vertical mod. 415 para descontaminar material – FANEM; espectrofotômetro UV-visível (JENWAY 6400); paquímetro digital (Mitutoyo); agitador de tubos (Phoenix); capela de fluxo laminar vertical (Veco); sistema de purificação de água (Millipore); potenciômetro – pH (Analyser 300); balança microanalítica BP210D (Sartorius); balança semi-analítica digital (OHAUS); banho maria (Ika E4 Basic); cromatógrafo a líquido de alta eficiência HEWLETT PACKARD 1200, com forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) ultravioleta-visível.

4.7 Soluções

solução tampão n°1 (tampão fosfato 0,1 mol/l pH7,0 – solubilizar em 1000 mL de água, 13,6 g de fosfato de potássio dibásico e 4,0 g de fosfato de potássio monobásico. Ajustar o pH para a faixa $7,0 \pm 0,2$ com ácido fosfórico 18 N ou hidróxido de potássio 10 N); solução tampão n°2 (tampão n° 1 contendo 0,01% (p/V) de polissorbato 80); solução tampão n°3 (tampão n° 1 contendo 1% (p/V) de polissorbato 80); solução polissorbato 80 1% (Solubilizar em 100 mL de água, 1,0 g de polissorbato 80); solução de cloreto de sódio 0,9%.

Métodos

5 MÉTODOS

5.1 Controle da matéria-prima

Para verificar a pureza da matéria-prima empregada e identificação da gramicidina utilizaram-se a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito na farmacopéia britânica (BRITISH..., 2007).

A Cromatografia em camada delgada

✓ *Preparo das soluções*

Foram preparadas soluções de gramicidina padrão e amostra a 0,83 mg/ml em álcool etílico a 80%.

✓ *Preparo das placas de sílica gel*

Para a cromatografia utilizou-se placa de sílica gel e mistura de metanol, butanol, água, ácido acético glacial e acetato de butila (3:9:15:24:49) como fase móvel. Na placa foram aplicados 1 µL e 10 µL das soluções teste e de referência. Após a eluição, nebulizou-se solução ácida de dimetilaminobenzaldeído a 0,02 g/ml sobre a placa que, em seguida, foi aquecida à temperatura de 90 °C até o aparecimento de manchas violáceas. Os valores de fator de retenção (Rf) foram calculados para solução teste e de referência e comparados entre si.

B Ensaio de composição

✓ *Preparo das soluções*

Para o preparo da solução de referência, pesaram-se 25,00 mg de gramicidina padrão, que foram transferidos para um balão volumétrico de 25 ml e dissolvidos em 10,0 ml de metanol e completou-se o volume com fase móvel de modo a obter uma solução a 1,000 mg/ml. A solução teste foi preparada da mesma forma que a de referência.

✓ **Condições cromatográficas**

Utilizou-se cromatógrafo provido de detector ultravioleta (detector de arranjo de diodos – DAD) a 282 nm, coluna cromatográfica capeada empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano, mantida a 50 °C; fluxo da fase móvel de 1,0 ml/min e volume de injeção de 20 µl. A injeção foi realizada no modo automático. Como fase móvel foi empregada água e metanol (29:71).

5.2 Preparo de material

A Esterilização de material

Todo material, como vidrarias (placas, pipetas graduadas, tubos, cilindros, pinças e outros), diluentes (tampões, polissorbato 80 1%) e meios de cultura, foi esterilizado por calor úmido a 121 °C durante 15 minutos.

B Descarte de material

Após a leitura dos resultados, o material contaminado (placas, pipetas, cilindros, tubos e outros) foi descontaminado por calor úmido a 121 °C durante 25 minutos.

5.3 Desenvolvimento do método de difusão em ágar com meio de cultura para antibióticos nº1

O método de doseamento microbiológico por difusão em ágar para gramicidina foi desenvolvido com base em informações da literatura (FARMACOPÉIA..., 1988; HEWITT, 2007; KAVANAGH, 1963).

A Preparo das soluções de gramicidina

O antibiótico utilizado no preparo das soluções foi dessecado a 60 °C, sob pressão de 0,67 kPa durante 3 horas (FARMACOPÉIA..., 1988).

✓ **Preparo da solução estoque de gramicidina**

Pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de gramicidina que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se em etanol e completou o volume com

o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1000 µg/ml. Esta solução foi estocada por no máximo 30 dias (FARMACOPÉIA..., 1988; THE UNITED..., 2008).

✓ *Preparo das soluções teste*

A partir da solução estoque de gramicidina foram preparadas, por diluição, as soluções de trabalho empregando diferentes diluentes como descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações das soluções de trabalho e diluentes utilizados.

Concentrações das soluções de trabalho (µg/ml)	Diluyente
2,00; 4,00; 8,00 e 16,0	Tampão nº 1
	Tampão nº 2
15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100	Tampão nº 1
	Tampão nº 2
	Tampão nº 3
	Acetona <i>pa</i>
	Acetona a 80% (V/V)
	Acetona a 60% (V/V)
	Álcool etílico 95%

B Seleção do microrganismo teste

Para determinação do microrganismo teste, foram utilizadas cepas padrão de bactérias Gram positivo, verificando a sensibilidade de cada uma delas ao antibiótico, tendo em vista o espectro de ação da gramicidina (ORWA *et al*, 2001; RAUTENBACH *et al*, 2006; TOIT e RAUTENBACH, 2000).

Os microrganismos testados foram: *K. rhizophila* (antigo *Micrococcus luteus*), *S. aureus*, *E. hirae* e *S. epidermidis*.

As cepas foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) e foram mantidas no Laboratório de Controle de Qualidade Biológico, FAFAR, UFMG a -50 °C em caldo infuso cérebro coração (BHI) com 15% de glicerol. Essas cepas foram reativadas pela transferência para ágar inclinado BHI no caso do *E. hirae* ágar inclinado para antibióticos nº1 para demais microrganismos, e incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 24 horas.

A partir de culturas de 24 horas, foi preparada para cada microrganismo uma suspensão estoque com absorvância de $1,0 \pm 0,1$ a 580 nm em solução salina estéril contida em tubo de vidro de 16 mm de diâmetro. Um determinado volume de cada suspensão de microrganismo foi adicionado ao ágar fundido e resfriado a $48 - 50^\circ\text{C}$, para se obter inóculos com concentrações de 0,25 e 0,5% (V/V).

Foram utilizadas placas com dupla camada de meio de cultura, sendo 21,0 ml de ágar para antibióticos nº1 não inoculado (meio base) e 4,0 ml do ágar para antibióticos nº1 inoculado (meio superfície) que foi adicionado sobre o meio base após a sua solidificação.

Para cada microrganismo testado foram preparadas quatro placas. E em cada placa foram colocados quatro cilindros de aço inoxidável, posicionados de acordo com a Figura 6.

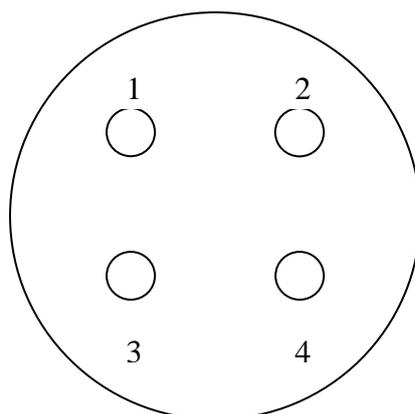


Figura 6. Posicionamento dos cilindros na placa de Petri.

Soluções de gramicidina com concentração de 2,00; 4,00; 8,00 e 16,0 $\mu\text{g/ml}$ diluídas com solução tampão nº1 foram testadas com todas as bactérias. Cada cilindro foi preenchido com 200 μl de cada solução de gramicidina. Desta forma, todas as placas continham todos os tratamentos.

As placas foram incubadas a $36,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$ por 18 horas. O diâmetro dos halos de inibição formados foi medido com paquímetro digital.

C Tentativas de melhorar a difusão do antibiótico

Vários fatores influenciam o diâmetro dos halos de inibição, alguns desses foram modificados com o objetivo de aumentar os halos produzidos pela gramicidina.

O protocolo aplicado foi o mesmo descrito no item *B* de 5.3, porém com as variações especificadas a seguir.

✓ Variação do tempo pré-difusão antes da incubação das placas

Foram preparadas placas (n=4) contendo meios de cultura base e superfície, empregando um inóculo a 0,25% de *K. rhizophila*. Após adição aos cilindros das soluções de gramicidina 4,00; 8,00 e 16,0 µg/ml, preparadas em tampão n°1, as placas permaneceram a temperatura ambiente por 1 hora antes de serem incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

✓ Adequação das concentrações de gramicidina a serem utilizadas na curva analítica

As soluções teste de gramicidina foram preparadas em tampão n°1, a partir da diluição de uma solução estoque a 1000 µg/ml em álcool etílico 95,0%. Foram testadas as faixas de concentração de 4,00 a 16,0 (n= 4 placas) e de 15,0 a 100 µg/ml (n= 6 placas) e tempo de pré-difusão de 1 hora.

✓ Utilização de diferentes diluentes

Soluções de gramicidina a 15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 µg/ml foram preparadas em acetona pa, acetona a 60%, acetona a 80%, álcool etílico a 95% e soluções tampão n°2 e 3 (dados da Tabela 8).

Placas (n=5) contendo meios base e superfície foram preparadas, empregando um inóculo a 0,25% de *K. rhizophila*. Em cada placa foram colocados seis cilindros aos quais foram adicionadas as soluções teste de gramicidina e a solução do diluente sem antibiótico (branco). O branco foi utilizado para verificar se os diluentes testados apresentavam atividade antimicrobiana.

5.4 Desenvolvimento do método de difusão com ágar nutriente

A Preparo das soluções de trabalho

✓ *Preparo das soluções de trabalho de gramicidina*

A partir da solução estoque de gramicidina, como descrito em 5.3, foram preparadas por diluição as soluções de trabalho empregando diferentes diluentes (Tabela 9).

Tabela 9. Concentrações das soluções de trabalho de gramicidina, diluentes e número de placas utilizadas (n).

Concentrações das soluções de trabalho ($\mu\text{g/ml}$)	Diluyente	n
15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100	Tampão nº3	5
5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0	Tampão nº3	6
	Polissorbato 80 1%	5
8,0; 12,0; 18,0; 27,0 e 40,5	Polissorbato 80 1%	4
7,1; 10,7; 16,0; 24,0 e 36,0	Polissorbato 80 1%	4
5,0; 7,5; 11,3; 16,9; 25,3 e 37,9	Polissorbato 80 1%	4

✓ *Preparo das soluções de álcool etílico em tampão nº3 e polissorbato 80 1%*

Soluções contendo álcool etílico, sem gramicidina, foram preparadas em tampão nº3 e polissorbato 80 1% nas mesmas concentrações presentes nas soluções de antibiótico (0,48 a 7,60% V/V).

B Adequação das concentrações de gramicidina, em tampão nº3, a serem utilizadas na curva analítica

Foram preparadas soluções de gramicidina nas faixas de concentração de 15,0 a 100 $\mu\text{g/ml}$ e 5,00 a 80,0 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 9). Essas soluções foram aplicadas em placas com ágar nutriente, 21,0 ml de meio base e 4,0 ml de meio superfície, com inóculo a 0,25% de *K. rhizophila*. Foram colocados cinco cilindros em cada placa, que foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora e incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

C Verificação da influência dos diluentes no diâmetro dos halos de inibição

Foram preparadas placas (n=6) com inóculo a 0,25% de *K. rhizophila* em ágar nutriente, utilizando 21,0 ml de meio base e 4,0 ml de meio superfície. Em cada placa foram adicionados seis cilindros, nos quais se aplicaram o tampão nº3 e as soluções de álcool etílico 0,48 a 7,60% (V/V) neste diluente. Essas placas permaneceram à temperatura ambiente por 1 hora e foram incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

Esse procedimento foi realizado novamente, empregando como soluções teste as soluções de gramicidina na faixa e 5,00 a 80,0 µg/ml preparadas em polissorbato 80 1% (n=5) e as soluções de etanol 0,48 a 7,60% (V/V) também em polissorbato 80 1% (n=6).

D Tentativas de melhorar a difusão do antibiótico em ágar nutriente

✓ Adição de glicerol ao meio de cultura

Durante o preparo do ágar nutriente adicionou-se glicerol, na concentração de 3% (p/V), aos erlenmeyers contendo os meios base e superfície. O meio base (21,0 ml) foi distribuído em placas, sendo que após a sua solidificação acrescentou-se 4,0 ml do meio inoculado com *K. rhizophila* a 0,25%. Foram aplicadas as soluções de gramicidina de 5,00 a 80,0 µg/ml em polissorbato 80 1% nessas placas (n=4), que foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora e incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

✓ Variação do conteúdo de água no ágar nutriente

Preparou-se o ágar nutriente com 25% e 50% a mais do volume de água recomendado pelo fabricante. Estes meios de cultura foram empregados tanto como base quanto superfície. Foram feitas três placas para 25% e quatro para 50%.

✓ Emprego de placas com monocamada e dupla camada

Foram testadas placas (n=4) com dupla camada de meio (21,0 ml de ágar não inoculado e 4,0 ml de meio inoculado) e placas com uma única camada de meio inoculado (10,0 ml).

Nesses ensaios foram utilizadas soluções de gramicidina de 5,00 a 80,0 µg/ml preparadas em polissorbato 80 1%. Após a adição dessas soluções aos cilindros, as placas permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente para, então, serem incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

✓ Emprego de diferentes concentrações de inóculo

Foram preparados inóculos de concentrações 0,25% e 0,1% de *K. rhizophila* testados em placas com dupla camada (n=3). As soluções de gramicidina utilizadas no ensaio foram preparadas em polissorbato 80 1% nas concentrações de 5,00 a 80,0 µg/ml. Após a adição dessas soluções aos cilindros, as placas permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente para, então, serem incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

✓ Adequação das concentrações de gramicidina, em polissorbato 80 1%, a serem utilizadas na curva analítica

As soluções teste de gramicidina foram preparadas em polissorbato 80 1% conforme item A de 5.4. Foram utilizadas placas (n=4) com camadas base e superfície, inóculo de *K. rhizophila* a 0,1% e tempo de pré-difusão de 1h.

5.5 Validação do método de difusão com ágar nutriente

A validação foi realizada com o objetivo de estabelecer para o método desenvolvido os parâmetros: curva analítica, precisão, exatidão (veracidade), limites de quantificação e de detecção, seletividade e robustez.

Para avaliação dos parâmetros foram utilizados os critérios presentes na legislação brasileira e em outros guias nacionais e internacionais de validação (AGÊNCIA..., 2003; HUBERT *et al* 2007a, b; INSTITUTO..., 2001; INTERNATIONAL..., 1996; U.S. FOOD..., 2001).

Foram propostos dois delineamentos para o doseamento de gramicidina, retas paralelas 3x3 e 5x1, validados segundo os parâmetros exigidos.

Em todos os ensaios foram empregadas placas contendo 21,0 ml de ágar nutriente (camada base) e 4,0 ml de meio inoculado (camada superfície) com inóculo a 0,1% de *K. rhizophila*. Após a adição das soluções de antibiótico, as placas permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente e foram incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

A Curva analítica

Foram preparadas, em polissorbato 80 1%, soluções padrão de gramicidina a 5,00; 7,50; 11,3; 16,9; 25,3 µg/ml a partir da diluição da solução estoque preparada conforme descrito em A de 5.3.

Foram preparadas placas em triplicadas para as concentrações de 5,00; 7,50; 16,9 e 25,3 µg/ml de gramicidina, respectivamente, P₁, P₂, P₄ e P₅. A concentração de 11,3 µg/ml foi utilizada como padrão de referência (P₃) em três dos seis cilindros de cada placa (Figura 7).

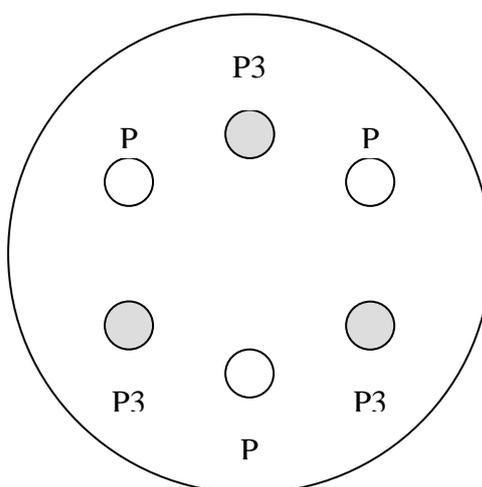


Figura 7. Posicionamento dos cilindros na placa de Petri. (P₃) solução padrão de gramicidina 11,3 µg/ml; (P) solução padrão de gramicidina 5,00; 7,50; 16,9 ou 25,3 µg/ml.

Foram feitos dois experimentos com as concentrações especificadas, obtendo-se no mesmo dia duas curvas analíticas, cujos parâmetros de avaliação foram calculados

e comparados. Para avaliação e comparação de parâmetros inter-dias foram realizados quatro experimentos em quatro dias diferentes.

Em ensaio de difusão em ágar com delineamento 5x1 (blocos incompletos) recomenda-se utilizar um fator de correção para minimizar diferenças entre placas. Foi utilizado um fator de correção empregando a solução de referência P₃.

A curva analítica foi traçada utilizando a média corrigida dos diâmetros dos halos de inibição (como descrito no APÊNDICE A) e o logaritmo das concentrações de gramicidina.

A correção dos halos de inibição foi feita utilizando as equações 14 a 18 do ANEXO A.

Para cada curva analítica, foi obtida a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e realizada a análise da adequação do modelo proposto. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação linear (r) que, segundo a resolução brasileira (AGÊNCIA..., 2003) deve ser igual ou superior a 0,98 para considerar a curva analítica adequada.

B Precisão e exatidão

Foram empregados dois diferentes delineamentos de ensaio: retas paralelas 3x3 e 5x1. A precisão e exatidão foram determinadas para ambos os delineamentos.

B.1 Delineamento 3x3

✓ Repetibilidade e exatidão intra-dia

Três níveis de concentração baixo, médio e alto foram utilizados para avaliar a repetibilidade e exatidão dos resultados. Empregou-se padrão de gramicidina no preparo das soluções a serem dosadas, o que aumenta a confiabilidade da potência dessas soluções.

Soluções de gramicidina padrão foram preparadas em polissorbato 80 1% nas concentrações: 2,50; 5,00 e 10,00 µg/ml para a avaliação do nível a 50% do valor real; 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml para o nível a 100% e 7,50; 15,0 e 30,0 µg/ml para

150%. Também foram preparadas soluções padrão a 5,00; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$ empregadas para traçar a curva do padrão, com a qual serão comparadas as demais retas obtidas nos diferentes níveis (50, 100 e 150%). Para cada uma das três faixas de concentração foram preparadas três séries de soluções, realizando desta forma, três doseamentos a cada nível.

Para cada doseamento foram empregadas oito placas, sendo que em cada placa foram adicionadas as três soluções da série padrão e as três da série teste, caracterizando um bloco completo (Figura 8).

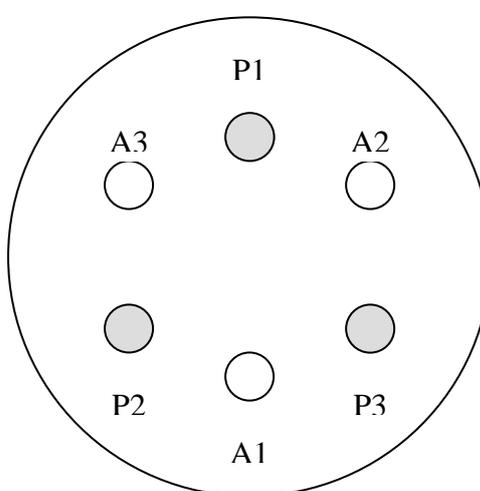


Figura 8. Posicionamento dos cilindros na placa de Petri. (P_1 , P_2 e P_3) soluções padrão de gramicidina 5,00; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$; (A_1 , A_2 e A_3) soluções teste de gramicidina.

Os resultados obtidos foram utilizados para avaliação tanto da exatidão quanto da precisão intra-dia do método. A potência média de gramicidina em cada nível (50, 100 e 150%) e o desvio padrão relativo (DPR) foram calculados ($n=3$). O valor de DPR para o doseamento de antibiótico em cada nível deve ser no máximo 15% e o valor médio da potência deve estar entre 85 e 115% (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ **Precisão intermediária e exatidão inter-dias**

O procedimento descrito no item anterior, *Repetibilidade e exatidão intra-dia*, foi realizado em dois dias diferentes para avaliação da precisão intermediária e exatidão inter-dias. A potência média de gramicidina em cada nível (50, 100 e 150%) e o DPR foram calculados ($n=6$).

B.2 Delineamento 5x1

✓ *Repetibilidade e exatidão intra-dia*

Soluções, utilizando padrão de gramicidina, também foram preparadas nas concentrações teóricas de 5,00; 11,3 e 25,3 µg/ml para determinação de potência em níveis baixo, médio e alto, respectivamente. Além disso, foram preparadas soluções a 5,00; 7,50; 11,3; 16,9 e 25,3 µg/ml utilizadas na obtenção da curva analítica.

Para o doseamento em cada nível foram utilizadas três placas, nas quais foram adicionadas a solução teste (5,00; 11,3 ou 25,3 µg/ml) e a padrão de referência (11,3 µg/ml). Em um mesmo dia, foram realizados cinco doseamentos em cada nível, sendo, portanto, preparadas cinco soluções teste de cada concentração. No entanto, uma única curva analítica foi construída.

A potência média de gramicidina em cada concentração (5,00; 11,3 e 25,3 µg/ml) e o DPR foram calculados (n=5). O valor de DPR para o doseamento de antibiótico em cada nível deve ser no máximo 15% e o valor médio da potência deve estar entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ *Precisão intermediária e exatidão inter-dias*

Determinou-se a exatidão inter-dias com dados de dois experimentos em dias diferentes, seguindo o procedimento descrito no item anterior (*Precisão e Exatidão intra-dia* para o delineamento 5x1). A potência média e o DPR para cada nível foram calculados (n=10).

C Seletividade

Para verificar a especificidade do método avaliou-se a atividade antimicrobiana de um produto de degradação da gramicidina obtido após a hidrólise como descrito no próximo item. De acordo com Orwa *et al* (2001), esse produto de degradação seria a secogramidina. Utilizou-se como microrganismo teste a *K. rhizophila*, nas condições empregadas no doseamento do antibiótico.

✓ **Obtenção da secogramicidina**

A secogramicidina foi obtida por hidrólise da gramicidina, empregando o método descrito por Ishii e Witkop (1964).

Foram dissolvidos 100,00 mg de gramicidina (matéria-prima) em 2,5 ml de metanol. Adicionaram-se à solução obtida 2,5 ml de ácido clorídrico anidro a 2,9 N preparado em metanol. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 1 hora e seca, em seguida, em chapa com aquecimento. O resíduo obtido foi solubilizado em 7,5 ml de metanol e seco novamente. O resíduo, então, obtido foi dissolvido em 2,5 ml de ácido acético e deixado em freezer a -15 °C para secagem sob refrigeração. O pó resultante foi empregado nos ensaios subseqüentes como produto de degradação da gramicidina.

✓ **Ensaio de composição**

O método de CLAE foi utilizado para caracterizar o produto de degradação obtido. Assim, o cromatograma deste foi comparado ao da matéria-prima de gramicidina (substância de partida para síntese do hidrolisado).

Para realização do ensaio foi empregada a técnica descrita 5.1, sendo que foram utilizadas soluções do produto de degradação e da matéria-prima.

✓ **Ensaio do produto de degradação da gramicidina**

Para realização do doseamento da secogramicidina, preparou-se uma solução estoque a 1000 µg/ml em álcool etílico a 95%, que foi utilizada no preparo das soluções teste.

Realizou-se o doseamento empregando tanto o delineamento retas paralelas 3x3 quanto o 5x1.

C.1 Delineamento 3x3

A solução estoque de secogramicidina foi diluída em polissorbato 80 1 % para obter as soluções teste a 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml. Soluções padrão de gramicidina também foram preparadas nas mesmas concentrações.

Oito placas foram empregadas no doseamento da secogramidina, nas quais se adicionaram as soluções teste e padrão.

C.2 Delineamento 5x1

Solução de secogramidina a 11,3 µg/ml foi preparada em polissorbato 80 1% a partir da solução estoque. Também se preparou soluções padrão de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml para obtenção da curva analítica. Utilizaram-se três placas para cada solução.

D Limite de detecção

O limite de detecção é a menor concentração do analito que é possível detectar pelo método. Assim, foram preparadas placas com soluções de gramicidina nas concentrações 1,00; 2,00; 3,00 ou 4,00 µg/ml e solução padrão de referência a 11,3 µg/ml. Além disso, placas com cilindros contendo o diluente sem antibiótico e a solução padrão de referência a 11,3 µg/ml também foram preparadas.

A média corrigida dos diâmetros dos halos das soluções teste de gramicidina (equações 14 a 18 do ANEXO A) foi comparada à média corrigida dos diâmetros dos halos do diluente para determinação do limite de detecção.

E Limite de quantificação

✓ Limite inferior de quantificação

Soluções de gramicidina padrão foram preparadas em polissorbato 80 1% nas concentrações 2,00; 3,00 e 4,00 µg/ml para determinação do limite inferior de quantificação, que é a menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão. Também foram preparadas soluções padrão de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml para obtenção da curva analítica e realização do doseamento pelo delineamento 5x1. Para isto, foram preparadas três placas para cada solução.

O procedimento foi realizado em dois dias diferentes, sendo calculados a potência e o intervalo de confiança a 95% (equações 19 a 34 do ANEXO A) para cada solução testada. O valor médio da potência e o desvio padrão relativo para cada

concentração de gramicidina também foram calculados para avaliação da precisão e exatidão dos resultados.

✓ **Limite superior de quantificação**

Soluções de gramicidina padrão foram preparadas em polissorbato 80 1% nas concentrações 28,0; 30,0; 32,0 e 35,0 µg/ml para determinação do limite superior de quantificação (maior concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão). Também se empregou o delineamento 5x1 e o procedimento realizado foi o mesmo do item anterior *Limite inferior de quantificação*.

O doseamento foi realizado em dois dias diferentes, sendo calculados a potência e o intervalo de confiança a 95% para cada solução testada (equações 19 a 34 do ANEXO A). O valor médio da potência e o desvio padrão relativo para cada concentração de gramicidina também foram calculados para avaliação da precisão e exatidão dos resultados.

F Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da variação do pH (6,0 e 8,0) do ágar nutriente e da composição do meio utilizado como camada base.

✓ **Variação do pH do meio de cultura**

O ágar nutriente foi preparado conforme descrito pelo fabricante, porém no lugar de se utilizar o pH 7 este foi ajustado para 6 com ácido clorídrico a 1 mol/l. Esse meio foi utilizado como camadas base (21,0 ml) e superfície (4,0 ml) em placas, nas quais foram adicionadas as soluções padrão de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml em polissorbato 80 1%. Também foi testado o ágar nutriente com o pH ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio a 1 mol/l. Concomitantemente, o ágar nutriente pH 7 foi utilizado como controle para comparação entre as três curvas.

A distribuição das soluções de antibiótico nas placas foi realizada conforme descrito em A deste item.

✓ **Varição do meio de cultura da camada base**

Foram preparadas placas com dupla camada, sendo o ágar nutriente utilizado como camada superfície (4,0 ml) inoculada com *K. rhizophila* 0,1%. Como camada base, foram testados os meios: ágar para antibióticos nº1, A, B e C. Os três últimos meios apresentaram a mesma composição do ágar nutriente (peptona, extrato de carne, cloreto de sódio e ágar) diferenciando apenas quanto a peptona empregada em seu preparo. No caso do ágar nutriente utilizou-se a peptona de gelatina, sendo que em A, B e C foram empregadas a triptona, casamino e lactalbumina, respectivamente.

As soluções de padrão de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml foram adicionadas às placas conforme descrito em A deste item.

Uma curva foi obtida empregando ágar nutriente como meio base e de superfície para comparação com as demais curvas.

5.6 Doseamento de gramicidina matéria-prima empregando o método de difusão em ágar nutriente

A determinação da potência da matéria-prima gramicidina foi realizada empregando os dois delineamentos validados: retas paralelas 3x3 e o 5x1. Foram empregadas as condições experimentais já descritas.

Para o preparo das soluções, tanto a matéria-prima quanto o padrão de gramicidina foram dessecados a 60 °C, sob pressão de 0,67 kPa durante 3 horas (FARMACOPÉIA..., 1988).

A Delineamento 3x3

✓ **Soluções**

- *solução estoque (amostra)*: pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de gramicidina matéria-prima que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se em etanol e completou o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1000 µg/ml.

- *soluções teste (amostra)*: foram transferidos 5,00 ml da solução estoque da amostra para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com polissorbato 80 1%, obtendo solução a 100 µg/ml. Transferiram-se 5,00 ml para balões volumétricos de 100, 50 e 25 ml, cujos volumes foram completados com polissorbato 80 1%, de modo a obter, respectivamente, soluções a 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml.

As soluções estoque e de trabalho do padrão foram preparadas da mesma forma, descrita anteriormente, para as soluções de matéria-prima.

✓ **Preparo das placas**

Nas placas (n=8) contendo o meio de cultura, foram colocados seis cilindros, nos quais se adicionaram as três soluções da série padrão e as três da série teste (Figura 8).

Após o período de incubação, o diâmetro dos halos foi medido com paquímetro digital para o cálculo da potência.

Foram realizados cinco doseamentos da matéria-prima.

B Delineamento 5x1

✓ **Soluções**

- *solução estoque (amostra)*: pesaram-se, exatamente, cerca de 28,25 mg de gramicidina matéria-prima que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se em etanol e completou o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1130 µg/ml.

- *soluções teste*: transferiram-se 5,00 ml da solução estoque da amostra para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com polissorbato 80 1%, obtendo solução a 113 µg/ml. Transferiram-se 5,00 ml para balão volumétrico de 50 ml, cujo volume foi completado com polissorbato 80 1%, de modo a obter solução a 11,3 µg/ml.

- *solução estoque (padrão)*: pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de gramicidina padrão que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml.

Dissolveu-se em etanol e completou o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1000 µg/ml.

- *soluções padrão*: foram transferidos 5,00 ml da solução estoque da amostra para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com polissorbato 80 1%, obtendo solução a 100 µg/ml. Transferiram-se 5,00; 3,75; 2,83; 4,23 e 2,53 ml para balões volumétricos de 100, 50, 25, 25 e 10 ml, respectivamente, cujos volumes foram completados com polissorbato 80 1%, de modo a obter soluções a 5,00; 7,5; 11,3; 16,9 e 25,3 µg/ml.

✓ **Preparo das placas**

Foram preparadas três placas para cada solução (teste e padrão) e em cada placa foram colocados seis cilindros nos quais as soluções foram adicionadas conforme Figura 7 (*item A de 5.5*).

Após o período de incubação, o diâmetro dos halos foi medido com paquímetro digital para o cálculo da potência.

Cinco doseamentos empregando o delineamento 5x1 foram realizados.

5.7 Cálculo de potência pelo método de difusão em ágar

A Delineamento 3x3

Os cálculos de potência, intervalo de confiança a 95% e parâmetros de validade do ensaio (paralelismo, desvio de linearidade e regressão significativa) foram realizados segundo as fórmulas descritas em Hewitt (2007). Foram utilizadas as equações 1 a 13 do ANEXO A.

B Delineamento 5x1

A potência, o intervalo de confiança a 95% e os parâmetros de validade do ensaio (significância da regressão e desvio de linearidade) foram calculados utilizando as fórmulas de Hewitt (2007) correspondentes às equações de 14 a 34 do ANEXO A.

5.8 Método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina segundo compêndios oficiais

A Preparo das soluções de gramicidina

As soluções teste de gramicidina foram feitas a partir da diluição da solução estoque cujo preparo foi descrito em 5.3. As concentrações e diluentes utilizados estão na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações das soluções de teste e diluentes utilizados.

Concentrações das soluções de trabalho ($\mu\text{g/ml}$)	Diluyente
0,028; 0,034; 0,04; 0,048; 0,057	Álcool etílico 95% Tampão nº 2

B Método segundo Farmacopéia Americana (THE UNITED..., 2008)

Realizou-se o método preconizado pela farmacopéia americana para doseamento de gramicidina matéria-prima com o objetivo de compará-lo ao método de difusão em ágar desenvolvido.

✓ Padronização do inóculo

O microrganismo teste preconizado é o *E. hirae*. A farmacopéia americana determina que a concentração do inóculo a ser utilizada deva ser tal que produza uma turvação de no mínimo 0,35 unidade de absorvância a 580 ou 530 nm, após 3 a 5 horas de incubação a 37 °C, em um tubo contendo 9,0 ml de meio inoculado adicionado de 100 μl da solução de gramicidina a 0,04 $\mu\text{g/ml}$. Desta forma, foram testadas várias concentrações de inóculo.

Preparou-se uma suspensão de microrganismo teste em solução salina estéril, com absorvância de $1,0 \pm 0,1$, a partir de uma cultura em ágar BHI inclinado, incubada a $36,5 \pm 1,0$ °C por 16 a 18 horas. A partir desta suspensão, foram preparados vários inóculos conforme a Tabela 11.

Tabela 11. Concentrações de inóculos testadas.

Concentração do inóculo (%)	Volume de suspensão de microrganismo adicionado ao meio de cultura (ml)	Volume de meio de cultura empregado (ml) ⁽¹⁾
0,5	0,5	100,0
0,75	0,75	100,0
0,85	0,85	100,0
1,0	1,0	100,0
1,25	1,25	100,0
1,5	1,5	100,0
2,0	2,0	100,0

⁽¹⁾meio para antibiótico nº3.

Em um tubo contendo 100 µL de gramicidina a 0,04 µg/ml em álcool etílico 95%, adicionou-se 9,0 ml de meio inoculado. Para cada concentração do inóculo, três tubos foram preparados e incubados em banho-maria a 37 °C. Quando a leitura de absorvância estivesse próxima de 0,35, os tubos foram retirados do banho-maria e 0,5 ml de solução de formaldeído 12% foi adicionada para paralisar o crescimento do microrganismo. Em seguida, as leituras de absorvância foram realizadas a 580 nm em espectrofotômetro, com zero ajustado com 9,0 ml de meio de cultura não inoculado adicionado de 100 µL de álcool etílico 95%.

✓ Obtenção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica foram preparadas soluções de gramicidina em álcool etílico 95%, na faixa de 0,028 a 0,057 µg/ml (HEWITT, 1989).

Em tubos com rosca (16 x 125 mm) foram adicionados 100 µL das soluções de gramicidina, sendo que cada concentração foi testada em triplicata. Aos tubos acrescentou-se 9,0 ml de meio de cultura inoculado com *E. hirae* (inóculo 0,75%).

Em outros seis tubos foram adicionados 100 µL da solução de álcool etílico 95%, sendo que em três colocou-se 9,0 ml de meio de cultura inoculado (branco inoculado) e nos outros três, 9,0 ml de meio de cultura sem microrganismo (branco não inoculado).

Todos os tubos foram distribuídos aleatoriamente em uma estante e incubados a 37 °C, sendo que o período de incubação foi determinado verificando o tempo no qual o tubo que continha a solução de gramicidina 0,04 µg/ml e 9,0 ml de meio de cultura inoculado apresentou uma absorvância de no mínimo 0,35 a 580 nm. Após a incubação, os tubos foram transferidos para um banho de gelo, 0,5 ml de solução de formaldeído 12% foi adicionada a eles e a leitura de absorvância a 580 nm foi realizada.

C Método segundo Farmacopéia Britânica (BRITISH..., 2007)

É preconizado pelo método descrito na farmacopéia britânica o emprego de metanol no preparo da solução estoque de gramicidina, tampão n°2 como diluente das soluções de trabalho e *E. hirae* ou *S. aureus* como microrganismos teste.

✓ Obtenção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica foram preparadas soluções de gramicidina em tampão n°2, com concentrações de 0,028 a 0,057 µg/ml.

O método utilizado para realização do ensaio foi idêntico ao descrito no item *B* de 5.8, exceto em relação ao branco não inoculado, no qual se utilizou tampão n°2 no lugar de álcool etílico 95%. Além de realizar o ensaio empregando o *E. hirae* (inóculo de 0,75%) como microrganismo teste, utilizou-se também *S. aureus* (inóculo de 0,75%).

O tempo de incubação não foi definido pela farmacopéia britânica. Desta forma, utilizou-se o mesmo protocolo descrito pela farmacopéia americana.

5.9 Desenvolvimento do método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina

A Preparo das soluções de gramicidina

A Tabela 12 apresenta as concentrações das soluções de gramicidina preparadas em diferentes diluentes a partir da solução estoque, cujo preparo foi descrito em 5.3.

Tabela 12. Concentrações das soluções de teste e diluentes utilizados.

Concentrações das soluções de trabalho ($\mu\text{g/ml}$)	Diluyente
0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28 e 2,56	Tampão n°2 Álcool etílico a 95%
0,08; 0,28; 0,48; 0,68; 0,88 e 1,08	Álcool etílico a 95%

B Emprego do meio de cultura para antibióticos n°3

✓ Adequação das concentrações de gramicidina a serem utilizadas na curva analítica

Foram preparadas duas séries de soluções de gramicidina nas concentrações de 0,01 a 2,56 $\mu\text{g/ml}$, sendo uma preparada em álcool etílico a 95% e a outra em tampão n°2. Estas soluções foram testadas utilizando inóculo de *E. hirae* a 0,75%.

O ensaio foi realizado conforme descrito no item *B* de 5.8, com exceção das alterações citadas acima e do fato de que o crescimento do microrganismo, contido no tubo com solução de gramicidina a 0,32 $\mu\text{g/mL}$ (no lugar da solução a 0,04 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico), foi utilizado como referência para se determinar o fim da incubação.

C Emprego do meio GCLT

✓ Seleção do diluyente

O ensaio descrito em *B* de 5.9 foi realizado novamente, empregando caldo GCLT como meio de cultura. Foram incubados os tubos com as soluções alcoólicas de gramicidina e também três tubos contendo apenas 9,0 ml de caldo inoculado.

Para comparação entre os dois diluentes utilizados (álcool etílico a 95% e tampão n°2), a absorvância foi transformada em porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo teste utilizando a equação 2 do ANEXO B.

✓ Adequação das concentrações de gramicidina a serem utilizadas na curva analítica e determinação do tempo de incubação

Foram preparadas soluções de gramicidina na faixa de concentração de 0,08 a 1,08 µg/ml em álcool etílico a 95%, testadas em caldo GCLT inoculado com *E. hirae* a 0,75% conforme descrito no item B de 5.8. Quatro estantes foram preparadas com os tubos, em triplicata, das soluções teste e dos controles (branco inoculado e não inoculado).

Os tubos foram incubados por tempos definidos de 3h, 3h30, 4h e 4h30. No final do período de incubação, foi adicionado aos tubos 0,5 ml de formaldeído a 12% (V/V) e a absorvância foi lida a 580 nm.

5.10 Validação do método turbidimétrico

A validação foi realizada com o objetivo de avaliar a curva analítica, precisão, exatidão, limites de quantificação e de detecção, seletividade e robustez do método turbidimétrico desenvolvido para doseamento de gramicidina. Os critérios empregados para essa avaliação estão presentes na legislação brasileira e em outros guias nacionais e internacionais de validação (AGÊNCIA..., 2003; HUBERT *et al* 2007a, b; INSTITUTO..., 2001; INTERNATIONAL..., 1996; U.S. FOOD..., 2001). Como para o método por difusão em ágar, dois delineamentos foram propostos para o doseamento de gramicidina pelo método turbidimétrico, retas paralelas 3x3 e 5x1, validados segundo os parâmetros exigidos.

Em todos os experimentos, preparou-se uma solução estoque padrão a 1000 µg/ml de acordo com o procedimento descrito em A do item 5.3. Essa solução foi mantida a 8 °C e utilizada no preparo das soluções empregadas na obtenção da curva analítica. Em relação às soluções de gramicidina cujas potências foram determinadas, diariamente, foi preparada uma solução estoque a 1000 µg/ml com a substância padrão a partir da qual foram feitas diluições para obtenção das soluções de trabalho.

A Curva analítica

Foram preparadas, em álcool etílico a 95%, soluções padrão de gramicidina a 0,08; 0,28; 0,48; 0,68 e 0,88 µg/ml.

Em tubos contendo 100 µl da solução de gramicidina foram adicionados 9,0 ml de caldo inoculado com *E. hirae* (inóculo a 0,75%), sendo preparados três tubos para cada solução. Também foram feitos, em triplicata, tubos correspondentes ao branco inoculado (100 µl de álcool etílico a 95% e 9,0 ml de caldo inoculado) e não inoculado (100 µl de álcool etílico a 95% e 9,0 ml de caldo inoculado). Todos os tubos foram distribuídos aleatoriamente em uma estante e incubados em banho-maria a 37 °C durante 4 horas. Ao fim do período de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo e adicionou-se 0,5 ml de formaldeído a 12% em cada um. Então, realizaram-se as leituras de absorvância a 580 nm em espectrofotômetro, com zero ajustado com o tubo correspondente ao branco não inoculado.

As leituras de absorvância foram transformadas em porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo para construção da curva analítica (equação 2 do ANEXO B).

Para avaliação intra-dia dos parâmetros da curva analítica foram feitos dois experimentos com as concentrações especificadas, obtendo-se no mesmo dia duas curvas analíticas. A avaliação inter-dias foi feita em três dias consecutivos e em cada um deles foi obtida uma curva.

Para cada curva analítica, foi calculada a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e realizada a análise da adequação do modelo proposto. Calculou-se também o coeficiente de correlação linear (r) que deve ser igual ou superior a 0,98 (AGÊNCIA..., 2003). As curvas obtidas no mesmo dia e em dias diferentes foram comparadas estatisticamente por análise de covariância, ANCOVA (SNEDECOR e COCHRAN, 1996).

B Precisão e exatidão

Foram empregados dois diferentes delineamentos de ensaio: retas paralelas 3x3 e 5x1. A exatidão, compreendendo a precisão e a veracidade foi determinada para ambos os delineamentos.

B.1 Delineamento 3x3

✓ Repetibilidade e exatidão intra-dia

Segundo a resolução brasileira (AGÊNCIA..., 2003), tanto a repetibilidade quanto a exatidão dos resultados devem ser avaliados em três níveis de concentração: baixo, médio e alto. Assim, foram preparadas, em álcool etílico a 95%, soluções de gramicidina padrão nas concentrações: 0,22; 0,38 e 0,54 µg/ml para doseamento a 80% do valor rotulado; 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml para o nível de 100% e 0,34; 0,58 e 0,82 µg/ml para 120%. Também foi preparada uma segunda série de soluções nas concentrações de 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml para ser empregada como soluções de referência, com as quais as amostras nos diferentes níveis serão comparadas para determinação da potência. Para cada uma das três faixas de concentração das soluções teste foram preparadas cinco séries de soluções, realizando desta forma, cinco doseamentos a cada nível.

O doseamento foi realizado segundo procedimento descrito em *A Curva analítica* e o cálculo de potência e intervalo de confiança de cada solução foram calculados utilizando as equações de 14 a 25 do ANEXO B.

Os resultados obtidos foram utilizados para avaliação tanto da exatidão quanto da precisão intra-dia do método. A potência média de gramicidina em cada nível (80, 100 e 120%) e o DPR foram calculados (n=5). O valor de DPR para o doseamento de antibiótico em cada nível deve ser no máximo 15% e o valor médio da potência deve estar entre 85 e 115% (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ *Precisão intermediária e exatidão inter-dias*

O procedimento descrito no item anterior, *Repetibilidade e exatidão intra-dia*, foi realizado em dois dias diferentes para avaliação da precisão intermediária e exatidão inter-dias. A potência média de gramicidina em cada nível (80, 100 e 120%) e o DPR foram calculados (n=10).

B.2 Delineamento 5x1

✓ *Repetibilidade e exatidão intra-dia*

A repetibilidade e exatidão intra-dia foram avaliadas em três diferentes níveis: baixo referente à menor concentração da curva analítica (0,08 µg/ml); médio referente à intermediária (0,48 µg/ml) e alto à maior concentração (0,88 µg/ml). Desta forma, soluções nestas concentrações foram preparadas com gramicidina padrão. Em um mesmo dia, foram realizados cinco doseamentos em cada nível, sendo, portanto, preparadas cinco soluções teste de cada concentração. Além disso, foram preparadas também soluções padrão nas concentrações de 0,08; 0,28; 0,48; 0,68 e 0,88 µg/ml para obtenção da curva analítica.

Todas as soluções foram ensaiadas conforme descrito em A deste item e a potência e o intervalo de confiança a 95% foram calculados empregando as equações de 40 a 50 do ANEXO B.

A potência média de gramicidina em cada concentração (0,08; 0,48 e 0,68 µg/ml) e o DPR foram calculados (n=5). O valor de DPR para o doseamento de antibiótico em cada nível deve ser no máximo 15% e o valor médio da potência deve estar entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ *Precisão intermediária e exatidão inter-dias*

O procedimento descrito no item anterior foi realizado em dois dias diferentes para avaliação da precisão e exatidão inter-dias. O valor médio das potências e o desvio padrão relativo referente a cada concentração (0,08; 0,48 e 0,68 µg/ml) foram calculados (n=10).

C Seletividade

Para verificar a seletividade do método avaliou-se a atividade antimicrobiana de um produto de degradação da gramicidina obtido após a hidrólise como descrito em *D* do item 5.5.

✓ *Ensaio do produto de degradação da gramicidina*

Para realização do doseamento da secogramidina, preparou-se uma solução estoque a 1000 µg/ml em álcool etílico a 95%, que foi utilizada no preparo das soluções teste.

Realizou-se o doseamento empregando tanto o delineamento retas paralelas 3x3 quanto o 5x1.

C.1 Delineamento 3x3

A solução estoque de secogramidina foi diluída em álcool etílico a 95% para obter as soluções teste a 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml. Soluções padrão de gramicidina também foram preparadas nas mesmas concentrações.

Para o doseamento da secogramidina, realizou-se o procedimento descrito em *A* deste item, contudo empregando as soluções descritas anteriormente. O procedimento foi realizado em dois dias consecutivos.

C.2 Delineamento 5x1

Solução de secogramidina a 0,48 µg/ml foi preparada em álcool etílico a 95% a partir da solução estoque. Também foram preparadas soluções padrão na faixa de 0,08 a 0,88 µg/ml para obtenção da curva analítica. O procedimento utilizado foi o mesmo de *A* e o doseamento foi realizado em dois dias consecutivos.

D Limite de detecção

O limite de detecção consiste na menor concentração do analito detectada pelo método. Assim, prepararam-se, em álcool etílico a 95%, soluções de gramicidina a

0,01; 0,02; 0,04 e 0,06 µg/ml, que foram adicionadas aos tubos para ensaio turbidimétrico conforme procedimento descrito em A.

As leituras de absorvância correspondentes às diferentes concentrações de gramicidina foram comparadas por ANOVA fator único às leituras dos tubos do branco inoculado (caldo inoculado e diluente) para determinação do limite de detecção.

E Limites de quantificação

✓ Limite inferior de quantificação

A menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão pelo método foi determinada por meio do doseamento das soluções de gramicidina padrão a 0,06 e 0,08 µg/ml. O delineamento empregado foi o 5x1, portanto, para obtenção da curva analítica foram preparadas soluções padrão de gramicidina na faixa de 0,08 a 0,88 µg/ml, que foram ensaiadas concomitantemente com as demais soluções de acordo com o procedimento descrito em A. O procedimento foi realizado em dois dias diferentes para avaliação da precisão e exatidão inter-dias.

A potência e o intervalo de confiança a 95% de cada concentração foram calculados empregando as equações 40 a 50 do ANEXO B.

✓ Limite superior de quantificação

Soluções de gramicidina padrão foram preparadas nas concentrações 0,88; 1,08 e 1,28 µg/ml para determinação do limite superior de quantificação (maior concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão). Essas soluções foram adicionadas aos tubos contendo 9,0 ml de caldo inoculado que foram submetidos ao procedimento descrito em A. Paralelamente, construiu-se a curva analítica, uma vez que o doseamento foi realizado utilizando o delineamento 5x1.

O procedimento foi realizado em dois dias diferentes, sendo calculados a potência e o intervalo de confiança a 95% de acordo com as equações 40 a 50 do ANEXO B. O

valor médio da potência e o DPR para cada concentração de gramicidina também foram calculados.

F Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da variação do pH (6,0 e 8,0) do meio de cultura, do tempo de incubação e da idade da cepa do microrganismo teste.

✓ Variação do pH do meio de cultura

O pH do caldo GCLT (pH 7) foi ajustado para 6 com ácido clorídrico a 1 mol/l e para 8 com hidróxido de sódio a 1 mol/L. Os caldos preparados (pH 6, 7 e 8) foram inoculados com *E. hirae* e testados com soluções de gramicidina de 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% conforme descrito em *A Curva analítica* deste item.

As curvas obtidas para cada meio de cultura foram comparadas entre si por ANCOVA para avaliação da influência do pH na atividade da gramicidina.

✓ Variação do tempo de incubação

Empregando caldo GCLT com pH 7, prepararam-se três séries de tubos conforme descrito em *A Curva analítica*. Contudo, cada série foi incubada a 37 °C por um determinado período: 3h45, 4h e 4h15. Finalizado cada tempo de incubação, realizou-se a leitura de absorvância a 580nm.

A avaliação da interferência do tempo de incubação foi feita por meio da comparação por ANCOVA das três curvas obtidas.

✓ Idade da cepa de microrganismo teste

A cepa liofilizada de *E. hirae* foi reconstituída em salina a 0,85% (p/V) e transferida para ágar BHI inclinado para sua reativação. A cultura foi incubada por 24 horas a $36,5 \pm 1,0$ °C e transferida novamente para tubo contendo caldo BHI (1ª passagem) que também foi incubado nessas condições. O caldo com o microrganismo foi distribuído em tubos de criopreservação contendo glicerol, os quais foram conservados a -50 °C.

No momento da utilização da cepa, um tubo de criopreservação foi retirado do freezer e permaneceu a temperatura ambiente para descongelamento do caldo, que foi, então, transferido para dois tubos com ágar BHI inclinado (2ª passagem), incubados a $36,5 \pm 1,0$ °C por 24 horas. Um dos tubos foi utilizado no preparo do inóculo para o ensaio turbidimétrico, enquanto o outro foi mantido a 8 °C para ser posteriormente empregado na obtenção de duas novas culturas (3ª passagem), das quais uma foi utilizada no preparo do inóculo para um novo ensaio turbidimétrico e a outra mantida a 8 °C. Esse procedimento foi realizado sucessivas vezes até se completar sete passagens, conforme Figura 9.

Uma curva analítica foi obtida, conforme procedimento descrito em *A Curva analítica*, para o microrganismo de cada passagem. Os dois tubos da cultura da 7ª passagem foram utilizados para preparo do inóculo e ensaiados separadamente para obtenção de duas curvas analíticas em um mesmo dia. Essas curvas foram comparadas por ANCOVA.

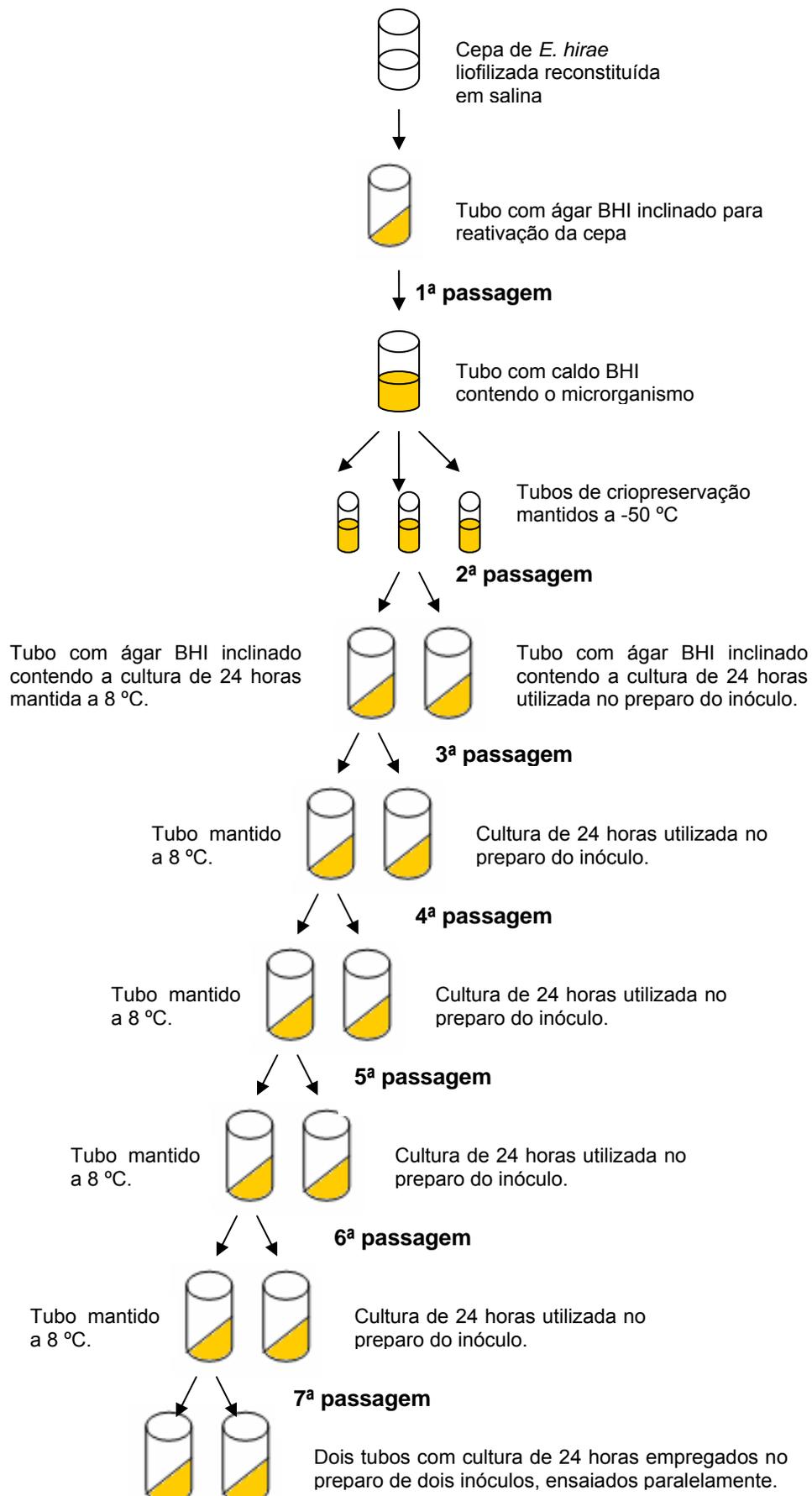


Figura 9. Esquema da obtenção das cepas de *E. hirae* de diferentes idades.

5.11 Doseamento de gramicidina matéria-prima empregando o método turbidimétrico

Determinou-se a potência da matéria-prima gramicidina empregando os dois delineamentos validados: retas paralelas 3x3 e o 5x1. Foram empregadas as condições experimentais descritas em A de 5.10.

Para o preparo das soluções, tanto a matéria-prima quanto o padrão de gramicidina foram dessecados a 60 °C, sob pressão de 0,67 kPa durante 3 horas (FARMACOPÉIA..., 1988).

A Delineamento 3x3

✓ Soluções

- *solução estoque (amostra)*: pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de gramicidina matéria-prima que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se em etanol a 95% e completou o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1000 µg/ml.

- *soluções amostra*: transferiu-se 1,00 ml da solução estoque da amostra para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com álcool etílico a 95%, obtendo solução a 100 µg/ml. Transferiu-se 1,00 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com álcool etílico a 95% (solução a 10,0 µg/ml). Foram adicionados a um balão volumétrico de 25 ml, 5,00 ml da solução a 10,0 µg/ml, de modo a obter-se solução a 2,00 µg/ml. Transferiram-se 1,4; 2,4 e 3,4 ml para balões volumétricos de 10 ml, cujos volumes foram completados com álcool etílico a 95%, de modo a obter, respectivamente, soluções a 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml.

As soluções estoque e de trabalho do padrão foram preparadas da mesma forma, descrita anteriormente, para as soluções de matéria-prima.

✓ Ensaio

Foram adicionados, em triplicata, 100 µl das soluções de gramicidina a tubos de ensaio com tampas de rosca. Em seguida, adicionaram-se 9,0 ml de caldo GCLT inoculado. Também foram preparados três tubos para o branco inoculado e três para

o não inoculado. Os tubos foram incubados por 4 horas e em seguida realizou-se a leitura de absorvância a 580 nm.

A absorvância, tanto dos tubos do padrão quanto da amostra, foi transformada em porcentagem de inibição (equação 2 do ANEXO B) para o cálculo de potência.

B Delineamento 5x1

✓ Soluções

- *solução estoque (amostra)*: pesaram-se, exatamente, cerca de 30 mg de gramicidina matéria-prima que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se em etanol e completou o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1200 µg/ml.

- *soluções amostra*: transferiu-se 1,00 ml da solução estoque da amostra para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com álcool etílico a 95%, obtendo solução a 120 µg/ml. Transferiu-se 1,00 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com álcool etílico a 95% (solução a 12,0 µg/ml). Foram adicionados a um balão volumétrico de 25 ml, 5,00 ml da solução a 12,0 µg/ml, de modo a obter-se solução a 2,4 µg/ml. Transferiram-se 2,00 ml para balão volumétrico de 10 ml, cujo volume foi completado com álcool etílico a 95%, de modo a obter solução a 0,48 µg/ml.

- *solução estoque (padrão)*: pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de gramicidina matéria-prima que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se em etanol e completou o volume com o mesmo solvente, de modo a obter-se solução a 1000 µg/ml.

- *soluções padrão*: transferiu-se 1,00 ml da solução estoque da amostra para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com álcool etílico a 95%, obtendo solução a 100 µg/ml. Transferiu-se 1,00 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com álcool etílico a 95% (solução a 10,0 µg/ml). Foram adicionados a um balão volumétrico de 25 ml, 5,00 ml da solução a 10,0 µg/ml, de modo a obter-se solução a 2,00 µg/ml. Transferiram-se 1,4; 2,4; 3,4 e 4,4 ml para balões volumétricos de 10 ml, cujos volumes foram completados com álcool etílico a

95%, de modo a obter, respectivamente, soluções a 0,28; 0,48; 0,68 e 0,88 µg/ml. Além disso, 1,00 ml da solução (2,00 µg/ml) foi transferido para balão volumétrico de 25 ml para obtenção da solução a 0,08 µg/ml.

✓ Ensaio

As soluções foram adicionadas aos tubos e o ensaio foi executado conforme A de 5.10. Após o período de incubação, foram realizadas as leituras de absorvância, que foram transformadas em porcentagem de inibição do crescimento para cálculo da potência.

5.12 Cálculo de potência

Os cálculos de potência, intervalo de confiança a 95% e avaliação dos parâmetros de validade do ensaio (paralelismo, desvio de linearidade e regressão), para o delineamento 3x3, foram realizados segundo as fórmulas (equações 14 a 25 do ANEXO B) descritas em Hewitt (2007).

No caso do delineamento 5x1 foram utilizadas as equações 40 a 50 do ANEXO B para cálculo de potência e intervalo de confiança a 95%.

5.13 Estudo da interferência de peptonas na atividade de gramicidina contra *E. hirae*

Para verificação da interferência das peptonas na atividade antimicrobiana da gramicidina foram preparados quatro diferentes meios: antibiótico n°3 sem peptona (extrato de carne – 1,5g; extrato de levedura – 1,5; glicose – 1,0 g; cloreto de sódio – 3,5 g; fosfato de potássio monobásico – 3,68 g e fosfato de potássio dibásico – 1,32 g); lactalbumina; triptona e casamino, cuja composição foi a mesma do antibiótico n°3 sem peptona de carne acrescido de 5,0 g de peptona (lactalbumina, triptona e casamino, respectivamente).

Soluções de gramicidina a 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28 e 2,56 µg/ml, em álcool etílico a 95%, foram preparadas e adicionadas (100 µl), em tubos de ensaio contendo 9,0 ml de meio inoculado. Quatro séries de tubos foram

preparadas, sendo uma para cada meio de cultura. Os tubos foram submetidos às condições de ensaio descritas em A de 5.10.

As leituras de absorvância foram transformadas em porcentagem de inibição para construção das curvas concentração-resposta.

5.14 Cálculos estatísticos

Para realização dos cálculos estatísticos foram utilizados os programas MINITAB® Release 14.1 Statistical software, GraphPad Prism® versão 4.00 e Microsoft Office Excel® 2003.

A ANOVA fator duplo foi utilizada para avaliar os resultados obtidos com as diferentes condições testadas no método de difusão em ágar, como a seleção do microrganismo teste, os diferentes inóculos ensaiados, a variação do tempo de pré-difusão, o emprego de tampões, como diluente, com diferentes concentrações de polissorbato 80. A ANOVA fator único foi empregada para determinação do limite de detecção, para os métodos de difusão em ágar e turbidimétrico, através da comparação das respostas (diâmetro do halo de inibição ou absorvância) obtidas com as diferentes concentrações de antimicrobiano. A ANOVA fator único também foi utilizada para verificar se a gramicidina apresentou atividade antimicrobiana nas condições farmacopéicas testadas para o método turbidimétrico. Quando a diferença entre os tratamentos testados por ANOVA fator duplo ou único foi significativa, empregou-se o Teste de Boniferroni para identificar os tratamentos diferentes. Para se aplicar a ANOVA assume-se que as variáveis são normalmente distribuídas e que a variância entre os grupos é homogênea (Burke, 2005). Para isso foram empregados os testes de Ryan Joiner e o de Bartlett para comprovação respectivamente da normalidade e da homoscedasticidade dos dados.

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinais foi utilizada para verificar se as diferentes faixas de concentração empregadas, tanto no método de difusão em ágar quanto no turbidimétrico, produziram um efeito graduado proporcional à concentração do antibiótico. Para utilização do método dos mínimos quadrados ordinais foi necessário comprovar as premissas de homoscedasticidade, independência e normalidade dos resíduos. Assim, a homoscedasticidade foi

verificada pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe e pelo gráfico de valor ajustado pelo modelo *versus* resíduos, cuja distribuição dos pontos deve ser a mais aleatória possível; a normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner e a independência foi verificada por meio do teste de Durbin-Watson. Além disso, a ANOVA foi utilizada para avaliação da significância da regressão e do desvio de linearidade (MONTGOMERY *et al*, 2001; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

No método turbidimétrico, quando se estudou a relação da resposta (absorvância ou porcentagem de inibição) com o logaritmo de uma ampla faixa de concentração empregou-se o modelo sigmoidal. No entanto, quando a relação foi com a concentração do antibiótico o modelo polinomial quadrático foi utilizado. Este também foi empregado para análise dos dados em que diferentes condições foram testadas para o aumento do diâmetro dos halos de inibição nos experimentos com placas.

A comparação entre as curvas obtidas em diferentes condições (dias, meio de cultura com diferentes composições e valores de pH, diferentes concentrações de inóculo, diluentes empregados no preparo das soluções de gramicidina, tempo de incubação e idade da cepa do microrganismo teste) foi realizada por meio da análise de covariância (ANCOVA). No entanto, para emprego deste teste estatístico foi necessário comprovar a homoscedasticidade. Assim, utilizou-se o teste de Bartlett, cuja premissa de normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner (SNEDECOR e COCHRAN, 1996).

O cálculo de potência relativa e intervalo de confiança a 95% foi realizado para o método de difusão em placas empregando as equações do ANEXO A e para o turbidimétrico o ANEXO B. O intervalo de confiança a 95% para a potência foi utilizado para avaliação da precisão do ensaio. Devido à variação na medida do diâmetro do halo de inibição em decorrência de serem pequenos, foi considerada como precisão adequada uma variação máxima de 10% no intervalo de confiança. Tal critério também foi utilizado para o método turbidimétrico.

A precisão dos métodos desenvolvidos foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo. A precisão dos diferentes delineamentos bem como a precisão entre os diferentes métodos foi comparada por meio do teste de F (bilateral).

A veracidade (presença de erros sistemáticos) foi feita por análise de regressão linear entre os resultados de potência obtidos experimentalmente e os valores teóricos.

Para cálculo do β -intervalo de tolerância utilizaram-se as fórmulas descritas nos trabalhos de Hubert, *et al* (2007 a- b), Rozet, *et al* (2007); Boyer e colaboradores (1995).

Valores aberrantes (*outliers*) foram identificados pelo cálculo do resíduo *studentizado* deletado, cujo valor maior que três foi considerado como um *outlier* (MONTGOMERY *et al*, 2001). No caso de ensaios com placas por se tratar de um delineamento blocos ao acaso, quando um *outlier* foi encontrado, o valor foi retirado e não repostado. Para o método turbidimétrico, cujo delineamento é completamente casualizado, os valores aberrantes foram substituídos pela média das réplicas de mesma concentração. Tal procedimento faz com que o grau de liberdade do resíduo da análise de variância seja subtraído de uma unidade para cada valor repostado (THE UNITED..., 2008). Considerou-se que no máximo 2/9 dos dados poderiam ser eliminados (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

Para todos os ensaios estatísticos utilizados, empregou-se um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), exceto no caso do teste de Ryan-Joiner, cujo nível de confiança foi de 90% ($\alpha = 0,1$).

Resultados e discussão

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Controle da matéria-prima utilizada

A Cromatografia em camada delgada

A cromatoplaça apresentou quatro manchas (Figura 10) de valores de fator de retenção (R_f) iguais (0,67) permitindo inferir que se tratam da mesma substância.

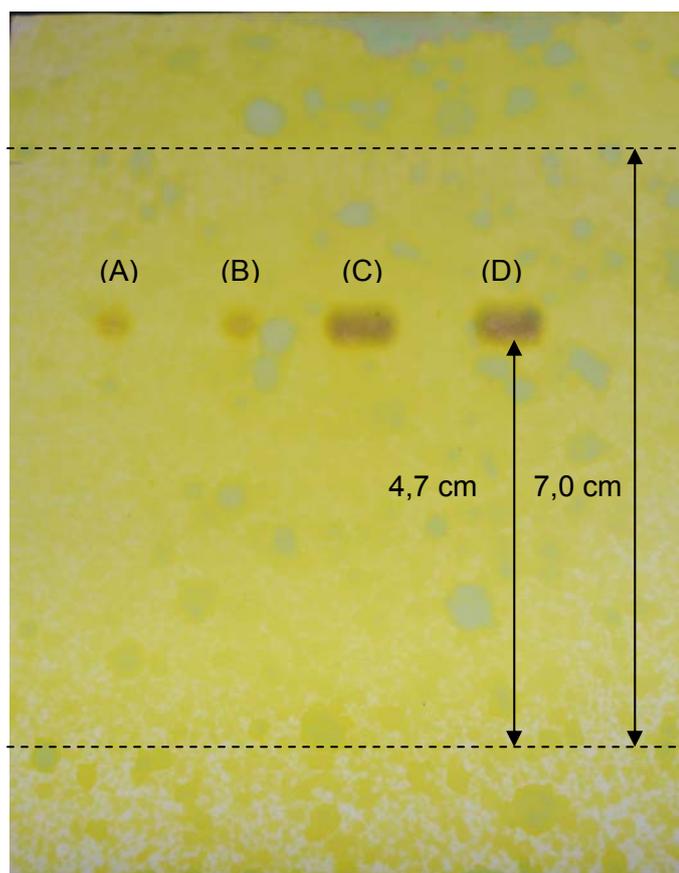


Figura 10. Foto da cromatoplaça obtida pela aplicação de 1, 10 μ L de solução de matéria-prima (A e C) e 1, 10 μ L de solução de referência (B e D).

A farmacopéia britânica (BRITISH..., 2007) preconiza que seja aplicada à placa uma solução de padrão de tirotricina (mistura de gramicidina e tirocidina) juntamente com as demais soluções (amostra e padrão de gramicidina), sendo que o principal grupo de pontos da amostra deve se apresentar de forma similar em posição, cor e tamanho às manchas obtidas com o padrão de gramicidina. Os pontos de alto R_f devem apresentar aspecto semelhante aos obtidos com a solução de padrão de tirotricina. No entanto não foi possível a aquisição do padrão de tirotricina e, portanto, a solução desta não foi aplicada à placa. Tal fato não interferiu no

resultado do ensaio, uma vez que para a solução teste foi observada apenas a mancha correspondente à gramicidina, como pode ser verificada na Figura 10.

B Ensaio de composição

A Figura 11 apresenta os cromatogramas da gramicidina padrão e matéria-prima, nos quais se verifica a semelhança entre os picos obtidos para ambos.

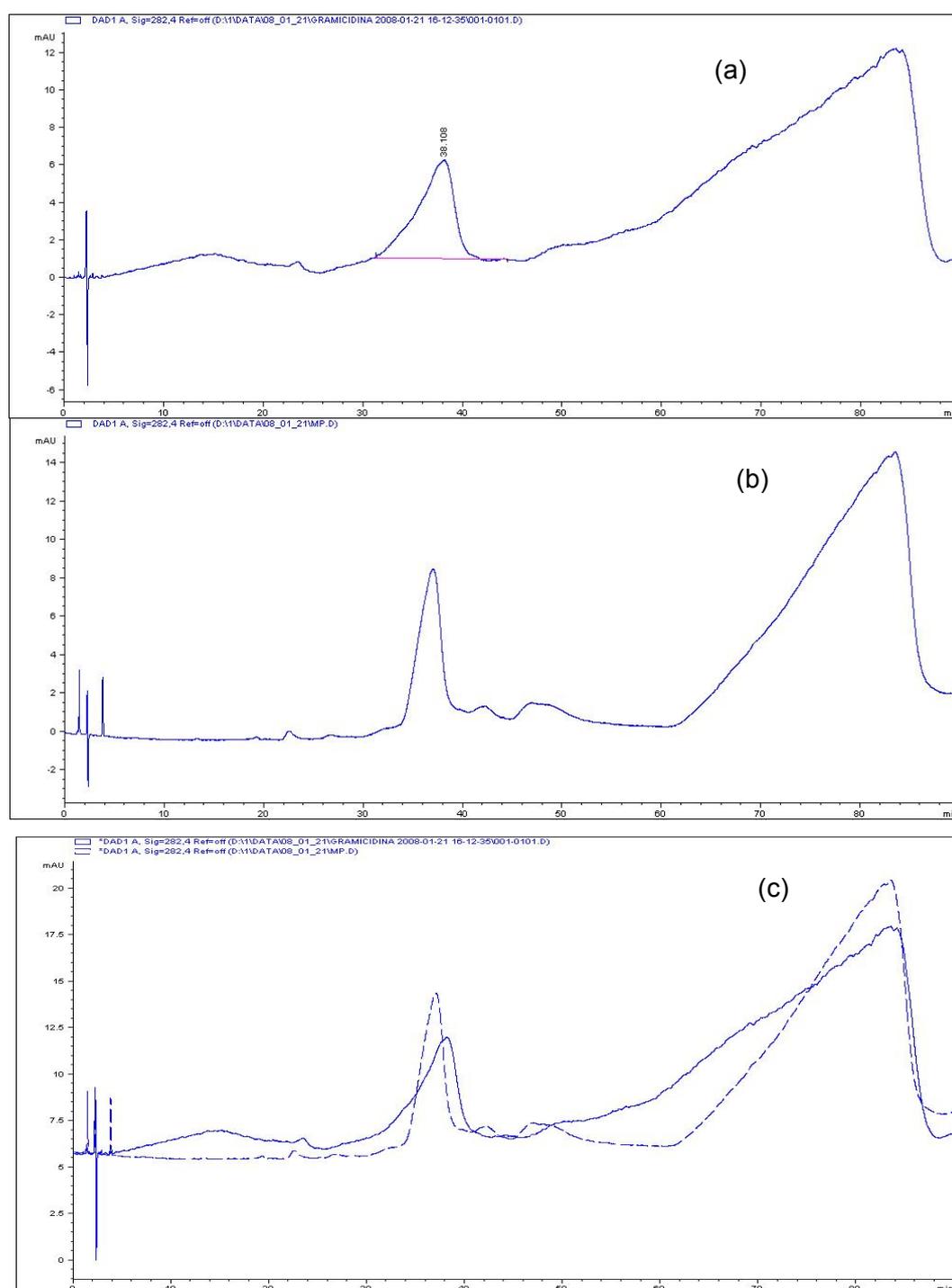


Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE com eluição em água:metanol (29:71) de gramicidina padrão (a) e matéria-prima (b). Em (c) sobreposição dos cromatogramas de gramicidina padrão (—) e matéria-prima (- - -).

6.2 Desenvolvimento do método de difusão em ágar com meio de cultura para antibióticos nº1

A Seleção do microrganismo teste

O microrganismo a ser utilizado em um doseamento de antibiótico deve ser sensível à substância a ser dosada. Para determinar essa sensibilidade, para o método de difusão em ágar, utilizou-se a comparação do diâmetro do halo de inibição obtido em uma dada concentração de gramicidina para os diversos microrganismos teste. Aqueles para os quais a inibição foi maior em relação aos mesmos níveis de concentração (maior diâmetro do halo de inibição) foram definidos como mais sensíveis. Outro aspecto observado foi a nitidez dos halos de inibição (zonas de inibição claras e bem definidas).

Foram empregadas soluções de gramicidina 2,00 a 16,0 µg/ml em tampão nº1. Na concentração de 2,00 µg/ml de gramicidina, utilizando *S. epidermidis* e *E. hirae* com inóculos a 0,25% e 0,5% não se observou formação de halo de inibição. Porém para *K. rhizophila* e *S. aureus*, com ambos os inóculos, foi verificada inibição local nessa concentração.

Nas concentrações de 4,00; 8,00 e 16,0 µg/ml de gramicidina foram observados halos de inibição para todos os microrganismos teste. Verificou-se diferença significativa entre o diâmetro dos halos de inibição obtidos para os inóculos de 0,25% e 0,5% dos diferentes microrganismos. Dentre as espécies testadas, *K. rhizophila* foi a mais sensível em ambos inóculos empregados (Figura 12), uma vez que o diâmetro dos halos obtido nas diferentes concentrações de gramicidina (4,00; 8,00 e 16,0 µg/ml) foi maior quando comparado com as demais espécies. A segunda espécie mais sensível foi *S. aureus* seguida pelo *S. epidermidis* e *E. hirae*.

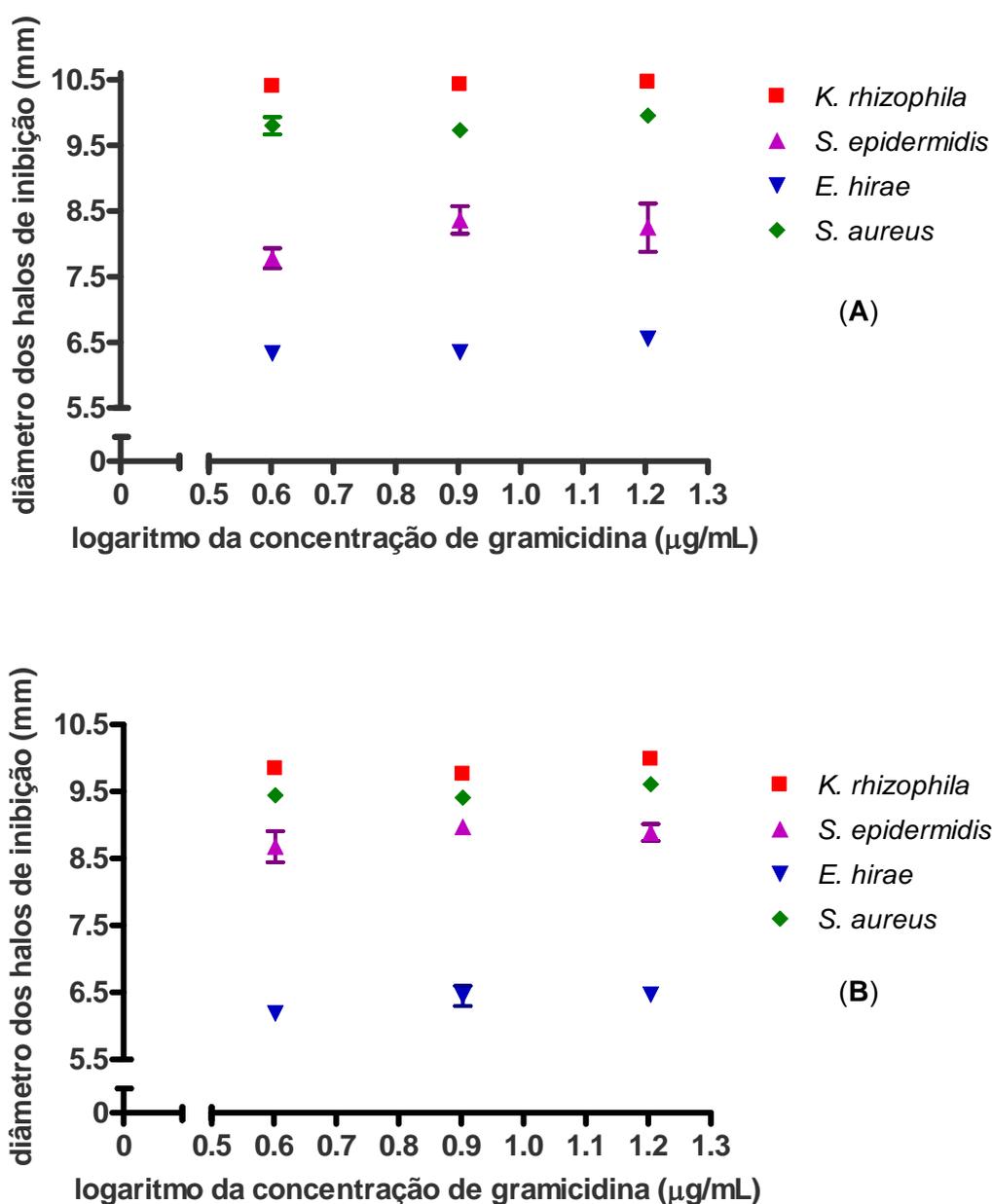


Figura 12. Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. hirae* empregando tampão nº1 como diluente, inóculos a 0,25% (A) e 0,5% (B) e meios base e superfície.

Comparou-se o diâmetro dos halos observados para os diferentes inóculos (0,25% e 0,5%) de *K. rhizophila*, sendo a diferença significativa. Foi verificado que os halos de maior diâmetro foram observados para o inóculo a 0,25%, independente da concentração de gramicidina empregada. Este resultado pode ser explicado pela menor densidade do inóculo de 0,25%. O emprego de um inóculo de menor concentração de células do microrganismo teste produz halos de maior diâmetro (HEWITT, 2007; DAVIS e STOUT, 1971; KAVANAGH, 1963).

Em relação à nitidez, em ambos os inóculos utilizados, halos mais nítidos com bordas mais bem definidas foram observados com *K. rhizophila*. No entanto, foi verificada a formação de halos duplos em todas as placas, independente das condições testadas (espécie de microrganismo, concentrações de inóculo e de antibiótico). Os halos duplos consistiram na formação de dois halos, um circunscrito ao outro. O halo interno, mais próximo ao reservatório (cilindro), apresentou uma área clara com ausência de crescimento microbiano. No entanto, no halo externo observou-se um crescimento escasso do microrganismo em relação ao restante da placa. Uma possível explicação estaria relacionada ao baixo coeficiente de difusão da gramicidina no ágar, o que resultaria numa difusão lenta. Assim, a concentração de gramicidina que alcança a região do halo externo não seria suficiente para eliminar toda a população microbiana daquele local. Podendo também contribuir para isso as baixas concentrações testadas do antibiótico.

B Tentativas de melhorar a difusão do antibiótico

✓ Variação do tempo pré-difusão antes da incubação das placas

No doseamento por difusão em ágar, a atividade do antibiótico é determinada em função da extensão da difusão da substância antes que se inicie o crescimento do microrganismo (GAVIN, 1957a). Assim, na tentativa de se eliminar os halos duplos, placas contendo meios base e de superfície com inóculo a 0,25% de *K. rhizophila* permaneceram por 1 hora a temperatura ambiente antes de serem incubadas a $36,5 \pm 1,0$ °C por 18 horas.

Halos duplos ainda foram observados nessas placas, porém menos perceptíveis que os anteriormente relatados, para as concentrações de 4,00; 8,00 e 16,0 µg/ml preparadas em tampão nº1. Também foi verificado que o período de pré-difusão não promoveu alteração significativa no diâmetro dos halos de inibição quando comparado com os halos formados na ausência deste período. Apesar disso, a pré-difusão por 1 hora foi mantida por melhorar o aspecto observado de halo duplo. Como este efeito não foi eliminado, aumentou-se a concentração das soluções testadas.

✓ **Adequação das concentrações de gramicidina a serem utilizadas na curva analítica**

No caso do doseamento de antibiótico pelo método por difusão em ágar, o diâmetro do halo de inibição pode variar em função das características de difusibilidade da substância e de sua concentração. Em geral, pode ser observada uma relação linear entre o diâmetro do halo de inibição e o logaritmo da concentração da substância. Os diferentes níveis de concentração do antibiótico são trabalhados com uma relação constante entre eles. Desta forma, com o logaritmo das concentrações tem-se uma progressão aritmética que facilita o cálculo da estimativa da potência e a avaliação estatística dos resultados (HEWITT, 2007).

Para o intervalo de concentração de 4,00 a 16,0 µg/ml, em tampão nº1, empregando inóculo de concentração 0,25% do microrganismo teste *K. rhizophila*, a regressão não foi significativa. Tendo em vista esses resultados, ampliou-se a faixa de concentração do antibiótico para 15,0 a 100 µg/ml. Foram testadas as concentrações 15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 µg/ml. No intervalo investigado, a regressão também não foi significativa. Assim, não se observou uma variação no diâmetro dos halos de inibição com o aumento da concentração de gramicidina.

A baixa solubilidade da gramicidina em meio aquoso (0,6 mg/100 ml - THE MERCK..., 2006) e o baixo coeficiente de difusão deste antibiótico poderiam influenciar o resultado encontrado. Nas concentrações testadas, a gramicidina poderia não estar completamente solubilizada, alcançando um nível máximo de solubilização em todas as soluções, o que levaria a não variação no diâmetro dos halos de inibição.

Na tentativa de verificar a veracidade dessa hipótese, outros diluentes (álcool etílico a 95,0%, acetona pa, acetona a 80% e acetona a 60%) foram utilizados.

✓ **Utilização de diferentes diluentes**

A gramicidina possui baixa solubilidade em água, mas é solúvel em diferentes solventes orgânicos, como álcool etílico e acetona (RAGHU e GROSS, 2004; THE MERCK..., 2006). Considerando este fato, acetona e álcool etílico foram utilizados como diluentes no preparo das soluções de gramicidina e testados quanto a sua

atividade antimicrobiana. Estes diluentes apresentaram apenas atividade local, sendo os halos de inibição formados na área delimitada pelo cilindro.

Halos difusos, ou seja, com bordas não definidas, foram observados quando se empregou álcool etílico 95% no preparo das soluções do antibiótico (15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 µg/ml) utilizando inóculo a 0,25 % de *K. rhizophila*. O crescimento do microrganismo foi escasso, dificultando a visualização dos halos.

Halos mais nítidos foram observados quando acetona pa foi utilizada como diluente e testada nas mesmas condições descritas anteriormente. Foi verificada regressão significativa com dados se ajustando ao modelo linear (desvio de linearidade não significativo, homoscedasticidade, normalidade e independência dos resíduos). No entanto, verificou-se visualmente que o volume de líquido no interior do cilindro reduziu durante o período de pré-difusão e de incubação. Constatou-se também dificuldade para pipetar as soluções teste que seriam adicionadas aos cilindros devido à alta volatilidade da acetona. A variação do volume de solução de gramicidina colocado nos cilindros, acarretaria uma diminuição na precisão das medidas do diâmetro dos halos. Desta forma, visando amenizar a volatilização do solvente, foi empregado como diluente uma solução de acetona 80%.

Nas placas contendo as soluções de gramicidina (15,0 a 100 µg/ml) em acetona 80% foi observado um crescimento mais nítido do microrganismo teste (Tabela 13), o que gerou halos mais bem definidos que os originados pelas soluções do antibiótico em acetona pa. A regressão entre a medida do diâmetro dos halos de inibição e o logaritmo da concentração foi significativa e o modelo linear foi adequado. No entanto, novamente foi verificada a redução do volume de líquido no interior do cilindro durante o período de pré-difusão e de incubação. Porém, neste caso, houve menor dificuldade na transferência das soluções para os cilindros. Em vista disso, utilizou-se acetona a 60% para preparo das soluções de antibiótico (15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 µg/ml) na tentativa de minimizar a volatilização do solvente. Porém, este efeito ainda foi observado. A análise dos dados demonstrou ser significativa a regressão entre o diâmetro dos halos e o logaritmo da concentração de gramicidina e que o modelo linear foi adequado.

Tabela 13. Valores médios \pm dp dos halos de inibição (mm) obtidos para *K. rhizophila* empregando inóculo a 0,25% e soluções de gramicidina a 15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 $\mu\text{g/ml}$ preparadas em diferentes diluentes (n=5).

Concentração das soluções de gramicidina ($\mu\text{g/ml}$)	Diluyente		
	Acetona pa	Acetona 80%	Acetona 60%
15	9,20 \pm 0,19	9,39 \pm 0,19	9,33 \pm 0,17
25	9,66 \pm 0,12	9,48 \pm 0,18	9,49 \pm 0,30
50	9,84 \pm 0,08	9,86 \pm 0,28	9,94 \pm 0,31
75	10,06 \pm 0,09	10,11 \pm 0,09	9,95 \pm 0,38
100	10,32 \pm 0,15	10,59 \pm 0,22	10,08 \pm 0,15

As retas obtidas com a utilização dos diferentes diluentes (soluções de acetona), apresentadas na Figura 13, foram comparadas e verificou-se não haver diferença significativa entre elas. Desta forma, o aumento do conteúdo de água nas soluções diluídas de acetona parece não interferir de forma significativa no diâmetro do halo de inibição. Porém, devido à dificuldade técnica relatada anteriormente para as soluções de acetona, testaram-se outros diluentes aquosos.

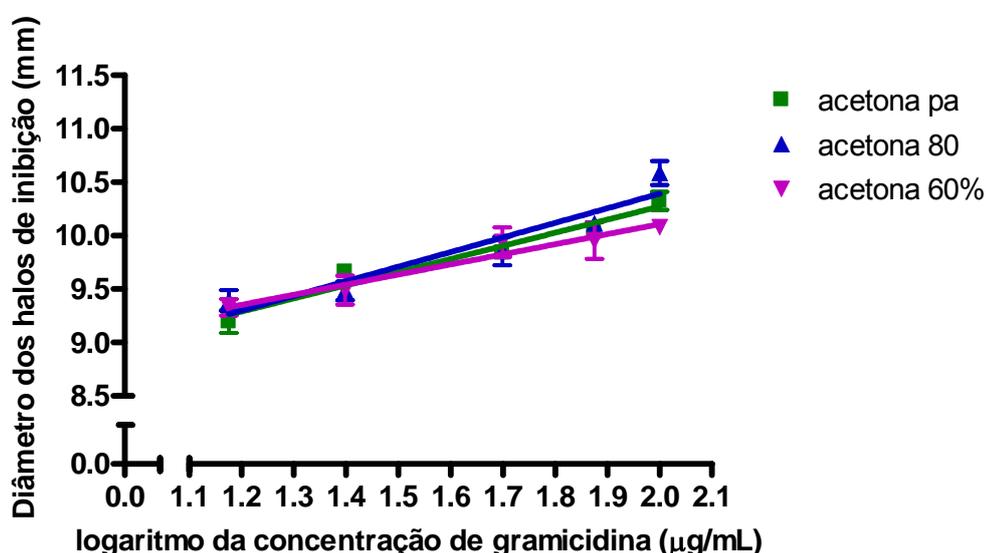


Figura 13. Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,25%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 15,0 a 100 $\mu\text{g/ml}$ em acetona pa $y = (7,81 \pm 0,20) + (1,23 \pm 0,12)x$, acetona 80% $y = (7,66 \pm 0,28) + (1,37 \pm 0,17)x$ e acetona 60% $y = (8,22 \pm 0,29) + (0,95 \pm 0,18)x$.

Soluções de gramicidina (15,0 a 100 µg/ml) preparadas em tampões n^o1, n^o2 e n^o3, foram testadas nas mesmas condições. Esses tampões diferem entre si pela concentração de polissorbato 80, que está ausente no tampão n^o1 e nas concentrações de 0,01 e 1% (p/V) nos tampões n^o2 e n^o3, respectivamente.

Como a solubilidade da gramicidina em meio aquoso é baixa, a adição de polissorbato 80, que por ser um tensoativo não iônico, poderia impedir a aderência do antibiótico à vidraria empregada (BRISTISH..., 2007).

No entanto, para cada um dos tampões utilizados não foi observado aumento do diâmetro dos halos em função do aumento da concentração de gramicidina, sendo então a regressão não significativa. Porém, ao se comparar os halos produzidos pelas soluções de gramicidina nos diferentes tampões, verificou-se um aumento do diâmetro do halo, com o uso desses diluentes (Figura 14). Halos maiores foram observados quando foi utilizado o tampão n^o3 e diferentes dos demais obtidos com os outros diluentes. Essa observação poderia estar relacionada à adição de polissorbato 80 aos tampões, sendo maior no tampão n^o3.

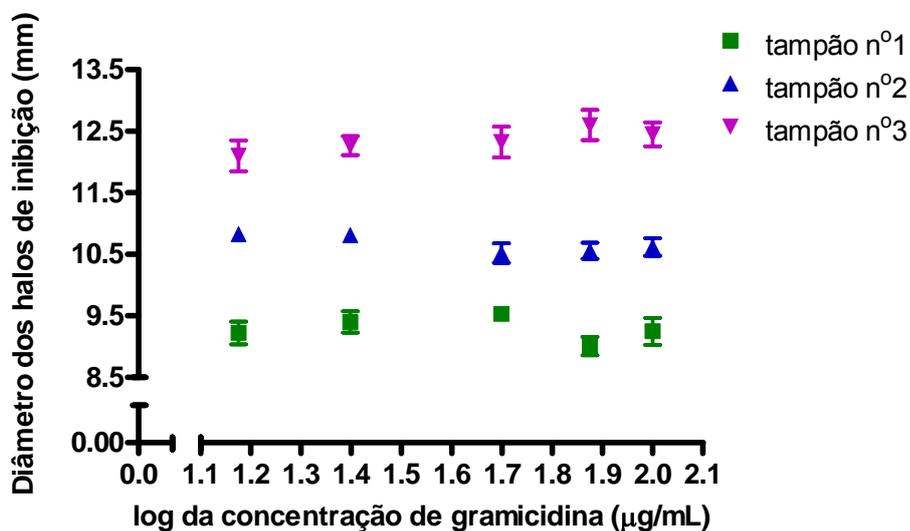


Figura 14. Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,25%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 15,0 a 100 µg/ml em tampões n^o1, 2 e 3.

Para verificar a influência do polissorbato 80 sobre o diâmetro dos halos de inibição, foi acrescentado a cada placa um cilindro, ao qual adicionou-se apenas o diluente: tampão n^o1 (sem polissorbato 80), n^o2 (polissorbato 80 0,1%) e n^o3 (polissorbato 80

1%). Os diluentes apresentaram apenas atividade local na área delimitada pelo cilindro.

Desta forma, a explicação para a observação de halos de inibição maiores para as soluções em tampão nº3 seria o efeito de não aderência do antibiótico ao cilindro devido à ação do polissorbato 80. Além disso, o polissorbato 80 como todo tensoativo poderia melhorar a solubilidade da gramicidina em meio aquoso.

Então, selecionou-se o tampão nº3 como diluente para a gramicidina por apresentar melhores resultados em relação aos outros diluentes utilizados.

6.3 Desenvolvimento do método de difusão utilizando ágar nutriente

A composição do meio de cultura interfere no doseamento microbiológico de antibiótico, podendo influenciar tanto o crescimento do microrganismo quanto a atividade do antimicrobiano. Os meios mais ricos permitem a proliferação do microrganismo mais rapidamente levando à formação de halos de inibição menores (HEWITT, 2007).

Em relação à atividade do antimicrobiano, componentes do meio de cultura podem inibi-la. A atividade da gramicidina é inibida de forma amena por peptonas, que são hidrolisados de proteínas de diferentes origens (DUBOS e HOTCHKISS, 1941; HOTCHKISS, 1944; LECLERCQ, 1968; REEDY e WOLFSON, 1949). Outro fato é que esse antibiótico é uma mistura de três subtipos de gramicidina (A, B e C) podendo assim sofrer interferências de componentes do meio de cultura sem, contudo afetar a todos os subtipos na mesma extensão, o que levaria a variação dependente da composição da amostra.

O ágar nutriente consiste em um meio de cultura menos complexo constituído por cloreto de sódio, extrato de carne, peptona de gelatina e ágar bacteriológico. Já o ágar para antibióticos nº1 é composto por peptonas de carne e de caseína, glicose, extratos de carne e de levedura e ágar. Em relação às peptonas, a de gelatina presente no ágar nutriente é caracterizada pela ausência de carboidratos e por baixo conteúdo de cistina e triptofano. Portanto, é menos nutritiva que as peptonas de caseína (hidrolisado enzimático de fosfoproteínas do soro do leite que apresenta alto

conteúdo de triptofano) e de carne (complexo de tecido animal hidrolisado por enzimas) presentes no ágar para antibióticos n°1.

Desta forma, o ágar nutriente, por ser menos nutritivo, foi empregado para verificar se poderia ser utilizado em substituição ao meio para antibióticos n°1 e produzir resultados apropriados em relação à curva dose-resposta.

A Adequação das concentrações de gramicidina, em tampão n°3, a serem utilizadas na curva analítica

Utilizando o ágar nutriente, foi investigada a faixa de concentração de gramicidina que acarretasse resposta graduada e linear.

Halos nítidos foram observados com a utilização de dupla camada de meio, inóculo a 0,25% de *K. rhizophila* e pré-difusão de 1 hora. Foram testadas soluções na faixa de 15,0 a 100 µg/ml preparadas em tampão n°3.

A gradação da resposta foi visualmente nítida e confirmada pela análise de regressão linear dos dados obtidos – Figura 15. No entanto, o modelo linear não foi adequado, já que o desvio de linearidade foi significativo. Além disso, a análise de resíduos demonstrou haver correlação positiva entre eles, indicando que o modelo não é adequado e necessita de outros termos adicionais.

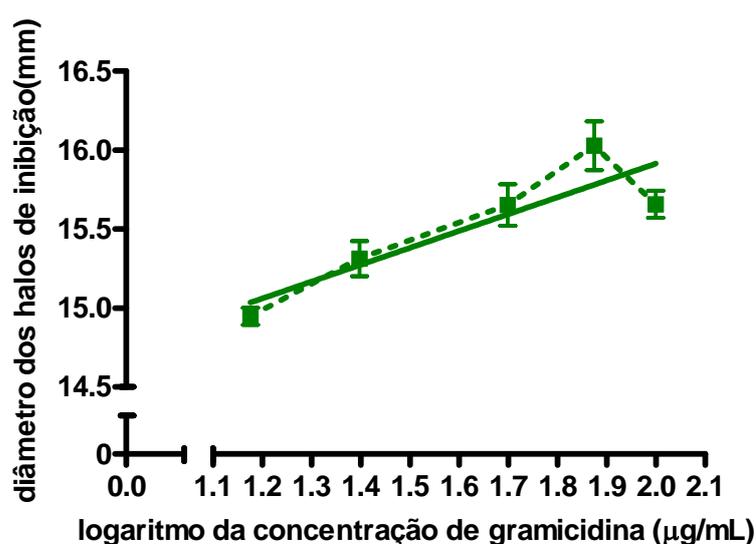


Figura 15. Logaritmo da concentração de gramicidina (15,0 a 100 µg/ml) versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando tampão n°3 como diluente, inóculo a 0,25% e ágar nutriente base e superfície (n = 4). Equação da reta: $y = (13,78 \pm 0,33) + (1,07 \pm 0,20) x$. Coeficiente de correlação (r) 0,78.

Com o objetivo de eliminar a curvatura da curva halos de inibição versus logaritmo da concentração, foi testada nova faixa de concentração de gramicidina (5,00 a 80,0 µg/ml) nas mesmas condições descritas anteriormente. A regressão foi significativa, porém o modelo linear permaneceu inadequado, pois o desvio de linearidade foi significativo e os resíduos apresentaram correlação positiva (Figura 16).

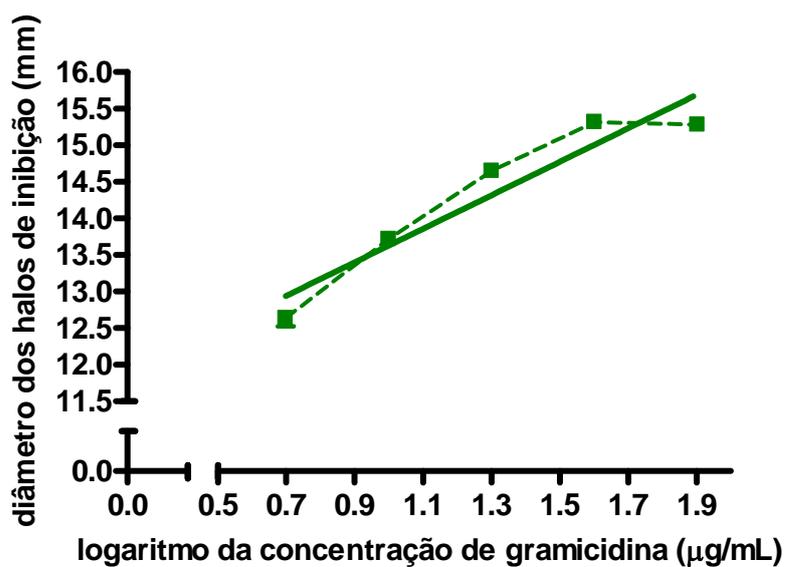


Figura 16. Logaritmo da concentração de gramicidina (5,00 a 80,0 µg/ml) versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando tampão n°3 como diluente, inóculo a 0,25% e ágar nutriente base e superfície (n = 6). Equação da reta: $y = (11,34 \pm 0,23) + (2,29 \pm 0,16) x$ Coeficiente de correlação (r) 0,93.

Além disso, verificou-se o aumento do resíduo com a elevação da concentração de gramicidina na solução. Estatisticamente o resíduo é igual à diferença entre o diâmetro do halo observado e o valor ajustado pelo modelo linear. Esta observação poderia estar associada à atividade antimicrobiana exercida por outra substância, que não a gramicidina, presente em concentrações crescentes nas soluções teste em função da concentração do antibiótico. Esse efeito antimicrobiano se somaria à ação exercida pela gramicidina, gerando halos maiores que os preditos pelo modelo. Como a concentração dessa substância aumentaria com o aumento do conteúdo de gramicidina, a ação antimicrobiana não seria a mesma em todos os níveis do antibiótico, mas sim, maiores em soluções mais concentradas. Isso justifica o aumento do resíduo em função da concentração do antimicrobiano. O álcool etílico, utilizado no preparo da solução estoque, poderia ser essa substância por estar

presente nas soluções teste em diferentes concentrações. Assim, foi realizado um ensaio para comprovar a hipótese formulada.

B Verificação da influência dos diluentes no diâmetro dos halos de inibição

✓ Álcool etílico e tampão nº3

Para verificar a possível influência dos diluentes no diâmetro dos halos de inibição, foram testadas soluções de álcool etílico em tampão nº3 nas concentrações de 0,48 a 7,60% (V/V). Foi acrescentado às placas, um cilindro contendo o tampão nº3 (branco).

Foram observados halos de inibição com as soluções etanólicas e com o tampão nº3 isoladamente (Tabela 14), porém esses halos foram menores e menos nítidos (bordas difusas) que os produzidos pela gramicidina veiculada nesses diluentes.

Tabela 14. Valores médios \pm dp do diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos para *K. rhizophila* empregando inóculo de concentração 0,25% e soluções de etanol 0,48 a 7,60% (V/V) preparadas em tampão nº3 (n=6).

Concentrações das soluções de etanol em tampão nº3 (% V/V)					
0,48	0,95	1,90	3,80	7,60	Branco
10,50 \pm 0,70	10,37 \pm 0,83	10,30 \pm 0,80	10,23 \pm 0,82	10,48 \pm 0,73	9,45 \pm 0,94

Branco: média dos halos obtidos pela ação do tampão nº3

Não se verificou, neste caso, uma gradação da resposta em função da concentração do álcool. Assim, a variação do conteúdo de álcool etílico nas soluções teste de gramicidina parece não afetar de forma diferenciada os halos formados pelos diferentes níveis de antibiótico.

Verificou-se não haver diferença significativa entre os halos originados pelas diferentes soluções de álcool etílico e pelo tampão nº3. Desta forma, pode se inferir que o álcool etílico nas concentrações testadas não apresentou atividade antimicrobiana contra *K. rhizophila*, sendo os halos de inibição formados por ação do tampão nº3.

Tendo em vista a influência do tampão nº3, a gramicidina na faixa de 5,00 a 80,0 µg/ml foi solubilizada em água contendo polissorbato 80 na concentração de 1% (p/V).

✓ Polissorbato 80 a 1%

Com o uso da gramicidina solubilizada em água com polissorbato 80 a 1%, verificou-se regressão significativa entre o diâmetro dos halos e o logaritmo da concentração, não sendo observados o aumento do resíduo com o aumento da concentração e a autocorrelação entre eles. Contudo, o desvio de linearidade permaneceu significativo.

Para verificar se o polissorbato 80 1% também apresentava atividade antimicrobiana contra *K. rhizophila*, a exemplo do tampão nº3, foram preparadas placas contendo meios, base e superfície, com *K. rhizophila* 0,25%. Adicionou-se aos cilindros polissorbato 80 1% e soluções etanólicas preparadas neste diluente (0,46 a 7,5% V/V). Todas as soluções testadas apresentaram apenas atividade local, isto é, os halos de inibição formaram-se na área delimitada pelo cilindro. Em vista disso, polissorbato 80 a 1% foi empregado como diluente no preparo das soluções de trabalho.

C Tentativas de aumento no diâmetro dos halos de inibição do antibiótico em ágar nutriente

Existem alguns parâmetros especificados na literatura em relação ao diâmetro ideal dos halos para utilização em doseamentos, tendo em vista a precisão das medidas. O diâmetro dos halos de inibição deve estar entre 14 e 16 mm (THE UNITED..., 2008). No entanto, os halos obtidos para o doseamento de gramicidina nas condições estabelecidas estavam abaixo do valor sugerido. Desta forma, foram realizadas algumas alterações em certos fatores com o objetivo de aumentar o diâmetro dos halos.

✓ Adição de glicerol ao meio de cultura

O gel de ágar possui uma estrutura com cadeias moleculares formando uma rede, pela qual o antibiótico irá se difundir. Dependendo do tamanho molecular, a

substância passará pelo poro do gel ou será filtrada por ele (KAVANAGH, 1963). Friedman (1930) demonstrou que a adição de glicerol, na concentração de 3% (p/V), ao ágar aumentava o diâmetro do poro do gel, elevando a velocidade de difusão da uréia. Com o objetivo de aumentar a difusão de gramicidina no ágar nutriente, adicionou-se glicerol 3% (p/v).

Os halos observados, com essa modificação do meio foram mais nítidos que no meio sem glicerol. A regressão entre o diâmetro dos halos e o logaritmo da concentração foi significativa, mas também o desvio de linearidade. Assim a regressão polinomial quadrática ($y = a + bx + cx^2$) foi utilizada para representar a relação entre o diâmetro dos halos de inibição e o logaritmo da concentração. As presunções de homoscedasticidade, normalidade e independência dos resíduos foram comprovadas. Portanto, demonstrou-se que o modelo quadrático foi adequado para os dados (Figura 17).

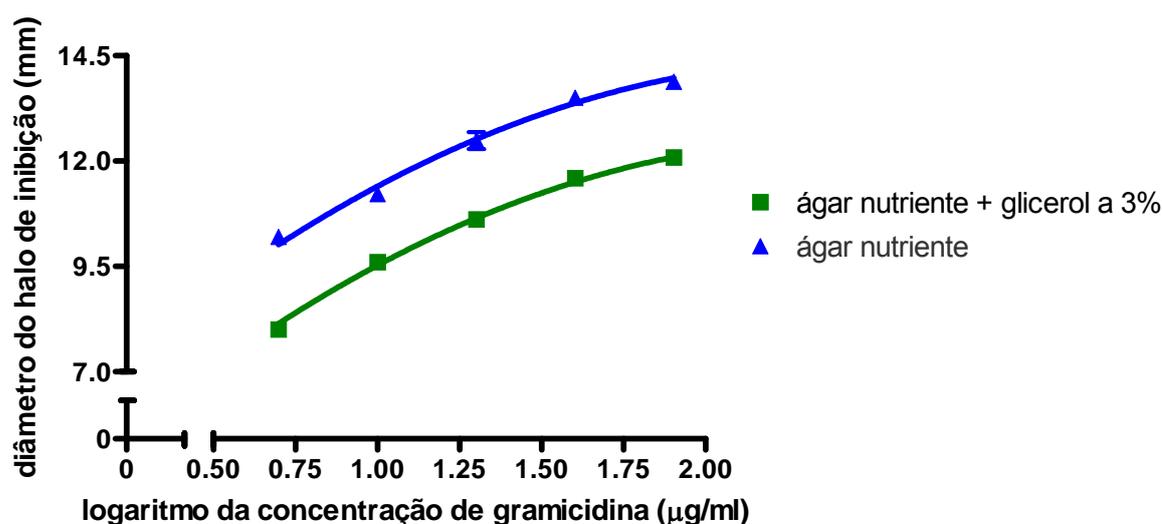


Figura 17. Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,25%, soluções de gramicidina 5,00 a 80,0 µg/ml em polissorbato 80 1% e como meios base e superfície: ágar nutriente contendo glicerol a 3% $y = (3,32 \pm 0,25) + (7,98 \pm 0,42)x + (-1,77 \pm 0,16)x^2$, (n=5); e ágar nutriente $y = (6,28 \pm 0,67) + (6,31 \pm 1,10)x + (-1,92 \pm 0,42)x^2$, (n=5).

Comparando as curvas obtidas com meio sem e com glicerol evidenciou-se o paralelismo entre elas (não houve diferença significativa entre os valores de b e c das retas), com halos menores para o meio com glicerol. Assim, o ágar nutriente sem adição de glicerol foi utilizado nos demais ensaios.

✓ **Variação do conteúdo de água no ágar nutriente**

Estudos de Friedman (1930) comprovaram que a concentração de ágar interfere na difusão, sendo que uma variação de 0,8 a 5,15% (p/V) de ágar no gel causou a redução em 36% da velocidade de difusão da uréia. Em vista disso, aumentou-se o volume de água utilizado no preparo do ágar nutriente com o objetivo de diminuir a concentração de ágar de 1,5 para 1,0% (p/V). Conseqüentemente, os demais componentes do meio de cultura também tiveram sua concentração reduzida, tornando o meio menos nutritivo. Esperava-se com isso um aumento do diâmetro dos halos de inibição, já que o crescimento do microrganismo estaria mais lento pelo fato de diluir os nutrientes (BRADY, M e KATZ, S., 1990).

Utilizando as condições anteriormente definidas e dupla camada de meio adicionado de água, foram observados halos difusos, com bordas não definidas o que chegou impedir a medida de seu diâmetro. Continuando na mesma linha, testou-se um meio com menos água que o anterior (1,25% p/V de ágar). Os halos obtidos nessas condições apresentaram bordas bem definidas. A regressão entre o halo de inibição e o logaritmo da concentração foi significativa, mas continuou havendo desvio de linearidade. Assim, a regressão polinomial quadrática foi utilizada e obteve-se um modelo adequado para representar a relação entre a variável resposta e a regressora.

As curvas obtidas para os resultados com meio de cultura normal e o meio adicionado de mais água (1,25%, p/v, de ágar) foram comparadas e evidenciou-se não existir diferença significativa entre elas.

Assim, quando o conteúdo de água foi aumentado de 50% a mais que o especificado pelo fabricante a resposta foi afetada negativamente levando a uma difusão maior, mas sem uniformidade. Com o uso de um meio com 25% de água a mais não houve interferência no diâmetro do halo formado.

Em vista disso, para os ensaios seguintes o ágar nutriente foi preparado sem alterações, ou seja, conforme especificações do fabricante.

✓ Emprego de placas com monocamada e dupla camada

O diâmetro dos halos de inibição é dependente da espessura da camada de meio de cultura, sendo que uma camada fina produzirá halos maiores que camada mais espessa (GAVIN, J., 1957a). Pode se empregar nos ensaios, uma única camada de meio ou dupla camada sendo, neste caso, uma mais espessa e a outra bem fina. O uso de monocamada pode produzir halos mais claros e definidos.

No lugar da dupla camada usada nos ensaios anteriores, foi empregada camada única de 10 ml de ágar nutriente. Os halos obtidos apresentaram regressão significativa com o logaritmo da concentração e desvio de linearidade significativo.

Quando se empregou a regressão polinomial quadrática para análise dos dados, o modelo foi adequado. A comparação entre as curvas produzidas pelo emprego de mono e dupla camada evidenciou que elas são paralelas (não há diferença significativa entre b e c das curvas) e que halos maiores foram obtidos com a dupla camada. Desta forma, as placas com dupla camada continuaram a ser utilizadas para os demais testes.

✓ Emprego de diferentes concentrações de inóculos

Variações na concentração do inóculo podem produzir alteração no diâmetro dos halos de inibição. Inóculos mais densos (maior número de microrganismo) podem acarretar a formação de halo de menor diâmetro (DAVIS, W e STOUT, T., 1971; HEWITT, F., 2007; KAVANAGH, F., 1963).

Para verificar essa influência foram testados inóculos de concentrações 0,25% e 0,1% de *K. rhizophila*. Para ambos inóculos, os halos obtidos foram nítidos e apresentaram regressão significativa com o logaritmo da concentração, apesar do modelo linear não ter sido adequado devido ao desvio de linearidade. Já o modelo quadrático foi adequado e, portanto, utilizado para análise dos dados.

As curvas obtidas para ambos os inóculos foram comparadas e se mostraram paralelas sendo que os halos obtidos com inóculo a 0,1% de *K. rhizophila* foram maiores. Assim, esse inóculo foi selecionado para os demais testes.

✓ **Adequação das concentrações de gramicidina, em polissorbato 80 1%, a serem utilizadas na curva analítica**

Quando soluções de gramicidina na faixa de 5,00 a 80,0 $\mu\text{g/ml}$ preparadas em polissorbato 80 1% foram ensaiadas em placas com ágar nutriente, base e superfície, inóculo a 0,1 % de *K. rhizophila* e 1 hora de pré-difusão, os halos obtidos apresentaram regressão significativa com o logaritmo da concentração. Contudo, o modelo linear não foi adequado, pois a curvatura foi significativa. Tendo em vista que a presença de curvatura está relacionada à faixa de concentração utilizada, empregou-se outro intervalo de concentração sendo de 8,00 a 40,5 $\mu\text{g/ml}$, com uma relação entre as concentrações de 1,5. Essa modificação resultou em regressão significativa entre o diâmetro dos halos e o logaritmo da concentração. No entanto, a curvatura permaneceu significativa – Figura 18.

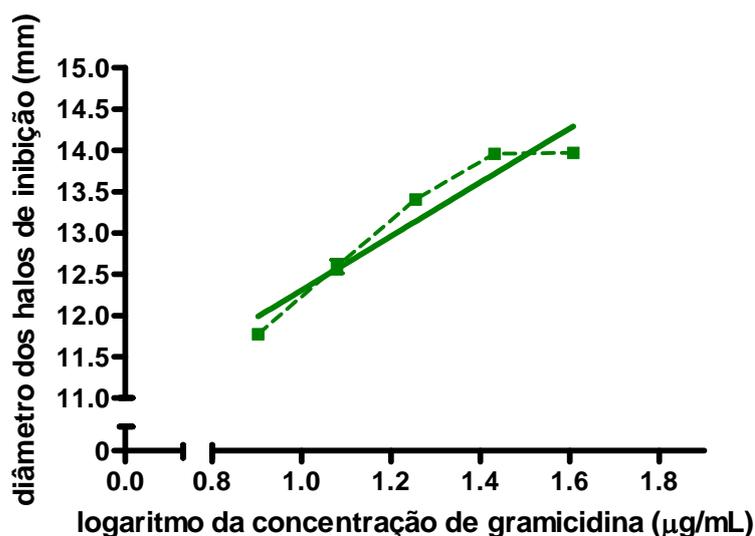


Figura 18. Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 8,00 a 40,5 $\mu\text{g/ml}$ em polissorbato 80 1% (n=4).

Continuando no mesmo raciocínio, foram testadas duas outras faixas de concentração do antibiótico de 7,10 a 36,0 $\mu\text{g/ml}$ e 5,00 a 37,9 $\mu\text{g/ml}$ com relação entre as concentrações igual a 1,5 em ambos os casos. Para os dois intervalos, a regressão dos dados foi significativa, mas o desvio de linearidade também continuou significativo indicando a falta de adequação ao modelo linear. Assim, a faixa de concentração de 5,00 a 25,3 $\mu\text{g/ml}$ foi ensaiada sendo a regressão significativa e o

modelo linear adequado (desvio de linearidade não significativo, homoscedasticidade, normalidade e independência dos resíduos) – Figura 19.

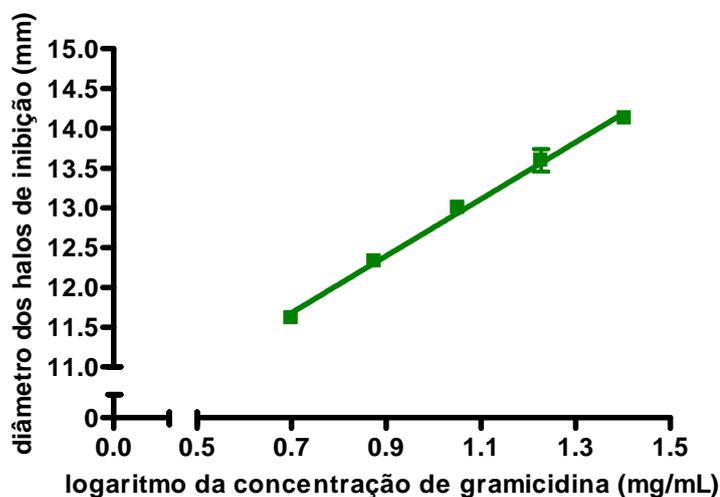


Figura 19. Logaritmo da concentração de gramicidina versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície e soluções de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml em polissorbato 80 1%; $y = (9,18 \pm 0,15) + (3,57 \pm 0,13)x$; coeficiente de correlação $r=0,988$; ($n=4$).

Considerando os resultados obtidos, as condições de ensaio para o método para doseamento de gramicidina foram definidas: soluções de trabalho a 5,00 a 25,3 µg/ml preparadas em polissorbato 80 1%, adicionadas em placa com ágar nutriente, base e superfície, inóculo a 0,1% de *K. rhizophila*, 1 hora de pré-difusão, incubadas por 18 horas a $36,5 \pm 1,0$ °C.

6.4 Validação do método de difusão com ágar nutriente

A validação deve garantir que o método analítico atenda às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para isto, deve satisfazer os parâmetros de validação: linearidade, exatidão, precisão, especificidade, robustez, limite de quantificação e detecção (AGÊNCIA..., 2003).

Segundo a resolução RE nº899 de 2003 (AGÊNCIA..., 2003), os métodos são classificados em quatro categorias de acordo com sua finalidade, sendo que os parâmetros de validação exigidos para cada um dependem da categoria a que pertence. O método para quantificação da gramicidina aqui desenvolvido, pertence à

categoria I, sendo necessária a determinação de: linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez, Além desses, os limites de quantificação e de detecção foram determinados com o objetivo de que esses valores possam ser utilizados como referência em trabalhos futuros nos quais o método desenvolvido seja empregado.

A Curva analítica

Por meio da linearidade demonstra-se que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (AGÊNCIA..., 2003).

Contudo, Hubert e colaboradores (2007a - b) e Rozet *et. al.* (2007) discutem em seus trabalhos que o termo linearidade não exprime a relação entre a resposta do instrumento e a concentração do analito, mas sim a relação entre os resultados obtidos (neste caso, a potência) e a concentração rotulada da amostra. A primeira definição estaria associada à curva analítica, pois é através desta que verificamos a relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito. Em vista do exposto o termo curva analítica foi aqui adotado como um parâmetro de validação.

Foram obtidas cinco curvas analíticas, sendo duas no mesmo dia (avaliação intra-dia) e as demais em dias diferentes (avaliação inter-dias).

O modelo linear foi adequado para as cinco curvas apresentando normalidade, independência dos resíduos, homoscedasticidade e desvio de linearidade não significativo (MONTGOMERY *et. al.*, 2001; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) – APÊNDICE A.

As cinco retas apresentaram coeficiente de correlação (r) superior ou igual a 0,98, conforme critério estabelecido pela resolução brasileira (AGÊNCIA..., 2003) – Tabela 15.

O coeficiente de determinação (r^2) é a fração da variância total de Y que é explicada pela variação em X, isto é, a proporção da variação total do diâmetro dos halos de inibição que é explicada pela variação do logaritmo da concentração do antibiótico (MONTGOMERY *et. al.*, 2001). Desta forma, um valor de r^2 igual a 0,994 (curva A do

dia 1) significa que 99,4 % da variabilidade do diâmetro dos halos de inibição é explicada pelo logaritmo da concentração de gramicidina.

Tabela 15. Parâmetros de curva analítica (intercepto - a , inclinação - b , coeficiente de correlação - r e coeficiente de determinação - r^2) para gramicidina na faixa de 5,00 a 25,3 $\mu\text{g/ml}$.

Retas	$a \pm dp$	$b \pm dp$	r	r^2	n	nº de outlier
Dia 1 A	$8,00 \pm 0,10$	$3,59 \pm 0,09$	0,997	0,994	12 ⁽ⁱ⁾	1
Dia 1 B	$8,00 \pm 0,22$	$3,55 \pm 0,21$	0,984	0,967	12 ⁽ⁱⁱ⁾	0
Dia 2	$7,74 \pm 0,24$	$3,81 \pm 0,21$	0,985	0,969	12 ⁽ⁱⁱ⁾	0
Dia 3	$7,83 \pm 0,16$	$3,60 \pm 0,14$	0,991	0,983	13	0
Dia 4	$8,26 \pm 0,24$	$3,35 \pm 0,22$	0,98	0,956	13	0

⁽ⁱ⁾ Identificação de um *outlier* por cálculos estatísticos. Este dado não foi repostado.

⁽ⁱⁱ⁾ Ocorreu a perda de uma placa devido ao vazamento das soluções contidas nos cilindros, impedindo a formação dos halos. Este dado não foi repostado.

As duas retas obtidas em um mesmo dia de ensaio (intra-dia) foram comparadas e as diferenças entre os interceptos e as inclinações não foram significativas. Resultado equivalente foi verificado quando a comparação foi realizada entre as cinco retas obtidas nos quatro dias de ensaio (Figura 20 e APÊNDICE B).

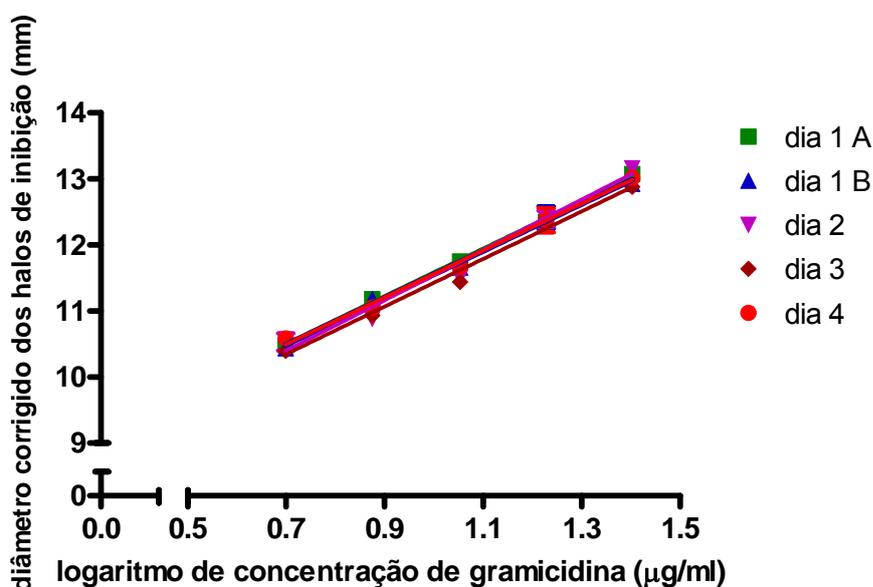


Figura 20. Logaritmo da concentração de gramicidina versus média corrigida do diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície e soluções de gramicidina 5,00 a 25,3 $\mu\text{g/ml}$ em polissorbato 80 1%. Dia 1 A e B são retas de um mesmo dia; dia 2, 3 e 4 são retas obtidas em dias diferentes.

B Seletividade

Um método é sensível quando apresenta a capacidade de diferenciar o analito de outros componentes da amostra e quantificá-lo. Como o método de doseamento foi desenvolvido para gramicidina matéria-prima, as possíveis substâncias interferentes constituem os produtos de degradação e impurezas provenientes do processo de fermentação para obtenção do antibiótico.

A secogramicidina ou desformilgramicidina é o maior produto de degradação da gramicidina obtido por hidrólise (Orwa *et. al.*, 2001).

Ishii e Witkop (1963) descreveram um método para a obtenção deste composto baseado na hidrólise da gramicidina em meio orgânico. Tal procedimento foi realizado, empregando a matéria-prima como substância de partida, e o produto obtido foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência.

A Figura 21 apresenta os cromatogramas da gramicidina matéria-prima e do produto de degradação. A ausência dos picos da gramicidina no cromatograma do produto de degradação comprova que a molécula foi alterada quando submetida às condições ácidas em meio orgânico (metanol).

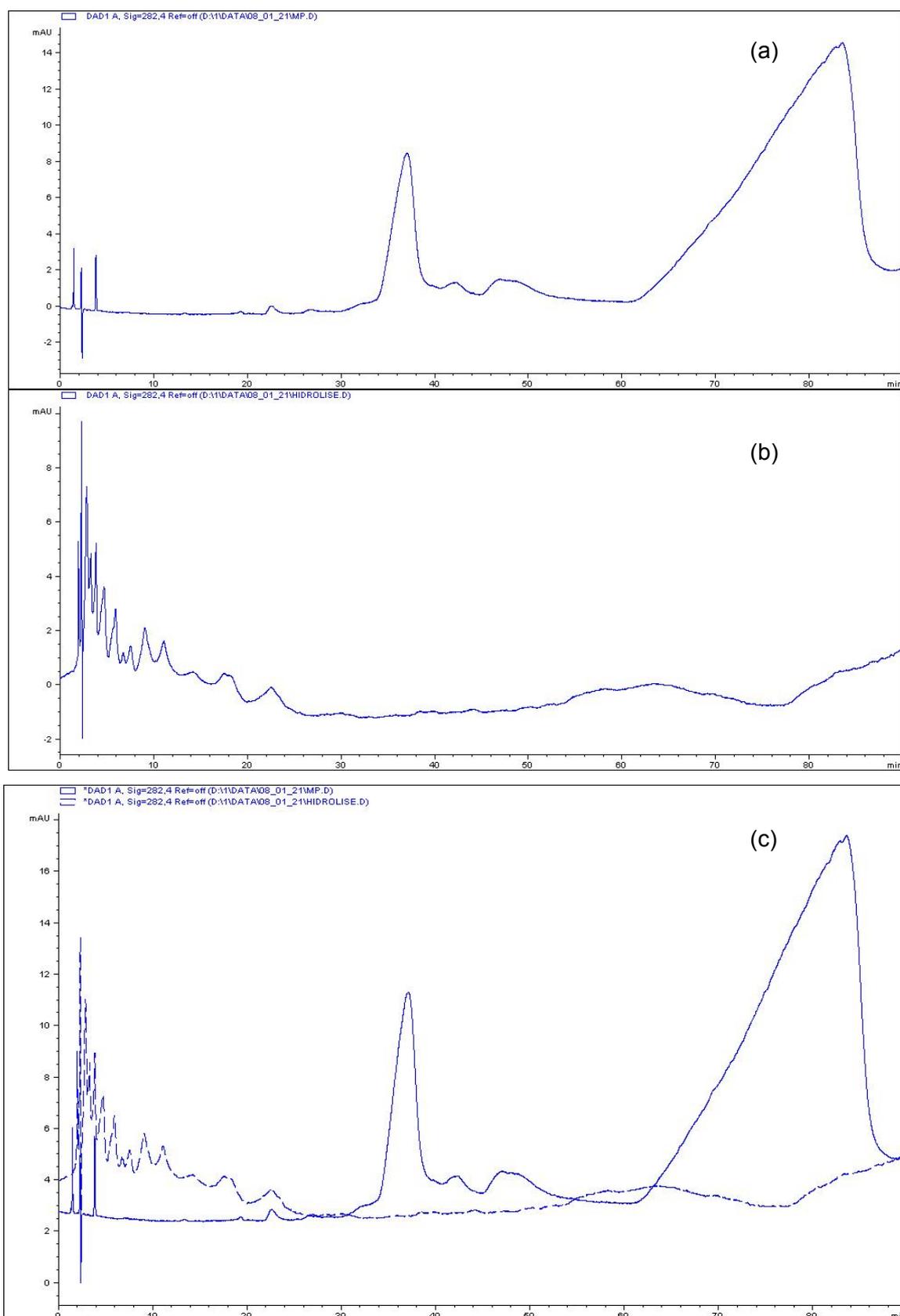


Figura 21. Cromatograma obtido por CLAE com eluição em água:metanol (29:71 V/V) de gramicidina matéria-prima (a) e hidrolisado (b). Em (c) sobreposição dos cromatogramas de matéria-prima (—) e hidrolisado (- - -).

O rendimento da reação de hidrólise não foi determinado, sendo considerado o valor relatado na literatura (98%) para os cálculos de preparo das soluções. Assim, soluções do produto de degradação foram preparadas nas concentrações 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml para realização do doseamento pelo delineamento de 3x3.

Halos de inibição foram observados, porém não houve aumento de seus diâmetros com o aumento do logaritmo da concentração. Portanto a reta obtida para o produto de degradação não apresentou regressão significativa (Figura 22).

A comparação dos diâmetros dos halos de inibição obtidos para o produto de degradação com os halos obtidos para o diluente sozinho mostrou não haver diferença significativa. Este fato comprova a perda da atividade antimicrobiana da gramicidina após a reação de hidrólise. Assim, o produto de degradação não seria um interferente para o método de doseamento desenvolvido.

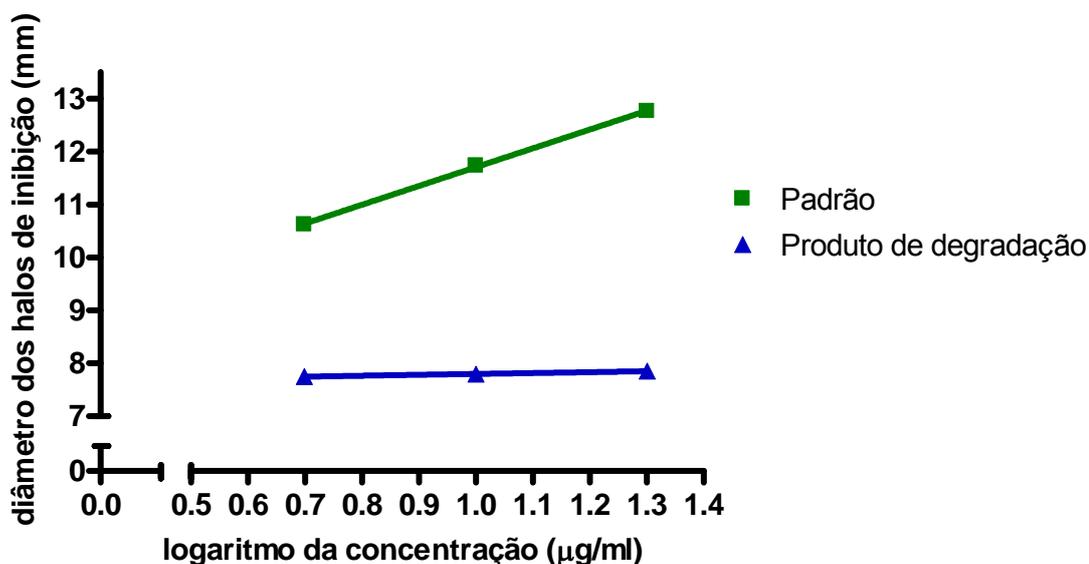


Figura 22. Logaritmo da concentração de gramicidina e de seu produto de degradação versus diâmetro dos halos de inibição para *K. rhizophila*, empregando inóculo a 0,1%, meios base e superfície; soluções padrão de gramicidina e de produto de degradação a 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml em polissorbato 80 1%. Curva do padrão: $y = (8,15 \pm 0,14) + (3,55 \pm 0,13) x$; $n=8$.

Também foi preparada solução do hidrolisado a 11,3 µg/ml para doseamento empregando o delineamento 5x1 (Figura 23), no qual foi verificada novamente a ausência de atividade antimicrobiana do produto de degradação (Tabela 16).

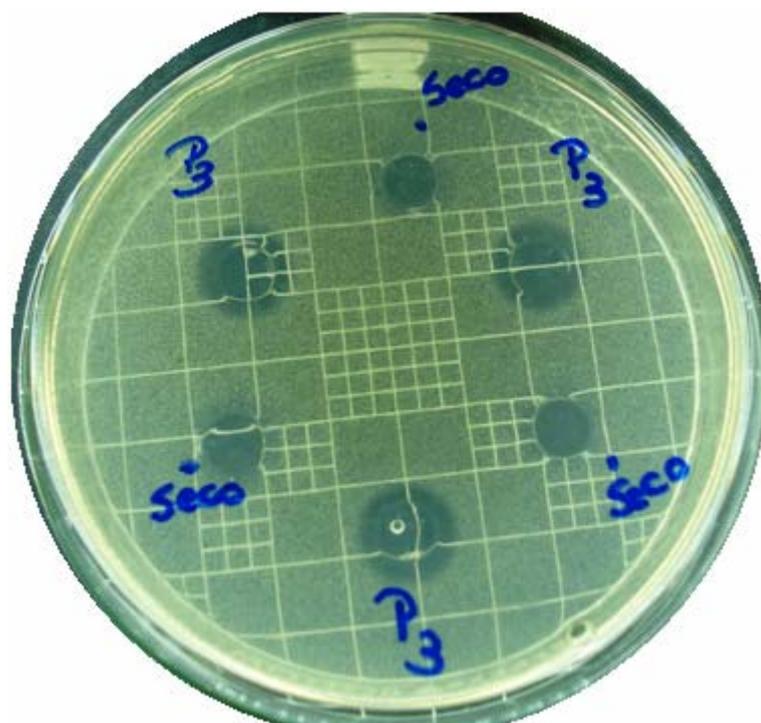


Figura 23. Placa com halos de inibição produzidos pelas soluções do produto de degradação (seco) e de gramicidina (P_3) a 11,3 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 16. Diâmetro médio \pm dp dos halos de inibição obtido para polissorbato 80 1%; produto de degradação a 5,00; 10,0; 11,3 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$ (n=8).

Diâmetro médio dos halos de inibição (mm)	Polissorbato 80 1% ⁽ⁱ⁾	Concentração do produto de degradação em polissorbato 80 1%			
		5,00	10,0	11,3	20,0
	7,54 \pm 0,26	7,75 \pm 0,15	7,80 \pm 0,14	7,53 \pm 0,30	7,85 \pm 0,09

⁽ⁱ⁾ Diluente sem antibiótico.

C Precisão e exatidão

A precisão do método é a avaliação da repetibilidade dos resultados de potência individuais obtidos quando o procedimento desenvolvido é aplicado diversas vezes para uma mesma amostra, em condições idênticas de ensaio. A precisão estima o erro aleatório associado ao procedimento analítico (ROZET *et. al.*, 2007). A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias).

A exatidão é o grau de concordância entre a potência determinada pelo método desenvolvido e o valor real da amostra (AGÊNCIA..., 2003).

Hubert (2007a), Rozet (2007) e colaboradores discutiram em seus trabalhos que a exatidão pode ser vista como composta pela veracidade (*trueness*)- (*bias*) e pela precisão (desvio padrão). Desta forma, pode ser considerada como a estimativa do erro total do processo analítico.

A veracidade está relacionada com os erros sistemáticos do procedimento analítico e em alguns casos é referenciada como exatidão, mas este uso não é recomendado (HUBERT *et. al.*, 2007b; ROZET *et. al.*, 2007).

Em vista disso, a exatidão do método desenvolvido foi também avaliada de acordo com os conceitos de Hubert (2007a-b) e Rozet (2007).

Dentre os vários delineamentos de ensaio descritos foram propostos para o doseamento de gramicidina o ensaio de retas paralelas 3x3 e o 5x1

C.1 Delineamento 3x3

✓ Repetibilidade e exatidão intra-dia

Avaliaram-se a repetibilidade e exatidão intra-dia do método por meio de três determinações de potência em três níveis: baixo, médio e alto, respectivamente, 50, 100 e 150% da potência nominal. Foram realizados três ensaios para cada nível, sendo preparadas diferentes soluções da amostra e do padrão para cada um.

Em todos eles foram verificados os parâmetros de paralelismo entre as retas do padrão e da amostra, significância da regressão e desvio de linearidade não significativo. O intervalo de confiança a 95% para a potência em todos os ensaios apresentou a variação máxima de 10% (APÊNDICE C).

A Tabela 17 apresenta os valores de precisão e exatidão intra-dia obtidos para os diferentes níveis de gramicidina (50, 100 e 150%).

Tabela 17. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão intra-dia de gramicidina em três níveis de concentração.

Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
	50 %	100 %	150 %
1	51,99	101,40	152,05
	49,19 – 54,94	96,24 – 106,84	146,34 – 157,98
2	50,12	101,76	148,03
	46,38 – 53,92	96,02 – 107,84	141,99 – 154,32
3	48,30	102,97	149,76
	43,97 – 51,45	99,04 – 107,06	143,28 – 156,53
Potência média (%)	50,14	102,04	149,95
DPR (%)	3,68	0,81	1,34
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (%)	42,5 – 57,5	85,0 – 115,0	127,5 – 172,5

Valores de desvio padrão relativo abaixo de 15% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão intra-dia adequada. A exatidão intra-dia também foi adequada, uma vez que o valor médio da potência determinada está entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ *Precisão intermediária e exatidão inter-dias*

A precisão intermediária e a exatidão inter-dias foram avaliadas por meio de três determinações de potência em três níveis (baixo, médio e alto), em dois dias diferentes. Verificou-se que todos os ensaios realizados foram válidos. Os valores para precisão e exatidão inter-dias obtidos para gramicidina em três diferentes níveis de concentração estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão inter-dias de gramicidina em três diferentes níveis de concentração.

Dias	Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
		50 %	100 %	150 %
1	1	51,99 49,19 – 54,94	101,40 96,24 – 106,84	152,05 146,34 – 157,98
	2	50,12 46,38 – 53,92	101,76 96,02 – 107,84	148,03 141,99 – 154,32
	3	48,30 43,97 – 51,45	102,97 99,04 – 107,06	149,76 ⁽¹⁾ 143,28 – 156,53
2	1	47,68 43,97 – 51,45	102,72 98,25 – 107,40	159,75 148,17 – 172,24
	2	52,64 45,49 – 54,62	99,44 93,14 – 106,18	147,16 137,82 – 157,13
	3	50,38 45,63 – 55,22	100,30 93,98 – 107,04	148,36 141,51 – 155,54
Potência média (%)		50,19	101,43	150,85
DPR (%)		3,90	1,35	3,10
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (%)		42,5 – 57,5	85,0 – 115,0	127,5 – 172,5

⁽¹⁾ Presença de um outlier.

Valores de desvio padrão relativo abaixo de 15% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão intermediária adequada. Em relação à exatidão inter-dias, os valores médios de potência estão em acordo com o critério de validade: valor médio da potência entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ **Veracidade e exatidão**

A linearidade permite avaliar a veracidade, isto é, ao se plotar o valor esperado *versus* o observado, espera-se obter uma reta cujo intercepto seja igual a zero e a inclinação igual a um (CAULCUTT e BODDY, 1983; JARDY e VIAL, 1999; INSTITUTO..., 2003). Desta forma, se a reta experimental se afastar muito da ideal é indicativo da presença de erros sistemáticos, isto é, a variação das potências obtidas

experimentalmente segue uma tendência. Assim, todos os valores obtidos serão maiores ou todos serão menores que a potência verdadeira, não ocorrendo mais a variação de forma aleatória.

Assim, plotou-se os valores verdadeiros de potência (50, 100 e 150%) *versus* os resultados obtidos experimentalmente em cada nível (Figura 24). Nesta figura, o intercepto da reta experimental é igual a 0,459, contudo seu intervalo de confiança inclui o valor zero (-3,997 a 4,916). Desta forma, não existe evidência suficiente de que o valor do intercepto seja diferente de zero. Em relação à inclinação, o intervalo de confiança inclui o valor um (0,9617 a 1,044), logo a inclinação não é diferente de um. Em vista disso, os resultados obtidos nos doseamentos realizados não apresentaram erros sistemáticos (*bias*) fixos e nem relativos.

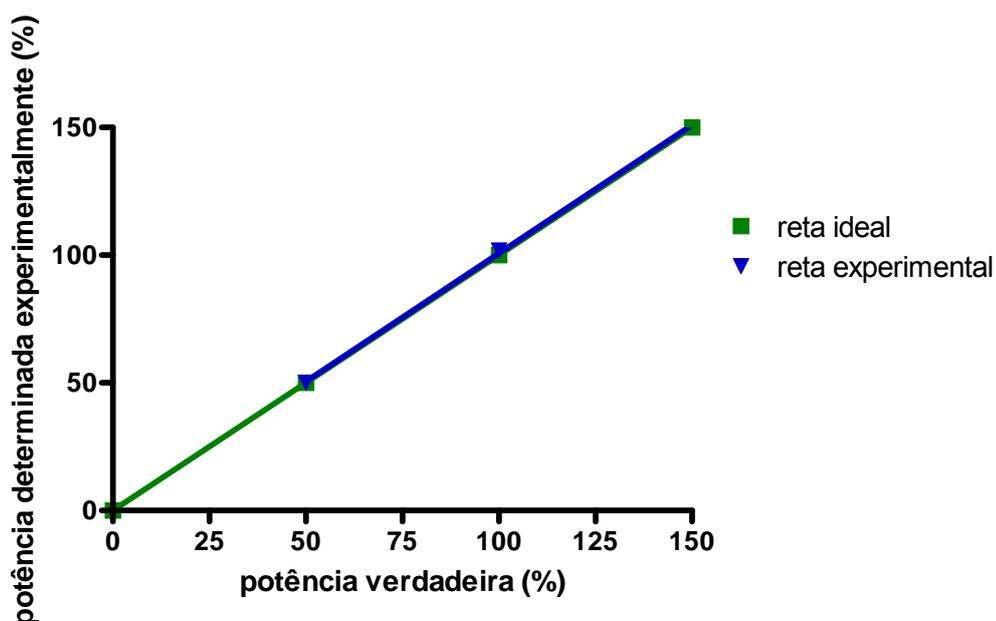


Figura 24. Gráfico de potência verdadeira versus potência determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (0,46 \pm 2,10) + (1,00 \pm 0,02)x$.

O β -intervalo de tolerância, que é o intervalo que contém $\beta\%$ dos resultados individuais futuros, foi calculado a um nível de significância de 5%. O método foi considerado exato (Figura 25), uma vez que o intervalo de tolerância, para a concentração no nível em questão, estava inserido no limite de $\pm 15\%$ (variação máxima permitida para avaliação da exatidão segundo resolução brasileira e guia do FDA – AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

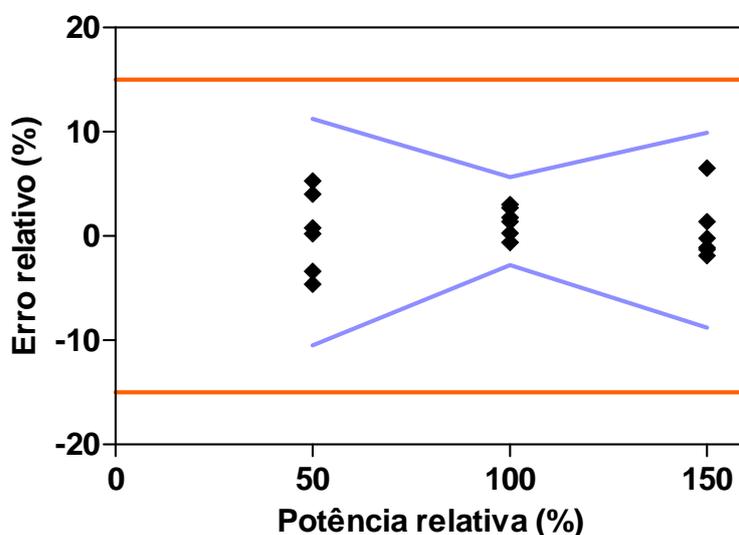


Figura 25. Gráfico de erro relativo versus potência relativa, com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho).

C.2 Delineamento 5x1

✓ *Repetibilidade e exatidão intra-dia*

Os ensaios realizados para avaliação da precisão e exatidão intra-dia, empregando o delineamento 5x1, foram válidos (APÊNDICE D). Os resultados estão apresentados na Tabela 19, os quais se encontram de acordo com os critérios de validade: desvio padrão relativo em cada nível abaixo de 15% e valor médio da potência entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

Tabela 19. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão intra-dia de gramicidina em três concentrações (n=3).

Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
	5,00 µg/ml	11,3 µg/ml	25,3 µg/ml
1	107,42 100,15 - 115,21	98,20 91,28 – 105,66	99,82 92,95 – 107,20
2	106,00 98,74 - 113,79	102,59 94,50 – 111,38	99,33 92,34 – 106,84
3	104,26 94,83 - 114,62	100,28 92,72 – 108,46	98,52 91,68 – 105,86
4	103,37 95,42 - 111,99	98,10 92,32 – 104,24	98,91 91,80 – 106,56
5	99,34 90,98 - 108,46	100,93 94,53 – 107,76	99,26 99,03 – 109,43
Potência média (%)	104,08	100,02	99,17
Concentração determinada (µg/ml)	5,20	11,3	25,1
DPR (%)	2,96	1,90	0,49
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (µg/ml)	4,25 – 5,75	9,61 – 13,0	21,5 – 29,1

✓ **Precisão intermediária e exatidão inter-dias**

Na Tabela 20 estão apresentados os valores de precisão e exatidão inter-dias obtidos para as concentrações de gramicidina trabalhadas.

Tabela 20. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão inter-dias de gramicidina em três concentrações.

Dias	Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
		5,00 µg/ml	11,3 µg/ml	25,3 µg/ml
1	1	107,42 100,15 - 115,21	98,20 91,28 - 105,66	99,82 92,95 - 107,20
	2	106,00 98,74 - 113,79	102,59 94,50 - 111,38	99,33 92,34 - 106,84
	3	104,26 94,83 - 114,62	100,28 92,72 - 108,46	98,52 91,68 - 105,86
	4	103,37 95,42 - 111,99	98,10 92,32 - 104,24	98,91 91,80 - 106,56
	5	99,34 90,98 - 108,46	100,93 94,53 - 107,76	99,26 99,03 - 109,43
2	1	105,00 97,91 - 112,61	103,99 95,86 - 112,80	101,62 94,49 - 109,28
	2	99,23 91,67 - 107,41	100,36 93,38 - 107,85	102,70 95,71 - 110,20
	3	105,00 97,45 - 113,14	96,99 89,52 - 105,08	99,19 91,79 - 107,19
	4	108,34 101,20 - 115,98	103,62 97,36 - 110,28	100,97 93,76 - 108,73
	5	102,29 95,35 - 109,73	96,78 90,36 - 103,66	100,18 93,44 - 107,41
Potência média (%)		104,02	100,18	100,05
Concentração determinada (µg/ml)		5,20	11,3	25,3
DPR (%)		2,94	2,64	1,33
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (µg/ml)		4,25 - 5,75	9,61 - 13,0	21,5 - 29,1

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 15% e os valores médios de potência entre 85 e 115% do valor teórico indicam, respectivamente, que o método desenvolvido apresenta precisão intermediária e exatidão inter-dias adequados.

✓ **Veracidade e exatidão**

A veracidade foi avaliada da mesma forma descrita no item *Precisão e exatidão inter-dias* para o delineamento 3x3. O intervalo de confiança para o intercepto da reta experimental (Figura 26) inclui o valor zero (-0,01 a 0,38) e para a inclinação inclui o valor um (0,98 a 1,00). Portanto, não há evidência da presença de erros sistemáticos (fixos ou relativos) nos resultados.

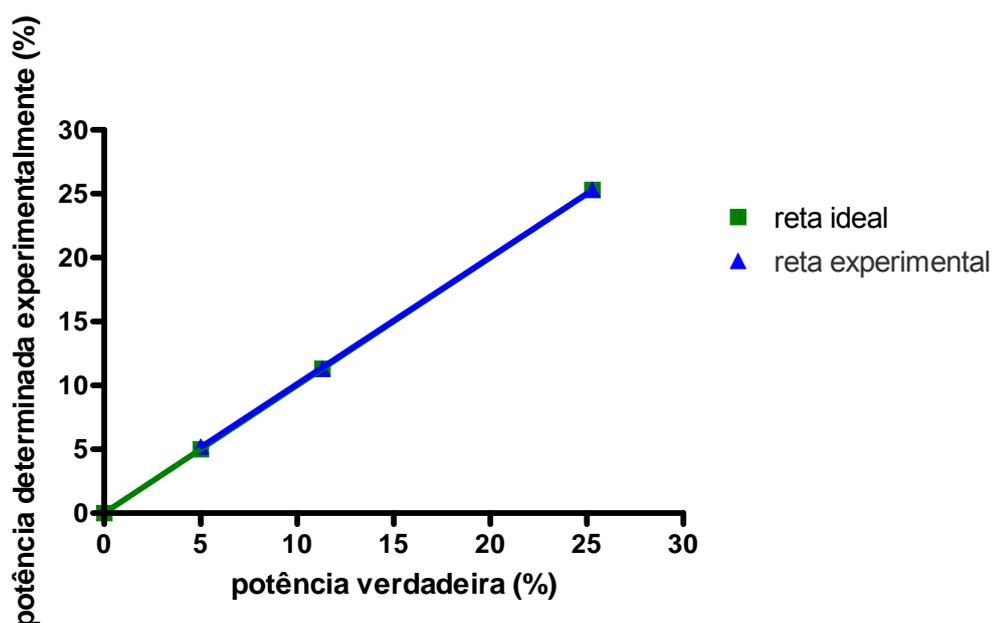


Figura 26. Gráfico de potência verdadeira versus potência determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (0,19 \pm 0,096) + (0,99 \pm 0,01)x$.

O método apresentou precisão adequada pela análise do intervalo de tolerância a 95%, uma vez que para as concentrações testadas o intervalo está inserido dentro da faixa permitida ($\pm 15\%$) – Figura 27.

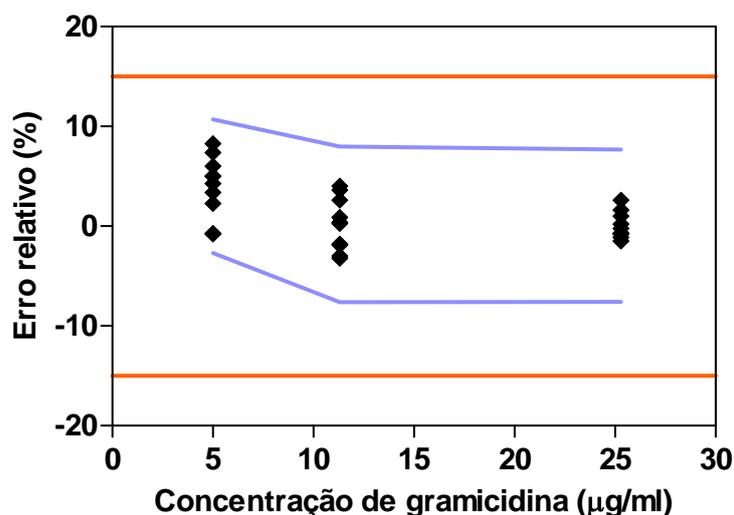


Figura 27. Gráfico de erro relativo versus concentração de gramicidina, com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho).

D Limite de detecção

O limite de detecção é a menor concentração de gramicidina que é possível detectar pelo método, mas não necessariamente quantificar. Desta forma, soluções de gramicidina a 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 µg/ml foram preparadas e aplicadas em placas submetidas às condições de doseamento. Além disso, também foram preparadas placas com cilindros contendo polissorbato 80 1% sem antibiótico (branco).

A média corrigida do diâmetro dos halos de inibição para as diferentes soluções, inclusive o branco, foi calculada (Tabela 21). Verificou-se que a diferença entre essas médias foi significativa e a menor concentração de gramicidina que produziu halos de diâmetro maior que o obtido com o diluente, isto é, que apresentou atividade antimicrobiana detectável pelo método foi igual a 2,00 µg/ml. Portanto, a concentração de 2,00 µg/ml foi determinada como limite de detecção do método desenvolvido.

Tabela 21. Média das médias corrigidas do diâmetro dos halos de inibição \pm dp obtida para polissorbato 80 1% e soluções de gramicidina a 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 µg/ml (n=3).

Diâmetro médio dos halos de inibição (mm)	Polissorbato 80 1% ⁽ⁱ⁾	Concentração de gramicidina em polissorbato 80 1%			
		1,00	2,00	3,00	4,00
	7,49 \pm 0,16	7,37 \pm 0,42	8,89 \pm 0,30	9,21 \pm 0,19	10,33 \pm 0,26

⁽ⁱ⁾ Diluente sem antibiótico.

E Limites de quantificação

✓ Limite de quantificação inferior

Para determinação do limite de quantificação inferior, soluções de gramicidina padrão a 2,00; 3,00; 4,00 µg/ml foram dosadas pelo método desenvolvido empregando o delineamento 5x1. A potência e o intervalo de confiança a 95 % para cada solução foram calculados.

Para avaliar a exatidão dos resultados obtidos, consideraram-se como exatas as potências que estavam inseridas no intervalo de 85 a 115 % do valor teórico. Assim, verificou-se que as soluções a 2,00; 3,00 e 4,00 µg/ml não cumpriram o critério especificado (Tabela 22). Além disso, avaliou-se a variação dos resultados obtidos

em dois dias diferentes pelo cálculo do DPR, que foi menor que 15% apenas para concentração de 4,00 µg/ml. Contudo, nesta concentração os resultados não foram exatos. Como já discutido nos itens *Precisão* e *Exatidão* para o delineamento 5x1, o doseamento de soluções a 5,00 µg/ml produzem resultados precisos (DPR<15 %) e exatos (potência calculada entre 85 a 115 % do valor teórico) – Tabelas 19 e 20. Em vista disso, a concentração de 5,00 µg/ml foi determinada como limite de quantificação inferior.

Tabela 22. Valores de potências percentuais, concentração calculada e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação inferior (n=2).

Dias	Concentração teórica de gramicidina (µg/ml)	Potência (%)	Concentração calculada (µg/ml)	DPR (%)	Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (µg/ml)
1	2,00	58,59	1,17	24,60	1,70 a 2,30
2		83,27	1,67		
1	3,00	39,17	1,18	16,98	2,55 a 3,45
2		49,86	1,50		
1	4,00	143,05	5,72	5,57	3,40 a 4,60
2		154,79	6,19		

✓ Limite de quantificação superior

Para determinação do limite de quantificação superior, avaliaram-se a exatidão e precisão dos resultados de potência de soluções de gramicidina padrão a 28,0; 30,0; 32,0 e 35,0 µg/ml. Verificou-se que as potências determinadas para as soluções de 28,0 a 35,0 µg/ml estavam bem abaixo do valor real (Tabela 23), não apresentando a exatidão necessária. Em relação à variabilidade dos resultados, foi avaliado o desvio padrão relativo calculado para cada concentração, sendo que para as soluções a 30,0 e 32,0 µg/ml o valor deste parâmetro foi inferior a 15 %, apresentando precisão adequada. Contudo, os resultados para as soluções de 28,0 e 32,0 não apresentaram exatidão. Portanto, a solução de 25,3 µg/ml foi definida como limite de quantificação superior, uma vez que pode ser quantificada com precisão e exatidão como discutido nos itens *Precisão* e *Exatidão* para o delineamento 5x1 (Tabelas 19 e 20).

Tabela 23. Valores de potências percentuais, concentração calculada e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação superior.

Dias	Concentração teórica de gramicidina ($\mu\text{g/ml}$)	Potência (%)	Concentração calculada ($\mu\text{g/ml}$)	DPR (%)	Intervalo de 85 a 115% do valor teórico ($\mu\text{g/ml}$)
1	28,0	79,81	22,35	15,51	23,8 a 32,2
2		64,03	17,93		
1	30,0	63,07	18,92	4,42	25,5 a 34,5
2		59,25	17,78		
1	32,0	62,95	20,14	2,83	27,2 a 36,8
2		60,48	19,35		
1	35,0	79,61	27,86	23,02	29,8 a 40,3
2		57,32	20,06		

F Robustez

Os resultados dos métodos analíticos podem variar por uma série de fatores, o que afetaria a sua reprodutibilidade. Assim, deve-se avaliar a robustez do método, isto é, a sua capacidade em resistir a pequenas variações (AGÊNCIA..., 2003; INTERNATIONAL..., 1996).

No caso do doseamento microbiológico, variações de pH e da composição do meio de cultura podem alterar o diâmetro do halo de inibição (HEWITT, 2007; KAVANAGH, 1963). Desta forma, testaram-se alterações nesses fatores.

✓ *Varição do pH do meio de cultura*

Nas placas preparadas com ágar nutriente pH 6 foram observados halos menos nítidos devido ao crescimento escasso do microrganismo teste. No entanto, foi possível medir o seu diâmetro. Em relação às placas com ágar nutriente pH 8 o microrganismo apresentou um crescimento mais abundante quando comparado com ágar nutriente pH 7 e 6, tornando os halos mais bem definidos.

Em ambos os meios (pH 6 e 8), a regressão entre a média corrigida dos diâmetros dos halos de inibição e o logaritmo da concentração foi significativa e o modelo linear adequado. Além disso, verificou-se que essas retas são paralelas e que halos

menores foram obtidos quando o pH do meio foi acertado para 6 ou 8 comparado aos obtidos com pH 7 (Figura 28).

Assim, o pH do meio de cultura é um fator crítico para realização do doseamento, devendo estar ajustado a um valor de 7 para melhor performance do método.

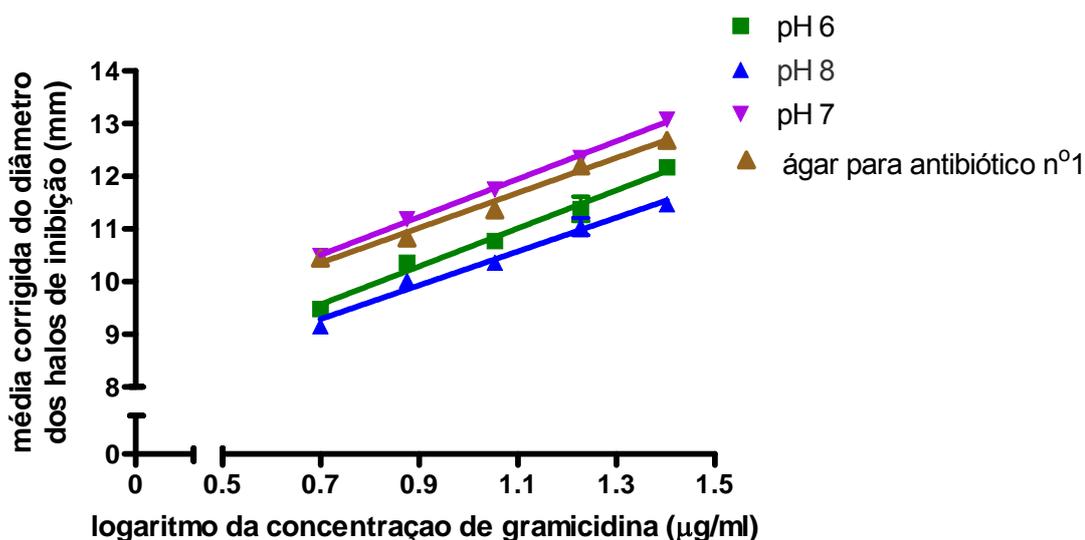


Figura 28. Logaritmo da concentração de gramicidina versus média corrigida do diâmetro dos halos de inibição, empregando inóculo a 0,1% de *K. rhizophila*, soluções de gramicidina de 5,00 a 25,3 µg/ml em polissorbato 80 1%. Camadas base e superfície de ágar nutriente pH 6 $y = (7,05 \pm 0,27) + (3,61 \pm 0,25)x$; ágar nutriente pH 8 $y = (7,05 \pm 0,22) + (3,21 \pm 0,20)x$; ágar nutriente pH 7 $y = (7,99 \pm 0,10) + (0,59 \pm 0,09)x$; camada base com ágar para antibióticos nº1 $y = (8,04 \pm 0,20) + (3,32 \pm 0,19)x$.

✓ **Varição do meio de cultura da camada base**

Foi avaliada a influência da utilização de diferentes meios de cultura como camada base, entre eles os meios A, B e C que apresentavam a mesma composição do ágar nutriente, diferenciando somente pela peptona. Em A, empregou-se a triptona que consiste no hidrolisado enzimático de caseína (fosfoproteínas do leite) obtido por ação da tripsina. O casamino, presente em B, é um hidrolisado ácido de caseína. A principal diferença entre essas peptonas de caseína é que o processo ácido leva à hidrólise completa da proteína produzindo aminoácidos e outros compostos químicos simples. No entanto, a hidrólise enzimática produz principalmente peptídeos. Em C, utilizou-se a lactalbumina, hidrolisado enzimático das proteínas do

soro do leite, composto principalmente por peptídeos, aminoácidos, carboidratos simples e complexos (ZIMBRO e POWER, 2003). Foi verificada a ausência de crescimento do microrganismo teste quando esses meios foram empregados.

Quando o ágar para antibiótico nº1 foi utilizado como camada base, verificou-se um maior crescimento do microrganismo teste quando comparado com o ágar nutriente. Contudo, os halos apresentaram bordas menos definidas. A regressão entre a média corrigida do diâmetro dos halos e o logaritmo da concentração foi significativa e o modelo linear adequado. Além disso, verificou-se paralelismo entre a curva analítica obtida com o emprego de ágar nutriente como camadas base e superfície e a resultante com o ágar antibiótico nº1 como camada base, que produziu halos menores (Figura 28).

A camada base (não inoculada) não serviria apenas como suporte para camada superfície (inoculada), mas sim, como fonte de nutrientes para o microrganismo teste. Desta forma, haveria difusão de nutrientes da camada base para superfície favorecendo o crescimento do microrganismo. Tal hipótese pode ser confirmada com a observação de um crescimento mais abundante de *K. rhizophila* nas placas em que se utilizou como camada base o ágar para antibiótico nº1, que é mais rico nutricionalmente que o ágar nutriente. Em relação aos demais meios (A, B e C), a ausência de crescimento pode ter ocorrido por incapacidade do microrganismo em metabolizar os nutrientes (como no caso de B, em que uma das fontes de nitrogênio é de aminoácidos) ou então por dificuldade de difusão da molécula (no caso de nutrientes mais complexos).

6.5 Doseamento de gramicidina matéria-prima empregando o método de difusão em ágar nutriente

A Delineamento 3x3

Foram realizados cinco doseamentos de gramicidina matéria-prima empregando o método desenvolvido e o delineamento 3x3 (Figura 29). A potência, parâmetros de validade do ensaio (paralelismo, desvio de linearidade e regressão significativa) e o limite de confiança a 95% foram calculados para cada doseamento (Tabela 24)

utilizando as equações 1 a 13 do ANEXO A. Todos os ensaios apresentaram os parâmetros de validade necessários (APÊNDICE E).

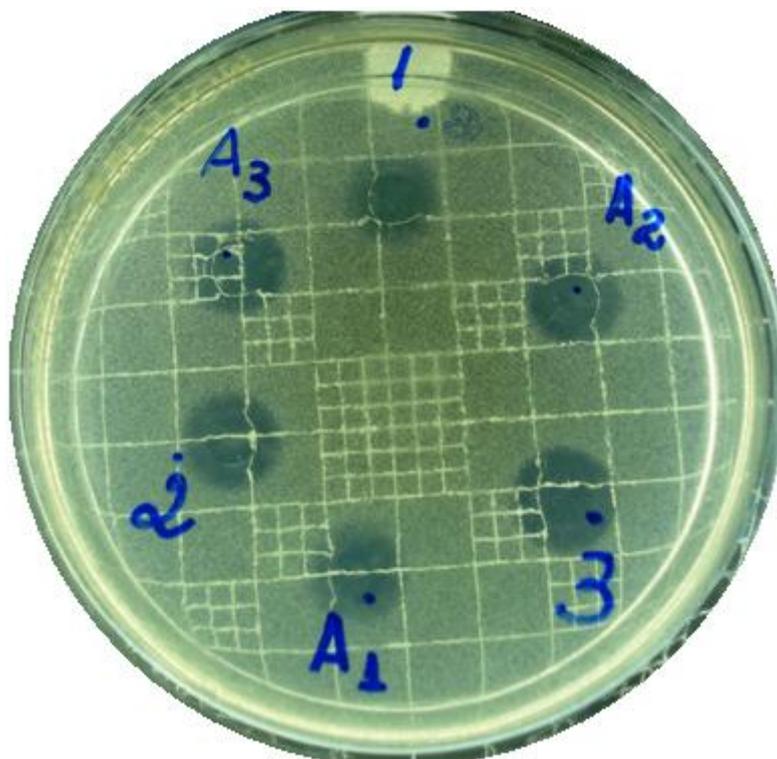


Figura 29. Placa utilizada no doseamento de gramicidina matéria-prima, sendo 1,2,3 os halos correspondentes às soluções de gramicidina padrão a 5,00; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Os halos A_1 , A_2 e A_3 referem-se às soluções de matéria-prima a 5,00; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Tabela 24. Valores de potência, limite de confiança a 95 % calculado e crítico para doseamento de gramicidina.

Doseamento	$n^{(i)}$	Potência (%)	LC_{inferior} (%)	LC_{superior} (%)	$LC_{\text{inferior}} \text{ crítico } (\%)^{(ii)}$	$LC_{\text{superior}} \text{ crítico } (\%)$
A	8	106,99	100,57	113,82	96,29	117,69
B	7	106,50	98,34	115,35	95,85	117,15
C	8	105,68	97,49	114,55	95,11	116,25
D	7	104,43	98,65	110,55	93,99	114,87
E	7	103,83	97,08	111,05	93,45	114,21

⁽ⁱ⁾ Para cada doseamento foram empregadas oito placas. No entanto, identificou-se um outlier, sendo esta placa não utilizada no cálculo de potência. Em alguns casos, o outlier foi justificado pela formação de halos com bordas irregulares decorrente do vazamento da solução presente no cilindro.

Os resultados de potência foram combinados a fim de obter uma estimativa de potência com intervalo de confiança reduzido. Os cálculos foram realizados segundo a farmacopéia internacional (INTERNACIONAL..., 1967), equações 35 a 39 do ANEXO A, sendo a potência combinada igual a 105,37% com intervalo de confiança a 95% de 102,34 a 108,49% (APÊNDICE G).

B Delineamento 5x1

Foram realizados cinco doseamentos de gramicidina matéria-prima empregando o método desenvolvido e o delineamento 5x1 (Figura 30). A potência e o limite de confiança a 95 % foram calculados (APÊNDICE F) para cada doseamento (Tabela 25).

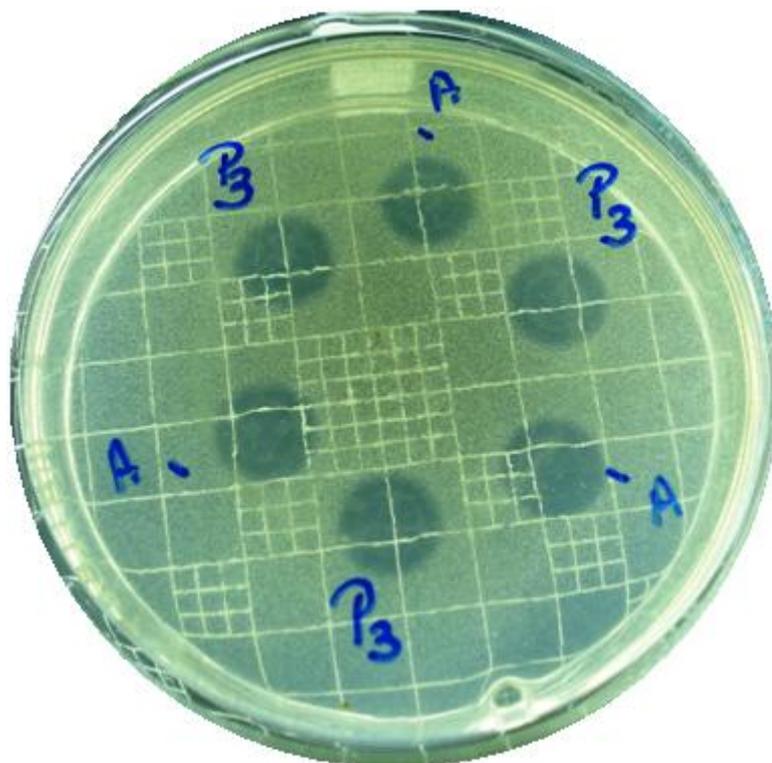


Figura 30. Placa utilizada no doseamento de gramicidina matéria-prima, sendo A correspondente aos halos da solução de matéria-prima a 11,3 µg/ml e P3 aos halos da solução padrão de referência a 11,3 µg/ml.

Tabela 25. Valores de potência e limite de confiança a 95 % calculado e crítico para doseamento de gramicidina.

Doseamento	Potência (%)	LC_{inferior} (%)	LC_{superior} (%)	LC_{inferior} crítico (%)	LC_{superior} crítico (%)
A	105,89	97,17	115,39	95,30	116,48
B	105,03	97,76	112,83	94,53	115,53
C	105,29	98,67	112,36	94,76	115,82
D	106,53	100,03	113,46	95,88	117,19
E	103,10	95,82	100,94	92,79	113,42

Os resultados de potência também foram combinados, sendo a potência igual a 105,22% com intervalo de confiança a 95% de 102,27 a 108,25% (APÊNDICE G).

C Comparação entre os delineamentos: retas paralelas 3x3 e 5x1

Foram propostos dois delineamentos para o doseamento de gramicidina pelo método de difusão em ágar: retas paralelas 3x3 e 5x1. Para determinar o delineamento mais preciso, as variâncias dos dois foram comparadas por meio do teste de F (INSTITUTO..., 2003). O erro deste teste estatístico aumenta quando a variável não segue a distribuição normal. Desta forma aplicou-se o teste de Ryan-Joiner e verificou-se a normalidade dos valores de potência para matéria-prima obtidos por ambos os delineamentos.

O teste de F demonstrou não existir diferença significativa entre as variâncias dos dois delineamentos, portanto, ambos apresentaram a mesma precisão.

6.6 Método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina segundo compêndios oficiais

Técnicas para doseamento microbiológico de matéria-prima de gramicidina, pelo método turbidimétrico, são descritas nas farmacopéias americana e britânica (THE UNITED..., 2008 e BRITISH..., 2007). Esses procedimentos foram realizados no laboratório com o objetivo de comparar seus resultados com os obtidos pelo método de difusão em ágar desenvolvido.

A Método segundo farmacopéia americana (THE UNITED..., 2008)

✓ Padronização do inóculo

Foram testadas diferentes concentrações do microrganismo (0,5 a 2,0%) para se obter uma turvação de no mínimo 0,35 unidade de absorvância a 580 nm. O inóculo a 0,75% apresentou a absorvância indicada em um tempo de incubação de aproximadamente 3 horas, sendo escolhido para realização do ensaio.

Para o inóculo de 0,5%, foi necessário um tempo de incubação de mais de 5 horas para produzir a absorvância requerida. Já os inóculos mais concentrados (0,85 a 2,0%), o tempo de incubação foi bem menor que 3 horas (em torno de 1 hora e 30 minutos). O tempo requerido é indicado estar entre 3 a 5 horas

✓ Obtenção da curva analítica

Soluções de gramicidina na faixa de 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$ foram preparadas em álcool etílico 95%, empregando uma relação de 1,25 entre as concentrações adjacentes. Utilizou-se meio para antibióticos n^o3 com inóculo a 0,75 % de *E. hirae*.

A análise de regressão demonstrou não ser significativa a regressão entre a absorvância a 580 nm e o logaritmo da concentração do antimicrobiano (Tabela 26).

Tabela 26. Valores médios de absorvância (unidade de absorvância) \pm dp obtidos para *E. hirae* em meio n^o3, utilizando soluções de gramicidina 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$ (n=3) e tempo de incubação de 2h30min.

Concentrações de gramicidina ($\mu\text{g/ml}$)					Branco inoculado ⁽ⁱ⁾
0,028	0,034	0,04	0,048	0,057	
0,402 \pm 0,011	0,427 \pm 0,013	0,416 \pm 0,016	0,407 \pm 0,021	0,409 \pm 0,025	0,402 \pm 0,012

⁽ⁱ⁾ Tubo contendo 9 ml de meio de cultura inoculado e 100 μl de álcool etílico 95%.

A absorvância obtida para os tubos contendo as diferentes soluções de gramicidina e para o branco inoculado (sem gramicidina) foi comparada e não foi verificada diferença significativa entre elas. Desta forma, a gramicidina não apresentou atividade antimicrobiana contra o *E. hirae* na faixa de concentração empregada

(0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$), uma vez que o crescimento microbiano nos tubos contendo antibiótico não diferiu daquele sem antimicrobiano.

Devido à obtenção de resultados não satisfatórios com o método preconizado pela farmacopéia americana, testou-se o método descrito na farmacopéia britânica.

B Método segundo farmacopéia britânica (BRITISH..., 2007)

✓ Obtenção da curva analítica

Segundo a farmacopéia britânica, tanto *S. aureus* quanto *E. hirae* podem ser utilizados como microrganismo teste. Assim, soluções de gramicidina na faixa de 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$ foram preparadas em tampão n°2 e ensaiadas em caldo para antibiótico n°3 para ambos os microrganismos (inóculo de 0,75%). A faixa de concentração utilizada foi a mesma descrita pela farmacopéia americana, uma vez que a concentração de trabalho não foi definida na farmacopéia britânica.

Os dados obtidos para ambos os microrganismos foram analisados e verificou-se não haver regressão significativa entre a absorvância e o logaritmo da concentração e nem diferença entre o crescimento microbiano nos tubos contendo ou não o antibiótico em diferentes concentrações para ambos os microrganismos (Tabela 27). Portanto, a gramicidina não apresentou ação antimicrobiana, na faixa de concentração de 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$, contra *S. aureus* e *E. hirae*.

Tabela 27. Valores médios de absorvância \pm dp obtidos para *S. aureus* e *E. hirae* em meio n°3, utilizando soluções de gramicidina 0,028 a 0,057 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).

Concentrações de gramicidina ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância para os diferentes microrganismos	
	<i>S. aureus</i> ⁽ⁱ⁾	<i>E. hirae</i> ⁽ⁱ⁾
0,028	0,395 \pm 0,016	0,477 \pm 0,013
0,034	0,403 \pm 0,015	0,481 \pm 0,027
0,04	0,410 \pm 0,032	0,467 \pm 0,057
0,048	0,446 \pm 0,036	0,457 \pm 0,029
0,057	0,421 \pm 0,038	0,463 \pm 0,041
Branco inoculado	0,426 \pm 0,039	0,490 \pm 0,024

⁽ⁱ⁾Tempo de incubação de 5h5min para *S. aureus* e 3h20 para *E. hirae*.

Considerando a ausência de atividade antimicrobiana da gramicidina nas concentrações ensaiadas, uma ampla faixa foi testada para determinação do intervalo em que a absorvância é função linear do logaritmo da concentração. Contudo, os ensaios foram realizados apenas com *E. hirae*, uma vez que ao se comparar o tempo de incubação dos dois microrganismos testados sob mesmas condições, verificou-se que o *S. aureus* necessitou de um maior tempo (5h5) para alcançar a turvação requerida que o *E. hirae* (3h20). Além disso, estudos de Reedy e Wolfson (1950) demonstraram a alta sensibilidade do *E. hirae* a gramicidina.

6.7 Desenvolvimento do método turbidimétrico para doseamento microbiológico de gramicidina

A Emprego do meio de cultura para antibióticos nº3

✓ Adequação das concentrações de gramicidina a serem utilizadas na curva analítica

Foram preparadas, em tampão nº2 e álcool etílico a 95%, soluções de gramicidina no intervalo de 0,01 a 2,56 µg/ml testadas em caldo para antibiótico nº3 com inóculo de *E. hirae* a 0,75%.

A análise de regressão linear dos dados, tanto para ensaio com o álcool quanto para o tampão nº2, demonstrou não ser significativa a regressão entre a absorvância e o logaritmo da concentração.

A atividade antimicrobiana da gramicidina nessa faixa de concentração também foi pesquisada por comparação dos tubos com as diferentes soluções de gramicidina e do branco inoculado (sem antimicrobiano). A diferença não significativa demonstrou a ausência de ação antimicrobiana da gramicidina na faixa de 0,01 a 2,56 µg/ml, contra *E. hirae* testada em caldo nº3.

Considerando o fato de que peptonas podem interferir na atividade da gramicidina, testou-se outro meio de cultura com diferente composição.

B Emprego do meio GCLT

✓ Seleção do diluente

Estudos comprovaram que a atividade da gramicidina é parcialmente inibida por peptonas (DUBOS e HOTCHKISS, 1941; HOTCHKISS, 1944; LECLERCQ, 1968; REEDY e WOLFSON, 1949). Desta forma, desenvolveu-se uma formulação de meio de cultura, com baixo conteúdo de peptona, constituída por triptona, glicose, extrato de carne e extrato de levedura. A triptona é uma peptona obtida pela ação da tripsina sobre a caseína (fosfoproteínas do leite), cuja concentração no meio é igual a 1 g/l.

O meio desenvolvido foi testado empregando inóculo de *E. hirae* a 0,75% e soluções de gramicidina de 0,01 a 2,56 µg/ml preparadas tanto em tampão nº2 quanto em álcool etílico a 95%. A incubação foi feita a 37 °C por um período que permitisse que o tubo que continha a solução de gramicidina a 0,32 µg/ml atingisse, no mínimo, a absorvância de 0,35 a 580 nm, sendo esse período de 2h55 para o ensaio feito com álcool etílico e de 3h5 para o com tampão nº2.

Segundo Rippere (1979), quando se emprega uma ampla faixa de concentração de antibiótico em ensaio turbidimétrico, obtém-se uma curva sigmóide ao se plotar a absorvância em função do logaritmo da concentração (Figura 31). Assim, empregou-se a análise de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados para obtenção de um modelo que representasse melhor a relação entre a absorvância e o logaritmo da concentração.

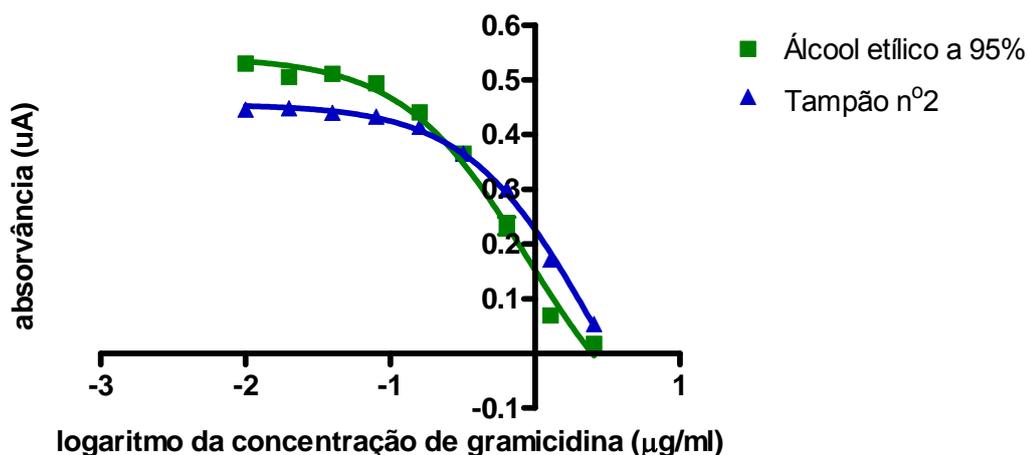


Figura 31. Logaritmo da concentração de gramicidina versus absorvância para *E. hirae* empregando tampão nº2 e álcool etílico a 95% como diluentes, inóculo a 0,75% e caldo GCLT (n=3).

O modelo foi avaliado segundo os critérios: adequação dos parâmetros calculados (bottom, top, logaritmo da concentração efetiva a 50% - log EC50) de acordo com a teoria e dados experimentais (equação 1 do ANEXO B); intervalo de confiança a 95% dos parâmetros; homoscedascidade, normalidade e independência dos resíduos e valor do coeficiente de determinação (r^2) – Tabela 28.

Tabela 28. Valores dos parâmetros da equação das sigmóides obtidas nos ensaios com tampão nº2 e álcool etílico a 95%.

Parâmetros		Ensaio	
		Álcool	Tampão nº2
bottom		-0,194	-0,348
top		0,542	0,455
log EC50		-0,05018	0,399
Intervalo de confiança a 95%	bottom	-0,264 a -0,125	-0,417 a -0,278
	top	0,526 a 0,558	0,451 a 0,460
	Log EC50	-0,1591 a 0,05873	0,3314 a 0,4667
Coeficiente de determinação (r^2)		0,9877	0,9976

Apesar dos elevados valores de coeficiente de determinação (0,9877 e 0,9976) para as duas séries de dados analisadas, o modelo não foi adequado.

Verificou-se pelos dados experimentais que a EC50 para o diluente álcool etílico a 95% estaria entre 0,32 e 0,64 µg/ml, diferente do encontrado pelo modelo (0,89 µg/ml). O mesmo foi verificado para o tampão n°2 sendo o valor calculado igual a 2,51 µg/ml e o prático entre 0,64 e 1,28 µg/ml.

A análise dos resíduos dos dois ensaios evidenciou que os mesmos apresentaram autocorrelação positiva para as duas séries analisadas, e heterogeneidade de variâncias no caso do álcool etílico (Figura 32).

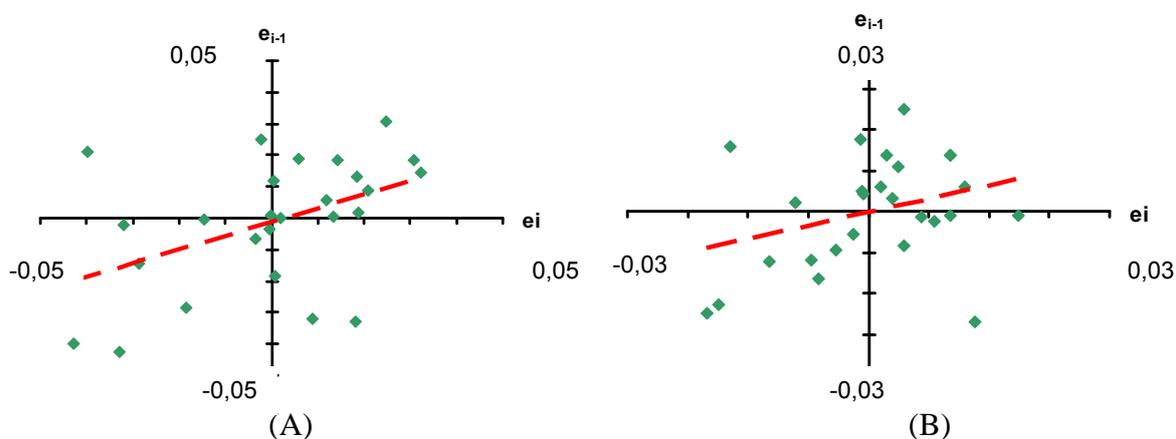


Figura 32. Gráfico de resíduos segundo modelo Durbin-Watson para dados obtidos utilizando como diluente álcool etílico a 95% (A) e tampão n°2 (B).

A homoscedasticidade, normalidade e independência de resíduos são requisitos necessários para que o método dos mínimos quadrados seja empregado na análise de regressão não linear. Portanto, a ausência de algum deles limita o método de ajuste.

A transformação das variáveis, como a realizada para a concentração de gramicidina (variável regressora) em logaritmo é bastante utilizada em ensaios de rotina, porém, pode ocasionar o não cumprimento de um ou mais dos requisitos (MONTGOMERY *et. al.*, 2001). Desta forma, plotou-se a absorvância em função da concentração diretamente sem transformação. Utilizou-se a análise de regressão polinomial quadrática ($y = a + bx + cx^2$) para o desenvolvimento do modelo que representasse essa relação (Figura 33). A ANOVA demonstrou ser significativa a regressão e que tanto o componente linear (b) quanto o quadrático (c) contribuem para o modelo. Além disso, a análise de resíduos mostrou homoscedasticidade, independência e normalidade dos resíduos. Assim, a regressão polinomial

quadrática foi adequada para representar a atividade da gramicidina utilizando os dois diluentes.

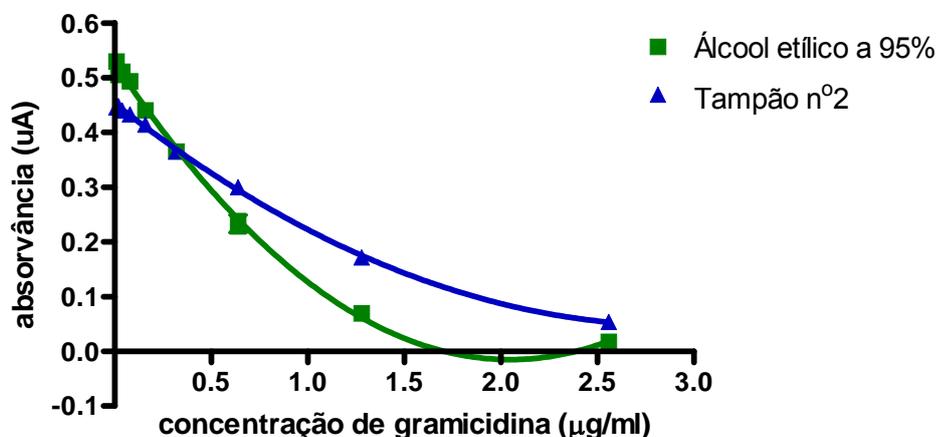


Figura 33. Concentração de gramicidina versus absorvância para *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95% $y = (0,527 \pm 0,004) + (-0,529 \pm 0,012) x + (0,129 \pm 0,005) x^2$; e tampão n°2 $y = (0,453 \pm 0,001) + (-0,278 \pm 0,004) x + (0,048 \pm 0,002) x^2$.

Para permitir a comparação entre a atividade da gramicidina em álcool etílico a 95% e em tampão n°2, a resposta foi transformada em porcentagem de inibição do crescimento, o que eliminou a interferência decorrente de uma possível diferença na concentração inicial de células do caldo inoculado empregado nos ensaios (Figura 34).

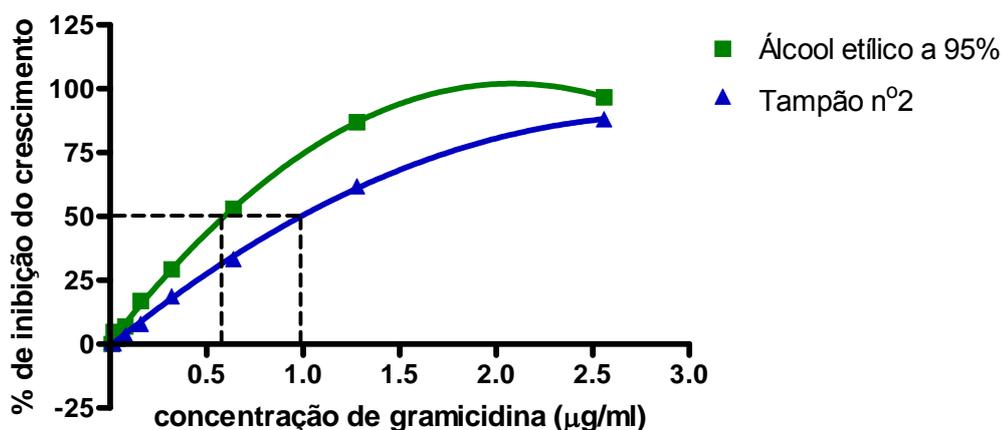


Figura 34. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento para *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95% $y = (0,56 \pm 0,44) + (97,36 \pm 1,40) x + (-23,36 \pm 0,55) x^2$; e tampão n°2 $y = (-0,76 \pm 0,27) + (61,84 \pm 0,87) x + (-10,59 \pm 0,34) x^2$.

Verificou-se por meio da análise de regressão polinomial quadrática (APÊNDICE H) que a regressão foi significativa e o modelo adequado para a porcentagem de inibição e a concentração. A comparação das duas curvas foi realizada e verificou-se diferença significativa entre elas, isto é, os coeficientes (a, b e c) foram diferentes.

A IC₅₀, concentração de gramicidina necessária para inibir 50% da população microbiana do tubo do branco inoculado (sem antibiótico), foi calculada, sendo 0,59 µg/ml para o ensaio utilizando o álcool etílico e 0,99 µg/ml com tampão n^o2. Sendo a IC₅₀ menor com a gramicidina diluída em álcool etílico pressupôs-se maior sensibilidade do método nessas condições. Contudo, tal fato poderia estar associado à ação antimicrobiana do álcool etílico presente nas soluções teste que se somaria a atividade da gramicidina, fazendo com que o valor de IC₅₀ fosse menor.

Ao se analisar os tubos inoculados com e sem álcool, não foi observada diferença significativa, portanto, o álcool etílico nas condições do ensaio não apresentou atividade contra o *E. hirae* sendo selecionado como diluente.

✓ Adequação das concentrações de gramicidina a serem utilizadas na curva analítica e determinação do tempo de incubação

Para determinação do intervalo de concentração em que há relação linear entre a absorvância e a concentração de gramicidina foi testada a faixa de 0,08 a 1,08 µg/ml definida a partir do perfil da Figura 35. Como o modelo polinomial adequado foi obtido sem transformação da variável regressora (concentração), uma relação aritmética foi usada no intervalo de concentração testado.

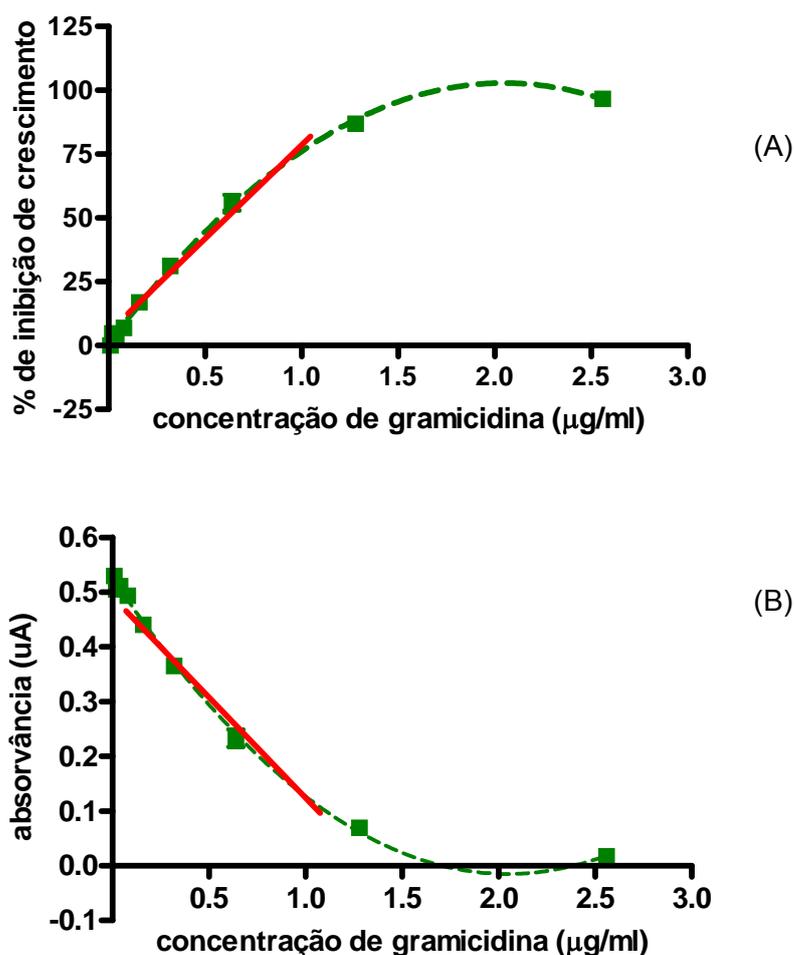


Figura 35. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento (A), concentração versus absorvância (B), inóculo de *E. hirae* a 0,75%, caldo GCLT e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 $\mu\text{g/ml}$ em álcool etílico a 95%. A reta vermelha delimita a faixa de concentração (0,08 a 1,08 $\mu\text{g/ml}$) em que possivelmente há uma relação linear com a absorvância (ou porcentagem de inibição do crescimento).

Para determinação do tempo de incubação adequado os intervalos de tempo foram definidos de acordo com os dados experimentais anteriores, cuja incubação durava em torno de 3h e com os dados da literatura que preconiza um máximo de incubação de 5h (THE UNITED..., 2008).

A análise de regressão linear indicou ser significativa a regressão entre a porcentagem de inibição de crescimento e a concentração em todos os períodos de incubação. Contudo, o modelo linear não foi adequado devido ao desvio de linearidade significativo.

Assim, para todos os tempos de incubação, analisou-se a faixa de concentração entre 0,08 e 0,88 $\mu\text{g/ml}$, cuja regressão foi significativa e o modelo linear adequado (homoscedasticidade, normalidade e independência de resíduos e desvio de linearidade, não significativo) – Figura 36.

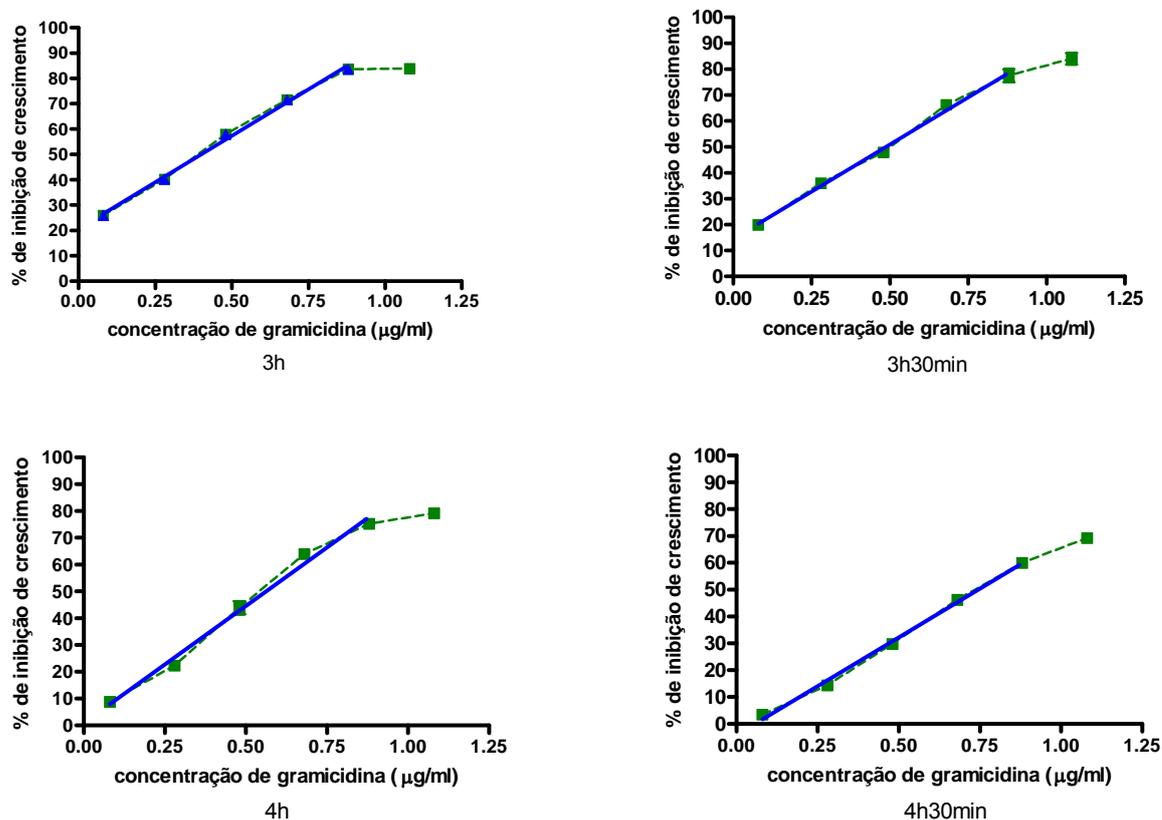


Figura 36. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento para, inóculo de *E. hirae* a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 1,08 $\mu\text{g/ml}$ em álcool etílico a 95% e diferentes tempos de incubação. O tracejado verde corresponde à faixa de concentração de 0,08 a 1,08 $\mu\text{g/ml}$, cujo modelo linear não foi adequado. Enquanto a reta azul corresponde ao intervalo em que há relação linear.

As retas obtidas nos diferentes tempos de incubação foram comparadas e verificou ser significativa a diferença entre elas. A reta obtida quando os tubos foram incubados por 4 horas apresentou maior inclinação que as demais (Figura 37). Isto significa que nessa condição há um aumento da sensibilidade do método, já que uma pequena variação na concentração de gramicidina promove uma maior variação na porcentagem de inibição. Desta forma, o período de incubação de 4 horas e a faixa de concentração de 0,08 a 0,88 $\mu\text{g/ml}$ foram as condições definidas para ensaios subsequentes.

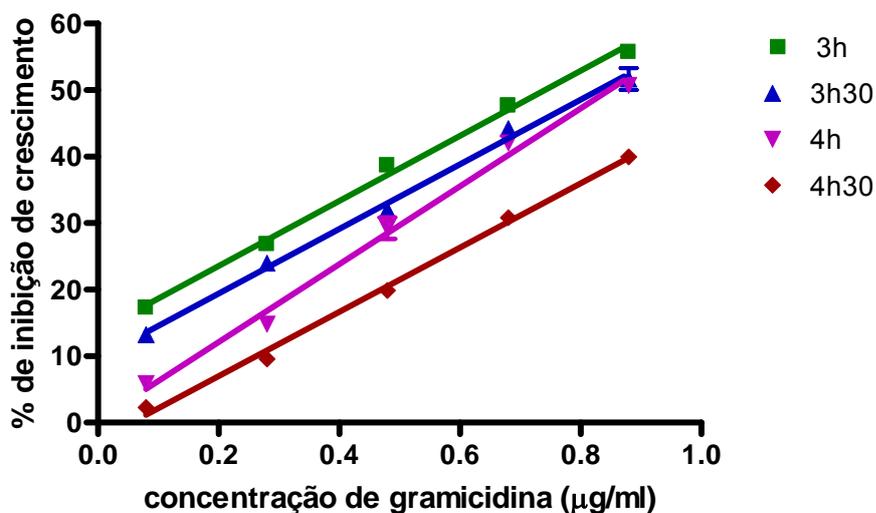


Figura 37. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento empregando inóculo de *E. hirae*, a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes tempos de incubação: 3h $y = (48,89 \pm 1,33)x + (13,77 \pm 0,74)$; 3h30min $y = (48,56 \pm 1,44)x + (9,71 \pm 0,80)$; 4h $y = (58,60 \pm 2,00)x + (0,39 \pm 1,02)$ e 4h30min $y = (48,32 \pm 1,26)x + (-2,68 \pm 0,70)$.

6.8 Validação do método turbidimétrico

Para garantir a confiabilidade dos resultados, o método desenvolvido foi validado por meio da avaliação dos parâmetros: curva analítica, exatidão, precisão, seletividade, robustez, limite de quantificação e detecção (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001; INSTITUTO..., 2003).

A Curva analítica

Por meio da curva analítica demonstra-se a existência de uma relação linear entre a resposta (porcentagem de inibição do crescimento) e a concentração do analito dentro de um determinado intervalo (U.S. FOOD..., 2001).

Como discutido no item 6.7, a faixa ótima de trabalho para a gramicidina foi de 0,08 a 0,88 µg/ml. Portanto, empregando essas concentrações e o caldo GCLT, quatro curvas foram obtidas, sendo duas no mesmo dia (avaliação intra-dia) e as demais

em dias diferentes (avaliação inter-dias). O modelo linear (APÊNDICE I) foi adequado para todas as curvas apresentando.

As quatro retas apresentaram coeficiente de correlação (r) superior a 0,98, conforme critério estabelecido pela resolução brasileira (AGÊNCIA..., 2003) – Tabela 29. Além disso, os resultados do coeficiente de determinação (r^2) indicam que mais de 90 % da variação da porcentagem de inibição do crescimento é explicada pela concentração do antimicrobiano.

Tabela 29. Parâmetros de linearidade (intercepto - a , inclinação - b , coeficiente de correlação - r e coeficiente de determinação - r^2) para as curvas analíticas de gramicidina na faixa de 0,08 a 0,88 $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$).

Retas	$a \pm dp$	$p^{(i)}$	$b \pm dp$	$p^{(ii)}$	r	r^2	n	nº de outlier
Dia 1 A	$-4,18 \pm 0,93$	0,001	$58,40 \pm 1,67$	0,000	0,995	0,990	15	0
Dia 1 B	$-3,82 \pm 1,61$	0,034	$55,78 \pm 2,89$	0,000	0,983	0,966	15 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	1
Dia 2	$-3,74 \pm 1,00$	0,002	$54,08 \pm 1,79$	0,000	0,993	0,986	15 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	1
Dia 3	$-4,76 \pm 1,12$	0,001	$58,30 \pm 2,01$	0,000	0,992	0,985	15	0

⁽ⁱ⁾ Significância do intercepto.

⁽ⁱⁱ⁾ Significância da inclinação.

⁽ⁱⁱⁱ⁾ Identificação de *outlier* que foi substituído pela média das réplicas do mesmo nível de concentração.

As duas retas obtidas em um mesmo dia de ensaio foram comparadas e as diferenças entre os interceptos e as inclinações não foram significativas. Resultado equivalente foi verificado quando se comparou as quatro retas obtidas nos três dias de ensaio (Figura 38 e APÊNDICE J).

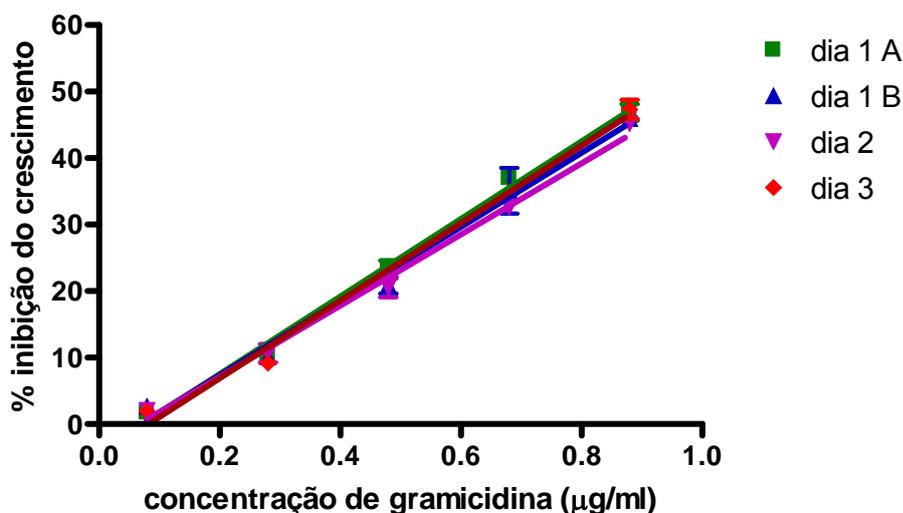


Figura 38. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e 4h de incubação. Dia 1 A e B são retas de um mesmo dia; dia 2 e 3 são retas obtidas em dias diferentes.

B Seletividade

A seletividade do método turbidimétrico consistiu em verificar se o microrganismo teste (*E. hirae*) era sensível ao produto de hidrólise da gramicidina em meio orgânico (secogramicidina).

Soluções do produto de hidrólise a 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml foram ensaiadas concomitantemente com soluções padrão de gramicidina de mesma concentração, empregando o delineamento 3x3. Os resultados de porcentagem de inibição obtidos para o padrão e o produto de degradação foram plotados em função da concentração (Figura 39), sendo que a inclinação da reta do produto de degradação não foi significativa, isto é, a porcentagem de inibição não foi alterada com o aumento da concentração. Desta forma, para verificar se o produto de hidrólise apresentava atividade contra *E. hirae* nas condições testadas, foram comparadas as leituras de absorvância referentes às soluções de secogramicidina e o branco inoculado (Tabela 30). Não foi observada diferença significativa entre elas, assim o produto de degradação não apresenta ação antimicrobiana contra *E. hirae* nas condições empregadas no método desenvolvido, não interferindo, portanto no doseamento da gramicidina.

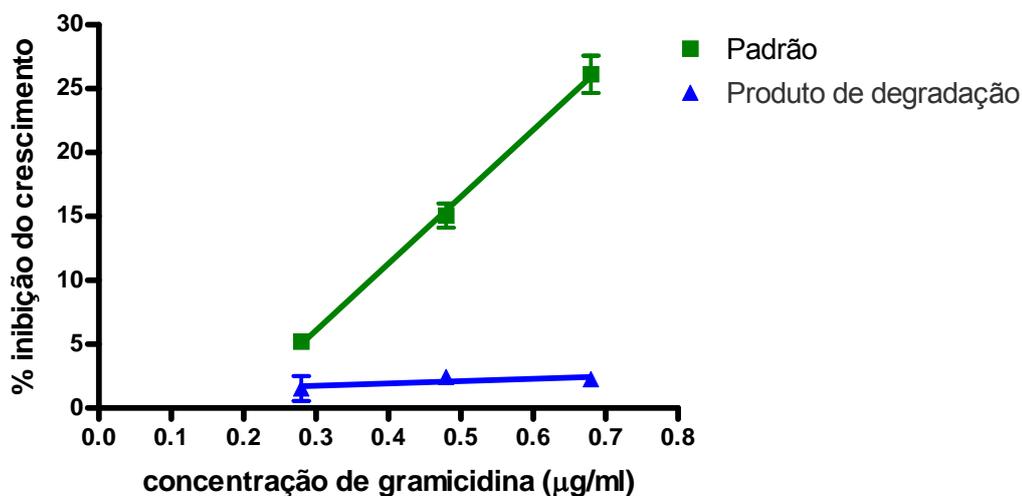


Figura 39. Concentração de gramicidina e de seu produto de degradação versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT, soluções padrão de gramicidina e de produto de degradação a 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml em álcool etílico a 95%. Curva do padrão: $(-9,64 \pm 1,71) + (52,30 \pm 3,36) x$; $n=3$.

Também se preparou solução do hidrolisado a 0,48 µg/ml para doseamento empregando o delineamento 5x1, no qual foi verificada novamente a ausência de atividade antimicrobiana do produto de degradação por comparação da absorvância da solução amostra com o branco inoculado.

Tabela 30. Leitura média de absorvância \pm dp obtida para branco inoculado e produto de degradação a 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml ($n=3$).

Absorvância	Branco inoculado ^(a)	Concentração de gramicidina em álcool etílico a 95%		
		0,28	0,48	0,68
	0,777 \pm 0,014	0,769 \pm 0,009	0,764 \pm 0,005	0,765 \pm 0,003

^(a) Caldo inoculado + álcool etílico a 95%.

Os doseamentos empregando ambos os delineamentos (3x3 e 5x1) foram realizados em dois dias consecutivos e os resultados obtidos foram equivalentes nos dois dias.

C Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias). Também se avaliou a exatidão dos resultados obtidos em um mesmo dia (intra-dia) e em dias diferentes (inter-dias), segundo os

parâmetros de guias nacionais e internacionais (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001). E foi realizada a avaliação de acordo com os conceitos introduzidos por Hubert e colaboradores (2007 a-b) e Rozet e colaboradores (2007).

Os delineamentos propostos para o método turbidimétrico foram os mesmos utilizados no método de difusão em ágar: retas paralelas 3x3 e o 5x1.

C.1 Delineamento 3x3

✓ *Repetibilidade e exatidão intra-dia*

Avaliaram-se a repetibilidade e exatidão intra-dia do método por meio de cinco determinações de potência em três níveis: baixo, médio e alto, respectivamente, 80, 100 e 120% da potência nominal. Em todos eles foram verificados os parâmetros de paralelismo entre as retas do padrão e da amostra, significância da regressão e desvio de linearidade não significativo. Também apresentaram a precisão requerida, a qual foi avaliada pelo intervalo de confiança a 95% (APÊNDICE K).

A Tabela 31 apresenta os valores de precisão e exatidão intra-dia obtidos para os diferentes níveis de gramicidina (80, 100 e 120 %).

Tabela 31. Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão intra-dia de gramicidina em três níveis de concentração.

Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
	80%	100%	120%
1	78,80 73,03 – 84,56	101,62 95,04 – 108,20	118,68 114,57 – 122,80
2	82,66 78,83 – 86,50	101,89 95,57 – 108,22	120,70 110,18 – 131,22
3	82,50 ⁽¹⁾ 76,23 – 88,77	101,58 95,94 – 107,22	119,65 115,79 – 123,50
4	84,85 79,42 – 90,28	101,43 96,01 – 106,85	119,12 ⁽¹⁾ 113,44 – 124,80
5	84,79 80,84 – 88,73	101,80 96,08 – 107,51	121,48 ⁽¹⁾ 118,21 – 124,75
Potência média (%)	82,72	101,66	119,93
DPR (%)	2,71	0,18	0,98
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (%)	68,0 - 92,0%	85,0 – 115,0%	102,0 – 138,0%

⁽¹⁾ Foi identificado um *outlier* que foi substituído pela média das réplicas do mesmo nível de concentração.

Valores de desvio padrão relativo foram muito abaixo de 15% indicando que o método desenvolvido apresenta precisão intra-dia adequada. A exatidão intra-dia também foi adequada, uma vez que o valor médio da potência determinada está entre 85 e 115 % do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ **Precisão intermediária e exatidão inter-dias**

Os ensaios realizados para avaliação da precisão inter-dias foram válidos e os resultados estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Valores de potências percentuais, potências médias e desvio padrão relativo para precisão e exatidão inter-dias de gramícidina em três diferentes níveis de concentração.

Dias	Amostra	Potência (%)		
		80%	100 %	150 %
1	1	78,80 73,03 – 84,56	101,62 95,04 – 108,20	118,68 114,57 – 122,80
	2	82,66 78,83 – 86,50	101,89 95,57 – 108,22	120,70 110,18 – 131,22
	3	82,50 ⁽¹⁾ 76,23 – 88,77	101,58 95,94 – 107,22	119,65 115,79 – 123,50
	4	84,85 79,42 – 90,28	101,43 96,01 – 106,85	119,12 ⁽¹⁾ 113,44 – 124,80
	5	84,79 80,84 – 88,73	101,80 96,08 – 107,51	121,48 ⁽¹⁾ 118,21 – 124,75
2	1	81,75 74,53 – 88,97	101,01 96,08 – 105,94	118,52 113,27 – 123,76
	2	83,97 ⁽¹⁾ 78,09 – 89,86	100,43 95,71 – 105,16	123,81 117,03 – 130,59
	3	78,12 72,24 – 83,99	100,49 97,20 – 103,77	119,42 110,11 – 128,74
	4	78,64 74,01 – 83,26	100,35 97,44 – 103,26	120,76 115,05 – 126,47
	5	80,73 73,96 – 87,50	99,97 96,83 – 103,10	123,53 114,94 – 132,12
Potência média (%)		81,68	101,06	120,57
DPR (%)		3,10	0,69	1,57
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (%)		68,0 - 92,0%	85,0 – 115,0%	102,0 – 138,0%

⁽¹⁾ Foi identificado um *outlier* que foi substituído pela média das réplicas do mesmo nível de concentração.

Valores de desvio padrão relativo abaixo de 15% indicam que o método desenvolvido apresenta precisão intermediária adequada. Em relação à exatidão

inter-dias, os valores médios de potência estão de acordo com o critério de validade: valor médio da potência entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

✓ **Veracidade e exatidão**

A avaliação da veracidade foi realizada pela análise do gráfico de valores verdadeiros de potência (80, 100 e 120%) *versus* os resultados obtidos experimentalmente em cada nível. Na Figura 40, o intercepto da reta experimental é igual a 4,023, contudo seu intervalo de confiança a 95% inclui o valor zero (-0,16 a 8,21). Desta forma, não existe evidência de que o valor do intercepto seja diferente de zero. Em relação à inclinação, o intervalo de confiança inclui o valor um (0,929 a 1,012), logo a inclinação não é diferente de um. Em vista disso, os resultados obtidos nos doseamentos realizados não apresentaram erros sistemáticos (*bias*) fixos e nem relativos.

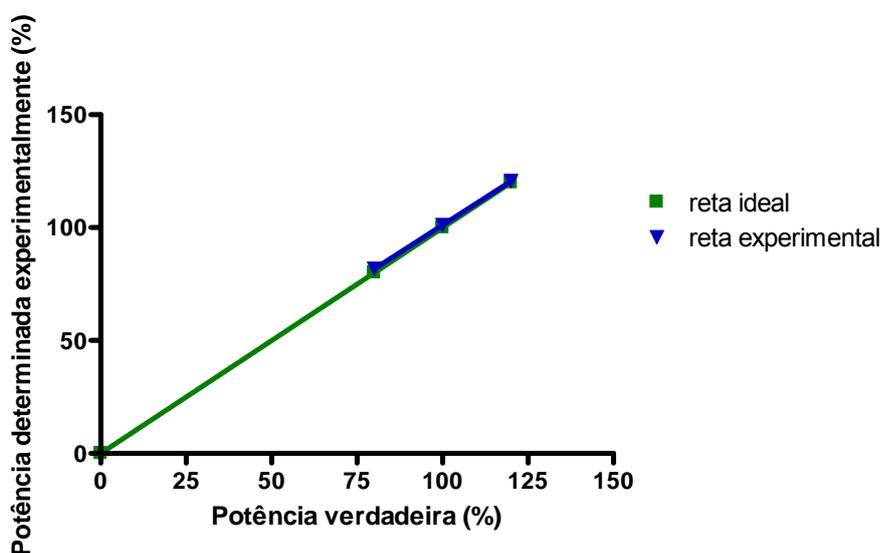


Figura 40. Gráfico de potência verdadeira versus potência determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (4,02 \pm 2,04) + (0,97 \pm 0,02)x$.

Para avaliação da exatidão, o β -intervalo de tolerância foi calculado a um nível de significância de 5%. O método foi considerado exato, já que o intervalo de

tolerância, para todas as concentrações ensaiadas, está inserido no limite de variação permitido de $\pm 15\%$ (Figura 41).

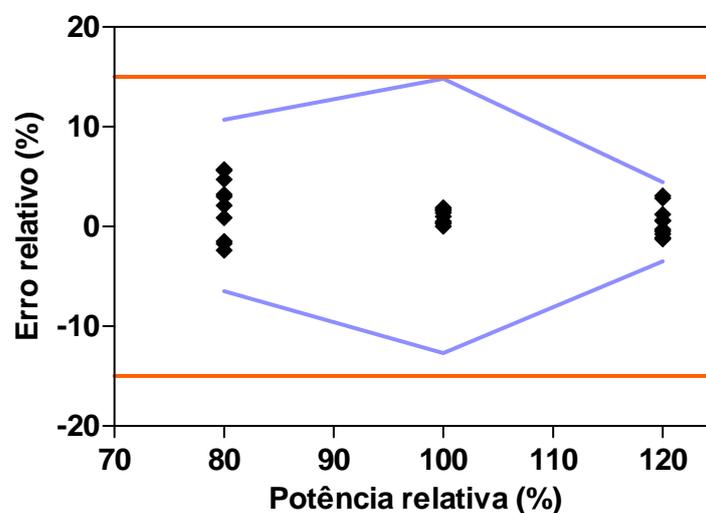


Figura 41. Gráfico de erro relativo versus potência relativa, com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho).

C.2 Delineamento 5x1

✓ *Repetibilidade e exatidão intra-dia*

Avaliaram-se a repetibilidade e a exatidão do método pelo delineamento 5x1 por meio do doseamento das soluções a 0,08; 0,48 e 0,88 $\mu\text{g/ml}$.

Três curvas foram traçadas e todas apresentaram regressão significativa, normalidade, independência dos resíduos, homoscedasticidade e desvio de linearidade não significativo (APÊNDICE L).

Os valores de precisão e exatidão intra-dia, obtidos para as diferentes concentrações de gramicidina (Tabela 33), se encontram de acordo com os critérios de validade: desvio padrão relativo em cada nível abaixo de 15% e valor médio da potência entre 85 e 115% do valor teórico (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

Tabela 33. Valores de potências e intervalo de confiança percentuais, potências médias e desvio padrão relativo para precisão intra-dia de gramicidina em três concentrações.

Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
	0,08 µg/ml	0,48 µg/ml	0,88 µg/ml
1	97,57 93,53 – 101,60	101,64 92,66 – 110,62	97,34 92,38 – 102,30
2	96,93 92,81 – 101,05	98,59 ⁽ⁱ⁾ 90,44 – 106,75	100,65 94,92 - 106,38
3	100,42 94,29 – 106,55	101,07 ⁽ⁱ⁾ 93,12 – 109,01	102,15 ⁽ⁱⁱ⁾ 96,45 – 107,86
4	98,87 91,13 – 106,61	105,07 ⁽ⁱⁱ⁾ 96,62 – 113,51	98,61 93,34 – 103,88
5	101,98 96,87 – 107,08	102,64 ⁽ⁱ⁾ 94,67 – 110,60	97,19 ⁽ⁱⁱ⁾ 91,90 – 102,48
Potência média (%)	99,15	101,80	99,19
Concentração determinada (µg/ml)	0,079	0,489	0,873
DPR (%)	1,91	2,32	2,18
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (µg/ml)	0,068 – 0,092	0,408 – 0,552	0,748 – 1,012

⁽ⁱ⁾ Identificado a presença de um *outlier*, o qual foi substituído pela média das demais leituras da mesma concentração.

⁽ⁱⁱ⁾ Ocorreu a perda de um dado na amostra, pois o volume de formaldeído a 12% adicionado ao tubo foi superior a 0,5 ml. O valor foi repostado pela média das demais réplicas da mesma concentração.

✓ **Precisão intermediária e exatidão inter-dias**

Para os ensaios realizados para avaliação da precisão e exatidão inter-dias calculou-se o intervalo de confiança a 95% para a potência que apresentou a variação permitida em todos os ensaios. Também as curvas analíticas apresentaram os requisitos necessários.

Na Tabela 34 estão apresentados os valores de precisão e exatidão inter-dias obtidos para as concentrações de gramicidina trabalhadas.

Tabela 34. Valores de potências e intervalo de confiança a 95% percentuais, potências médias e desvio padrão relativo para precisão inter-dias de gramicidina em três concentrações.

Dias	Amostra	Potência e intervalo de confiança a 95% (%)		
		0,08 µg/ml	0,48 µg/ml	0,88 µg/ml
1	1	97,57 93,53 – 101,60	101,64 92,66 – 110,62	97,34 92,38 – 102,30
	2	96,93 92,81 – 101,05	98,59 ⁽ⁱⁱ⁾ 90,44 – 106,75	100,65 94,92 – 106,38
	3	100,42 94,29 – 106,55	101,07 ⁽ⁱⁱ⁾ 93,12 – 109,01	102,15 ⁽ⁱⁱⁱ⁾ 96,45 – 107,86
	4	98,87 91,13 – 106,61	105,07 ⁽ⁱⁱⁱ⁾ 96,62 – 113,51	98,61 93,34 – 103,88
	5	101,98 96,87 – 107,08	102,64 ⁽ⁱⁱ⁾ 94,67 – 110,60	97,19 ⁽ⁱⁱⁱ⁾ 91,90 – 102,48
2	1	100,07 ⁽ⁱ⁾ 90,67 – 109,47	103,68 97,22 – 110,14	98,68 ⁽ⁱⁱ⁾ 93,65 – 103,71
	2	106,36 ⁽ⁱ⁾ 96,69 – 116,04	101,75 94,69 – 108,80	104,64 ⁽ⁱⁱ⁾ 92,07 – 102,20
	3	97,27 ⁽ⁱ⁾ 87,48 – 107,06	97,50 91,90 – 103,11	105,19 ⁽ⁱⁱ⁾ 100,00 – 110,37
	4	102,17 ⁽ⁱ⁾ 92,37 – 111,97	97,73 91,90 – 103,56	101,21 ⁽ⁱⁱ⁾ 95,43 – 107,00
	5	104,96 ⁽ⁱ⁾ 95,28 – 114,64	101,00 95,33 – 106,68	99,68 94,91 – 104,46
Potência média (%)		100,66	101,84	100,53
Concentração determinada (µg/ml)		0,081	0,489	0,885
DPR (%)		3,22	2,47	2,79
Intervalo de 85 a 115% do valor teórico (µg/ml)		0,068 – 0,092	0,408 – 0,552	0,748 – 1,012

⁽ⁱ⁾ Identificado um *outlier* na curva analítica devido à adição de volume de formaldeído a 12% superior a 0,5 ml ao tubo.

⁽ⁱⁱ⁾ Identificado a presença de um *outlier*, o qual foi substituído pela média das demais leituras da mesma concentração.

⁽ⁱⁱⁱ⁾ Ocorreu a perda de um dado na amostra, pois o volume de formaldeído a 12% adicionado ao tubo foi superior a 0,5 ml. O valor foi repostado pela média das demais réplicas da mesma concentração.

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 15 % e os valores médios de potência entre 85 e 115% do valor teórico indicam, respectivamente, que o método desenvolvido apresenta precisão intermediária e exatidão inter-dias adequados.

✓ **Veracidade e exatidão**

Para reta experimental da Figura 42, o intervalo de confiança para o intercepto inclui

o valor zero (-0,01 a 0,01) e para a inclinação inclui o valor um (0,99 a 1,03). Portanto, não há evidência da presença de *bias* fixos ou relativos nos resultados.

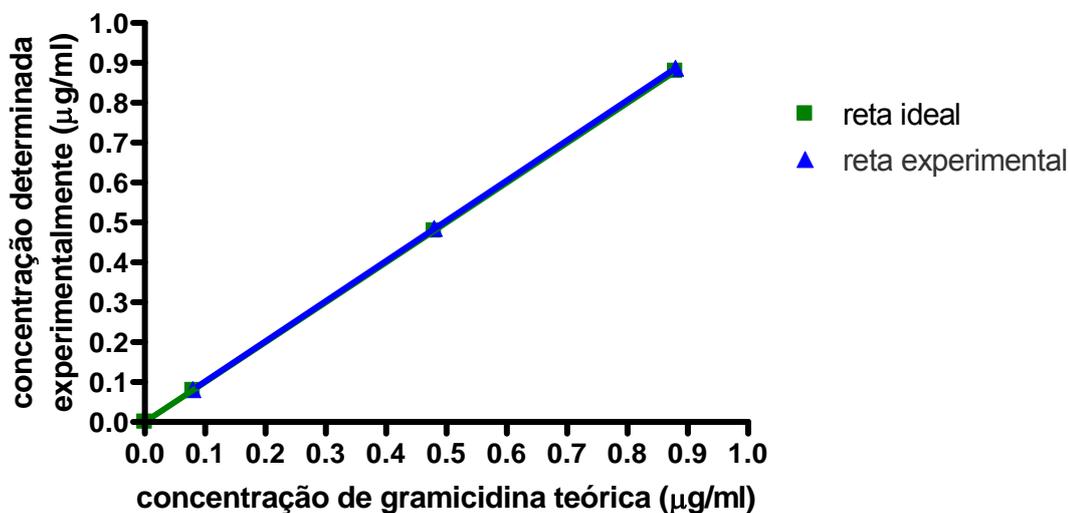


Figura 42. Gráfico de concentração de gramicidina teórica versus concentração determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal: $y = x$; reta experimental: $y = (0,001 \pm 0,005) + (1,01 \pm 0,01)x$.

O intervalo de tolerância foi calculado para as concentrações ensaiadas e verificou-se que estava inserido na faixa de variação permitida ($\pm 15\%$). Desta forma, o método foi considerado exato (Figura 43).

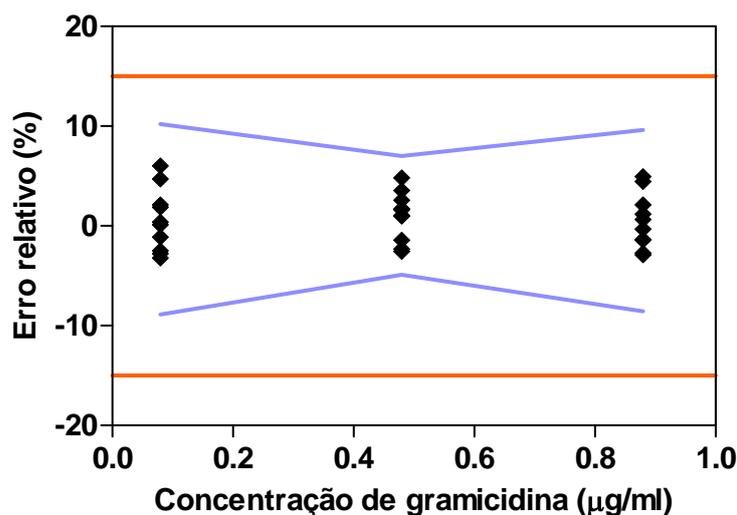


Figura 43. Gráfico de erro relativo versus concentração de gramicidina (µg/ml), com intervalo de tolerância (em azul) e limites de variação permitidos (em vermelho).

D Limite de detecção

Para a determinação do limite de detecção as leituras de absorvância dos tubos contendo as soluções de gramicidina (0,01; 0,02; 0,04 e 0,06 µg/ml) foram comparadas com as do branco inoculado (meio inoculado sem adição de antibiótico) e verificou-se diferença significativa entre elas (Tabela 35). O teste de médias demonstrou não haver diferença significativa entre as leituras de absorvância dos tubos contendo as soluções de gramicidina a 0,01; 0,02 e 0,04 µg/ml e o diluente. Contudo, quando a comparação foi feita entre as leituras de absorvância da solução a 0,06 µg/ml e o branco inoculado, observou-se diferença significativa. Portanto, a concentração de 0,06 µg/ml foi determinada como limite de detecção do método desenvolvido.

Tabela 35. Leitura média de absorvância \pm dp obtida para álcool etílico a 95% e soluções de gramicidina a 0,01; 0,02; 0,04 e 0,06 µg/ml (n=3).

Absorvância	Branco inoculado ⁽ⁱ⁾	Concentração de gramicidina em álcool etílico a 95%			
		0,01	0,02	0,04	0,06
	0,848 \pm 0,007	0,851 \pm 0,009	0,841 \pm 0,006	0,850 \pm 0,006	0,815 \pm 0,003

⁽ⁱ⁾ Caldo inoculado + álcool etílico a 95%.

E Limites de quantificação

✓ Limite de quantificação inferior

Foram realizados cinco doseamentos independentes em dois dias diferentes. A partir dos resultados individuais, calcularam-se a potência média e o desvio padrão relativo, a partir dos quais foram avaliadas a precisão e exatidão dos resultados. Consideraram-se como exatas as potências que estavam inseridas no intervalo de 85 a 115 % do valor teórico. As precisões intra-dia (n=5) e inter-dias (n=10), foram avaliadas pelo valor do DPR que deve ser inferior a 15%. (AGÊNCIA..., 2003; U.S. FOOD..., 2001).

Assim, verificou-se que as potências referentes à solução a 0,06 µg/ml foram superiores a 115% em ambos os dias de ensaio. Além disso, os valores de DPR foram altos, apesar de não serem superiores ao limite especificado (15%), indicando uma baixa precisão dos resultados (Tabela 36). Contudo, os resultados obtidos para

a solução a 0,08 µg/ml apresentaram-se precisos e exatos como discutido no item *Precisão e Exatidão* (Tabelas 33 e 34) para o delineamento 5x1 do método turbidimétrico. Em vista disso, a concentração de 0,08 µg/ml foi determinada como limite de quantificação inferior.

Tabela 36. Valores de potências percentuais e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação inferior (n=3).

Dias	Soluções de gramicidina a 0,06 µg/ml					Média (%)	DPR (%)	Média entre dias (%)	DPR entre dias(%)
	1	2	3	4	5				
1	165,50	156,20	121,98	138,18	151,39	146,65	12,79	135,22	12,70
2	119,62	115,20	127,08	123,50	133,56	123,79	5,68		

✓ Limite de quantificação superior

Para determinação do limite de quantificação superior, avaliaram-se a exatidão e precisão dos resultados de potência de soluções de gramicidina padrão a 0,88; 1,08 e 1,28 µg/ml obtidos, em dois dias diferentes, empregando o delineamento 5x1.

A Tabela 37 apresenta os resultados de potência determinados para as soluções a 1,08 e 1,28 µg/ml, os quais estão bem abaixo do valor real, não cumprindo o critério de exatidão requerido (potência entre 85 e 115%). Em relação à variabilidade dos resultados, foram avaliados os valores de DPR calculados para os resultados obtidos ao mesmo dia e em dias diferentes. O DPR para precisão inter-dias para concentração de 1,08 µg/ml foi superior ao critério estipulado (15%). Apesar dos demais valores de DPR estarem abaixo deste valor, ainda foram valores altos o que indicou uma baixa precisão. No entanto, os resultados obtidos para solução a 0,88 µg/ml apresentaram precisão e exatidão adequados como discutido no item *Precisão e Exatidão* (Tabelas 33 e 34) para o delineamento 5x1 do método turbidimétrico. Assim, a concentração 0,88 µg/ml foi determinada como limite superior de quantificação do método.

Tabela 37. Valores de potências percentuais, concentração calculada e desvio padrão relativo para determinação do limite de quantificação superior.

Solu- ção	Dias	Réplicas					Média (%)	DPR (%)	Média entre dias (%)	DPR entre dias (%)
		1	2	3	4	5				
1,08 µg/ml	1	72,62	85,70	75,34	86,52	85,67	81,17	8,18	70,87	17,16
	2	60,35	59,95	58,94	55,21	68,36	60,56	7,94		
1,28 µg/ml	1	52,61	63,83 ⁽ⁱ⁾	66,46	53,26	50,62	57,36	12,62	53,60	12,99
	2	57,73	46,72	47,05 ⁽ⁱ⁾	50,27	47,42	49,84	9,29		

⁽ⁱ⁾ Perda de um dado da amostra que foi substituído pela média das demais leituras da mesma solução.

F Robustez

Avaliou-se a robustez do método pela variação de fatores como pH, tempo de incubação e idade da cultura do microrganismo teste.

✓ *Variação do pH do meio de cultura*

Avaliou-se a influencia do pH sobre a atividade de soluções de gramicidina (0,08 a 0,88 µg/ml) testando-se meio de cultura com pH 6, 7 e 8..

Foram obtidas três curvas, cuja regressão foi significativa apenas quando foi utilizado o meio de pH 7. Em pH 6 e 8 a gramicidina mostrou atividade, porém sem variação em função do aumento da concentração. Além disso, verificou-se que em pH 6 a atividade é maior que em pH 8 (Figura 44).

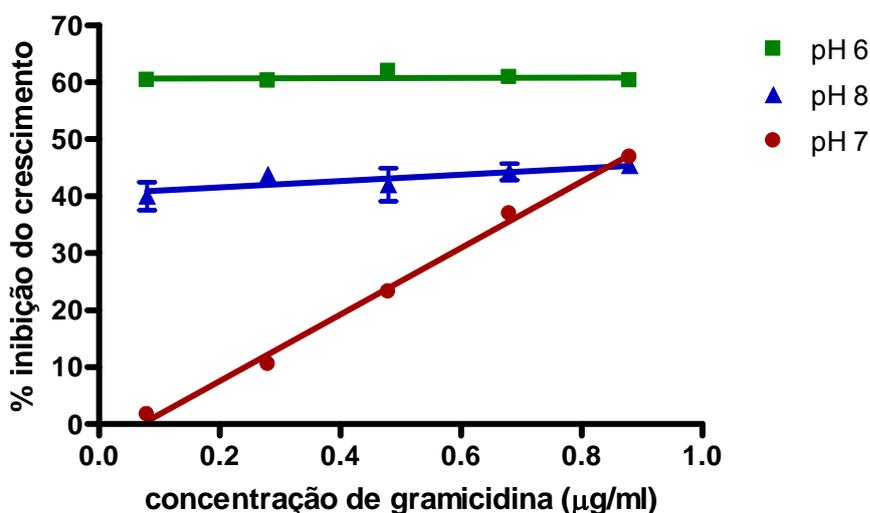


Figura 44. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento, empregando inóculo a 0,75% de *E. hirae*, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e caldo GCLT pH 7 $y = (-4,18 \pm 0,93) + (58,40 \pm 1,67)x$; pH 6 e 8 (n=3).

Em vista disso, o pH do meio de cultura é um fator crítico para realização do doseamento, devendo estar ajustado para 7.

✓ *Tempo de incubação*

O tempo de incubação é um parâmetro importante, pois pode alterar a inclinação da curva analítica influenciando a sensibilidade do método como discutido no item B de 6.7. Foram avaliados diferentes períodos de incubação (3h45, 4h e 4h15) com objetivo de se determinar um intervalo de tempo de incubação em que o ensaio possa ser realizado sem alteração da sensibilidade do método.

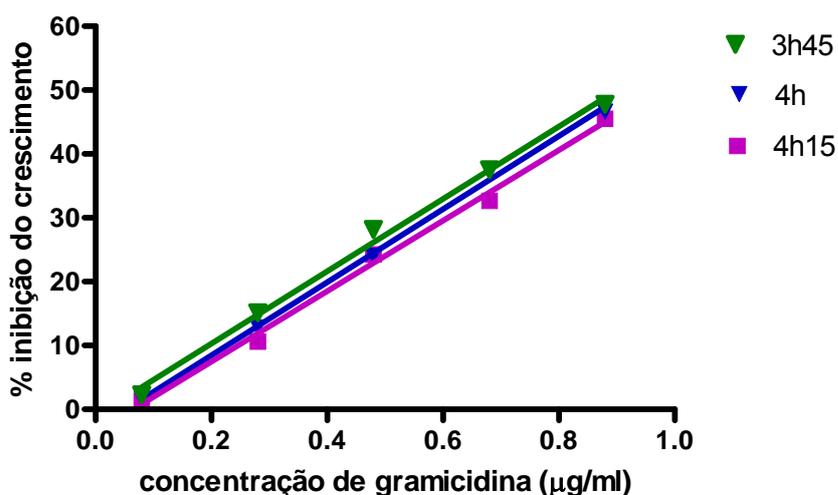


Figura 45. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento para *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes tempos de incubação: 3h45 $y = (56,69 \pm 1,35)x + (-1,04 \pm 0,75)$; 4h $y = (57,24 \pm 1,04)x + (-2,98 \pm 0,58)$; 4h15 $y = (55,24 \pm 1,35)x + (-3,61 \pm 0,75)$.

Na Figura 45 encontram-se as três curvas obtidas nos diferentes períodos de incubação, as quais apresentaram regressão significativa e modelo linear adequado. A comparação entre elas demonstrou existir diferença significativa entre os interceptos, contudo, não houve diferença entre as inclinações. Portanto, as retas são paralelas.

Em vista disso, concluiu-se que o tempo de incubação é um parâmetro crítico, contudo, o intervalo de 3h45 a 4h15 foi definido como um período em que o ensaio pode ser realizado sem alteração da sua sensibilidade, uma vez que a inclinação não se alterou. No entanto, ao se realizar o ensaio turbidimétrico, o tempo de incubação pode variar dentro deste intervalo desde que todos os tubos sejam incubados pelo mesmo tempo.

✓ **Idade da cultura do microrganismo teste**

Com objetivo de verificar a influência da idade do microrganismo, foram ensaiadas cepas de *E. hirae* de diferentes idades, da 2ª a 7ª passagem, sendo que cada repique foi considerado uma passagem. Todas as curvas apresentaram regressão significativa e o modelo linear foi adequado.

As retas obtidas com as cepas da 2ª a 6ª passagem, quando comparadas não apresentaram diferença estatística. Contudo, ao compará-las com as curvas da 7ª passagem (A e B), verificou-se a diferença significativa tanto do intercepto quanto da inclinação. Também se observou nitidamente que a cepa mais velha apresentou menor sensibilidade ao antibiótico comprovada pela menor inclinação da reta (Figura 46).

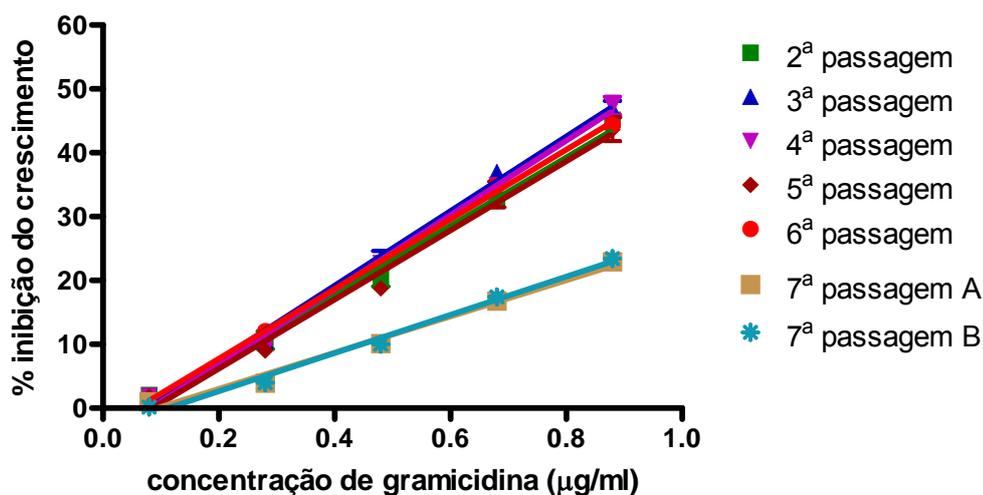


Figura 46. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento empregando caldo GCLT, soluções de gramicidina 0,08 a 0,88 µg/ml em álcool etílico a 95%, 4h de incubação e inóculo a 0,75% de *E. hirae* de diferentes idades.

Em vista disso, a idade do microrganismo teste é um fator crítico que deve ser controlado, sendo que até seis passagens foi possível realizar o doseamento da gramicidina sem alteração da sensibilidade do *E. hirae*.

6.9 Doseamento da gramicidina matéria-prima empregando o método turbidimétrico

A gramicidina matéria-prima, cuja potência foi determinada pelo método de difusão em placa, também foi dosada pelo método turbidimétrico desenvolvido. Foram realizados cinco doseamentos empregando os delineamentos 3x3 e 5x1.

A potência, parâmetros de validade do ensaio e o limite de confiança a 95 % foram calculados para cada doseamento dos dois delineamentos (Tabelas 38 e 39). Todos

os ensaios apresentaram os parâmetros de validade necessários (APÊNDICE M e N).

Tabela 38. Valores de potência, limite de confiança a 95 % calculado e crítico para gramicidina matéria-prima.

Doseamento	Potência (%)	LC _{inferior} (%)	LC _{superior} (%)	LC _{inferior} crítico (%) ⁽ⁱⁱ⁾	LC _{superior} crítico (%) ⁽ⁱⁱ⁾
A	104,25	96,14	112,37	93,83	114,68
B	106,05	98,28	113,81	95,44	116,55
C ⁽ⁱ⁾	105,29	98,39	113,19	94,76	115,82
D	105,07	99,91	110,22	94,56	115,57
E	105,82	100,06	111,59	95,24	116,41

⁽ⁱ⁾ Perdeu-se um dado da amostra devido à adição de maior volume de meio de cultura (mais que 9,0 ml).

⁽ⁱⁱ⁾ Foi considerada como precisão adequada do ensaio uma variação máxima de 10% no intervalo de confiança a 95% da potência calculada.

Tabela 39. Valores de potência, limite de confiança a 95% calculado e crítico para gramicidina matéria-prima.

Doseamento	Potência (%)	LC _{inferior} (%)	LC _{superior} (%)	LC _{inferior} crítico (%)	LC _{superior} crítico (%)
A	106,71	100,04	113,39	96,04	117,38
B	104,61	96,53	112,69	94,15	115,07
C	101,39	91,64	111,15	91,25	111,53
D	106,54	99,76	113,31	95,88	117,19
E	101,99	95,19	108,78	91,79	112,19

Os resultados de potência foram combinados a fim de obter uma estimativa de potência com intervalo de confiança reduzido. Os cálculos foram realizados segundo a Hewitt (2007), sendo a potência combinada para o delineamento 3x3 igual a 105,33% com intervalo de confiança a 95% de 104,03 a 106,62%. Para o delineamento 5x1, a potência combinada foi igual a 104,53% com intervalo de confiança a 95% de 101,90 a 107,16% (APÊNDICE O).

✓ **Comparação entre os delineamentos: retas paralelas 3x3 e 5x1**

Os delineamentos retas paralelas 3x3 e o 5x1 foram propostos para o método turbidimétrico. O teste de F foi utilizado para comparar a precisão entre os delineamentos. Empregou-se o teste de Ryan-Joiner para verificar se a variável (resultados de potência da matéria-prima obtidos com os dois delineamentos) segue a distribuição normal, condição exigida para a utilização do teste F.

Como não foram significativos os desvios da distribuição normal, o teste de F foi utilizado e demonstrou existir diferença significativa entre as variâncias dos dois delineamentos. Desta forma, a precisão dos delineamentos foi diferente, sendo o mais preciso o delineamento retas paralelas 3x3, uma vez que apresentou menor variância.

6.10 Comparação entre os métodos desenvolvidos: difusão em placas e turbidimétrico

O teste de F também foi utilizado para comparar os dois métodos de doseamento para gramicidina. A comparação foi realizada por delineamento, empregando os resultados de potência para matéria-prima.

Não houve diferença significativa entre as variâncias dos métodos quando o delineamento 5x1 foi empregado e nem quando se utilizou o 3x3. Assim, não existe diferença entre a precisão dos dois métodos.

6.11 Estudo da interferência de peptonas na atividade de gramicidina contra *E. hirae*

Foi relatado por vários estudos que a presença de peptonas no meio de cultura pode inibir de forma amena a atividade da gramicidina (DUBOS e HOTCHKISS, 1941; HOTCHKISS, 1944; LECLERCQ, 1968; REEDY e WOLFSON, 1949). Como discutido anteriormente, com um meio contendo menor quantidade de peptona foi possível verificar a ação antimicrobiana da gramicidina contra *E. hirae*, além de se observar a gradação da resposta em função da concentração. Tais observações não foram possíveis quando se empregou o caldo para antibióticos nº3 preconizado nos

compêndios oficiais (FARMACOPÉIA..., 1988; THE UNITED..., 2008; BRITISH..., 2007).

A fim de verificar se a presença de peptona interferia na atividade da gramicidina, foi preparado um caldo de mesma composição do meio para antibiótico nº3, contudo sem a peptona de carne. Testou-se o caldo com soluções de gramicidina na faixa de 0,01 a 2,56 µg/ml e inóculo a 0,75% de *E. hirae* e observou-se a gradação da resposta (porcentagem de inibição do crescimento) em função da concentração de gramicidina (Figura 47), isto é, o antibiótico apresentava atividade antimicrobiana na ausência de peptona e tal atividade era proporcional à concentração.

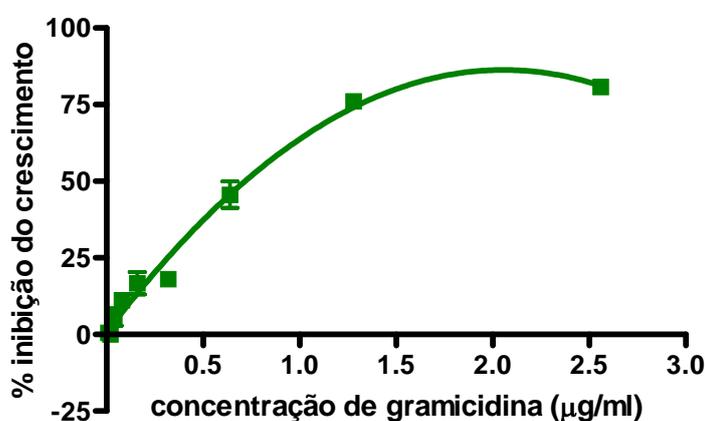


Figura 47. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, caldo para antibiótico nº3 sem peptona de carne e soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95%. $y = (0,69 \pm 1,33) + (83,30 \pm 4,26) x + (-20,26 \pm 1,68) x^2$.

O modelo polinomial quadrático foi empregado para representar a relação entre a porcentagem de inibição do crescimento e a concentração de gramicidina. Por meio da análise de regressão não linear verificou-se que a regressão foi significativa e que tanto o componente linear quanto o quadrático contribuem para o modelo. Também foi feita a análise de resíduos, pela qual foram verificadas a homoscedasticidade, normalidade e independência dos resíduos. Em vista disso, o modelo quadrático foi adequado para a série de dados analisada.

Considerando os resultados obtidos, a presença de peptona no meio de cultura interferiu na atividade da gramicidina. No entanto, existem vários tipos de peptonas,

cuja composição varia com a fonte de proteína utilizada (leite, soja e outros) e com o processo de hidrólise (enzimático ou ácido). Desta forma, com objetivo de verificar se o tipo de peptona também influencia na atividade do antibiótico prepararam-se três meios de cultura, cuja composição foi a mesma do meio para antibiótico nº3, com exceção da peptona de carne que foi substituída pela triptona, lactalbumina ou casamino. Os caldos preparados foram submetidos às mesmas condições do ensaio anterior.

Foi verificado para os três caldos que a gramicidina apresentava ação antimicrobiana contra o *E. hirae* e que a ação era dependente da concentração.

A análise de regressão não linear também foi aplicada e verificou-se que a regressão entre a porcentagem de inibição e a concentração foi significativa. O modelo polinomial quadrático também foi adequado para as três séries de dados (Figura 48).

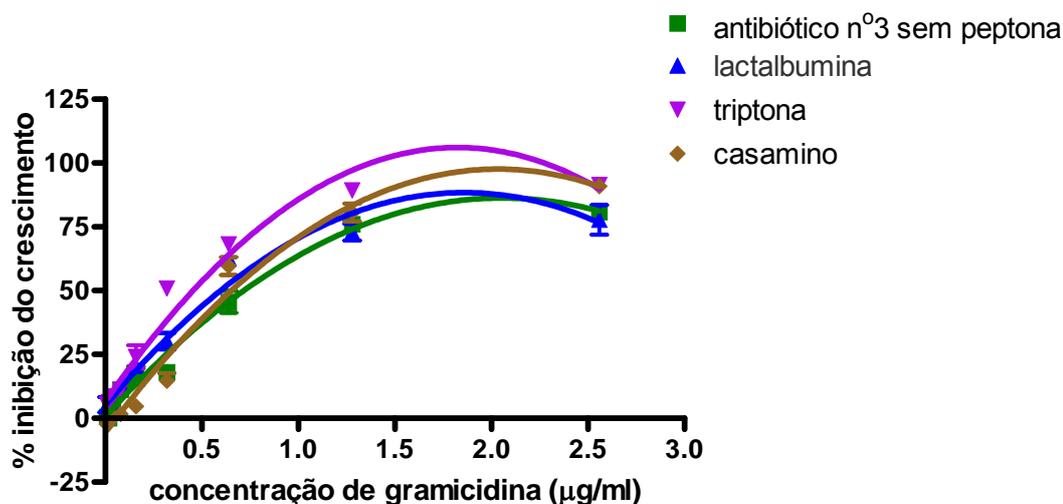


Figura 48. Concentração de gramicidina versus porcentagem de inibição do crescimento de *E. hirae*, empregando inóculo a 0,75%, soluções de gramicidina 0,01 a 2,56 µg/ml em álcool etílico a 95% e diferentes meios de cultura: caldo para antibiótico nº3 sem peptona $y = (0,69 \pm 1,33) + (83,30 \pm 4,26) x + (-20,26 \pm 1,68) x^2$; caldo com lactalbumina $y = (5,05 \pm 1,73) + (89,71 \pm 5,55) x + (-24,13 \pm 2,20) x^2$; com triptona $y = (6,55 \pm 1,83) + (109,1 \pm 5,85) x + (-29,91 \pm 2,32) x^2$ e com casamino $y = (5,67 \pm 1,78) + (101,6 \pm 5,71) x + (-24,95 \pm 2,26) x^2$.

Compararam-se as quatro curvas obtidas com os diferentes meios e verificou-se que foi significativa a diferença entre elas. Desta forma, calcularam-se os valores da

concentração inibitória a 50% (IC50) para todos os meios, a fim de determinar em qual composição de caldo a gramicidina apresentou maior atividade (Tabela 40). O caldo contendo triptona apresentou o menor valor de IC50, sendo, portanto, o meio em que a gramicidina apresentou maior atividade já que uma menor concentração de antimicrobiano foi necessária para inibir 50% do crescimento.

Tabela 40. Concentração de gramicidina inibitória a 50% (IC50) determinada para *E. hirae*, empregando diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Antibiótico nº3 sem peptona	Lactalbumina	Triptona	Casamino
IC50 (µg/ml)	0,717	0,597	0,455	0,653

Em vista do discutido, as peptonas interferem na atividade da gramicidina, contudo, tal interferência depende do tipo de peptona presente no meio de cultura.

Conclusões



7 CONCLUSÕES

7.1 Método por difusão em ágar

K. rhizophila ATCC 9341 (*Micrococcus luteus*) foi selecionado como microrganismo teste.

Um inóculo a 0,1% (v/v), preparado a partir de uma suspensão de $1,0 \pm 0,1$ unidade de absorvância, foi selecionado para utilização no doseamento.

Álcool, acetona e tampão fosfato pH 7,0 contendo polissorbato 80 a 1% foram contra indicados para a solubilização das soluções de trabalho de gramicidina

Polissorbato 80 na concentração de 1% adicionado a água foi definido como diluente da gramicidina nesse método.

Ágar nutriente foi o meio que permitiu a verificação do efeito gradual da resposta com a variação da concentração.

A utilização de dupla camada de meio de cultura e período de 1 hora de pré-difusão foram condições selecionadas para o doseamento.

Os delineamentos, 5x1 e 3x3, produziram resultados precisos, exatos e com veracidade adequada.

Uma relação linear adequada foi obtida (diâmetro do halo de inibição *versus* logaritmo da concentração) na faixa de 5,00 a 25,3 µg/ml.

O pH e a composição do meio de cultura interferem nos resultados devendo ser controlados.

Os resultados foram precisos, exatos e com veracidade adequada; sendo o método seletivo com limites de detecção e quantificação inferior e superior iguais a 2,00; 5,00 e 25,3 µg/ml, respectivamente.

7.2 Método turbidimétrico

E. hirae ATCC 10541 foi selecionado como microrganismo teste para o método turbidimétrico,

O meio de cultura preconizado pelos compêndios oficiais, para o doseamento de gramicidina (meio antibiótico nº3) interfere na atividade do antibiótico.

Com o meio para antibióticos nº3, modificado (sem peptona de carne), foi observada atividade da gramicidina, que variou com sua concentração.

Com a substituição da peptona de carne por outras peptonas (triptona, casamino e lactalbumina) também se observou atividade gradual da gramicidina.

O caldo GCLT, meio desenvolvido no laboratório, foi capaz de promover o crescimento do microrganismo teste e não interferiu na atividade da gramicidina, sendo utilizado para o doseamento.

Um inóculo de concentração de 0,75% preparado a partir uma suspensão em salina de absorvância $1,0 \pm 0,1$ foi adequado para realização do ensaio.

O tempo de incubação de 4 horas \pm 15 minutos foi adequado e definido para a realização do doseamento.

Os resultados obtidos pelos delineamentos, 3x3 e 5x1, foram precisos, exatos e com veracidade adequada.

Uma curva analítica com adequada relação linear entre a porcentagem de inibição do crescimento e a concentração foi obtida na faixa de 0,08 a 0,88 $\mu\text{g/ml}$.

Fatores como tempo de incubação, idade do microrganismo e pH do meio de cultura interferem nos resultados, devendo ser controlados.

O método se mostrou seletivo, exato, preciso, com veracidade adequada e com limites de detecção, quantificação inferior e superior iguais a 0,06; 0,08 e 0,88 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; SCHEPERS, R.; GATHU, L.; KIBAYA, R.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Liquid chromatographic analysis of a formulation containing polymyxin, gramicidin and neomycin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p.505-511, 1997.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php?id=15132&word>> Acesso em: março de 2007.

ANDO, S.; AOYAGI, H.; SHINAGAWA, S.; NISHINO, N.; WAKI, M.; KATO, T.; IZUMIYA, N. [4,4'-D-Diaminopropionic acid] gramicidin S: a synthetic gramicidin S analog with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. **Federation of European Biochemical Societies**, v.161, n.1, p. 89 – 92, 1983.

ARCELLONI, C.; PARONI, R.; BASILE, M.; BONINI, P.; VAIANI, R. Ceftazidime kinetics of diffusion in inoculated agar plates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 1280 – 1281, 1996.

BERNABÉU, J.; CAMACHO, M.; GIL-ALEGRE, M.; RUZ, V.; SUAREZ, A. Microbiological bioassay of erythromycin thiocyanate optimisation and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 347 – 353, 1999.

BLISS, C. The calculation of microbial assays. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 20, n.4, p. 243 - 258, 1956.

BOSSCHA, M.; DISSEL, J.; KUIJPER, E.; SWART, W.; JAGER, M. The efficacy and safety of topical polymyxin B, neomycin and gramicidin for treatment of presumed bacterial corneal ulceration. **Br. J. Ophthalmol.**, v.88, p. 25 – 28, 2004.

BOUCHARD, M.; BENJAMIN, D.; TITO, P.; ROBINSON, C.; DOBSON, C. Solvent Effects on the Conformation of the Transmembrane Peptide Gramicidin A: Insights from Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1010–1017, 2000.

BOURINBAIAR, A. e COLEMAN, C. The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 *in vitro*. **Archives of virology**, v. 142, p. 2225 – 2235, 1997.

BOYER, F.; TENA, M.; CASTRO, M.; VALCFIRCEL, M. Development and validation of chromatographic methods (HPLC and GC) for the determination of the active components (benzocaine, tyrothricin and menthol) of a pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 1297 – 1303, 1995.

BRADY, M.; KATZ, S. Factors influencing optimization of diffusion assay for antibiotics. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.73, n.2, p. 202 – 205, 1990.

BRITISH pharmacopoeia 2007. London: Her Majesty's Stationery Office, 2007.

BROCK, T. A method for studying antibiotic diffusion in agar. **Antibiotics and chemotherapy**, v. 12, n. 5, p. 243 - 246, 1957.

BURKE, S. Analysis of variance. **LC•GC Europe Online Supplement**, p. 9 – 12, 2005.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.; HAESEBROUCK, F. Influence of different medium components on the *in vitro* activity of the growth-promoting antibiotic flavomycin against enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 713 – 716, 2000.

CAI, Y.; CAI, YU.; CHENG, J.; MOU, S.; YIQIANG, L Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 124–130, 2005.

CASILLI, L.; RAGNI, G. Dosaggio della tirotricina in presenza di cetrimide. **Bollettino Chimico Farmacêutico**, v. 104, n. 7, p. 432 – 437, 1965.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistics for analytical chemists**. 1 ed. New York: Chapman and Hall, 1983, 253p.

COMUZZI, B.; ARCELLONI, C.; VAIANI, R.; PARONI, R. Gentamicin diffusion in Mueller-Hinton agar plates from different manufactures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 495 – 502, 2001.

COOPER, K.; GILLESPIE, W. The influence of temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. **J. Gen. Microbiol.**, v. 7, p. 1 – 7, 1952.

COOPER, K.; LINTON, A. The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assay. **J. Gen. Microbiol.**, v. 7, p. 8 -17, 1952.

COOPER, K., WOODMAN, D. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 58, p. 75-84, 1946. *apud* HEWITT, W. **Microbiological assay – an introduction to quantitative principles and evaluation**. Academic Press, inc. Orland: 1977, 284p.

CURRY, J. Gradient plate bioassay for tyrothricin and its application to dentifrices. **Appl. Microbiol.**, v. 11, p. 539 – 541, 1963.

DAVIS, W.; STROUT, T. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 659 – 665, 1971.

DIMICK, K. A quantitative method for the determination of tyrothricin. **The journal of biological chemistry**, v. 149, p. 387 – 393, 1943.

DONOVICK, R.; HAMRE, D.; KAVANAGH, F.; RAKE, G. A Broth dilution method of assaying streptothricin and streptomycin. **J. Bacteriol.**, v. 50, p. 623 – 628, 1945.

DUBOS, R.J. e HOTCHKISS, R.D. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. **J. Exp. Med.**, v. 73, p. 629 – 640, 1941.

FARMACOPEA de los Estados Unidos mexicanos. 7.ed. Mexico: Secretaria da Salud, 2004.

FARMACOPÉIA brasileira 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FEDORKO, J.; KATZ, S. Neomycin activity in serum and plasma in the cylinder plate assay. **Journal of Bacteriology**, v. 89, n. 2, 1965.

FINN, R. Theory of agar diffusion methods for bioassay. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 6, p. 975 – 977, 1959.

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

FRIEDMAN, L. Structure of agar gels from studies of diffusion. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 52, n. 4, p. 1311 – 1314, 1930.

FUJIHARA, M.; NISHIYAMA, S.; HASEGAWA, S. Effects of agars on determination of potency of polymyxin B sulfate by the agar plate diffusion method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 11, p. 2665-2667, 1994.

GAVIN, J. Microbiological process report – analytical microbiology – I. The test organism. **Appl. Microbiol.**, v. 4, p. 323 - 331, 1956.

GAVIN, J. Microbiological process report – analytical microbiology – II. The diffusion methods. **Appl. Microbiol.**, v. 5, p. 25-33, 1957a.

GAVIN, J. Microbiological process report – analytical microbiology – III. Turbidimetric methods. **Appl. Microbiol.**, v. 5, p. 235 – 243, 1957b.

HANCOCK, R.; CHAPPLE, D. Minireview Peptide Antibiotics. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 43, n.6, p. 1317-1323, 1999.

HAROLD, F e BAARDA, J. Gramicidin, valinomycin, and cation permeability of *Streptococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n.1, p. 53-60, 1967.

HAYES, W. Effect of agar depth in plate method for assay of penicillin. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 57, p. 457 – 466, 1945 *apud* GAVIN, J. Microbiological process report – analytical microbiology – II. The diffusion methods. **Appl. Microbiol.**, v. 5, p. 25-33, 1957a.

HEATHER; L. René Dubos: unearthing antibiotics. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 2, p. 259, 2006.

HEILMAN, D.; HERRELL, W. Mode of action of gramicidin. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.**, v.46, n. 182, p. 480 – 484, 1941.

HEWITT, W. **Microbiological assay – an introduction to quantitative principles and evaluation**. Academic Press, inc. Orland: 1977, 284p.

HEWITT, W. **Theory and application of microbiological assay**. Academic Press, inc. California: 1989, 323p.

HEWITT, W. **Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach**. 1 ed. INTERPHARM, 2007, 260p

HOTCHKISS, R.D. e DUBOS, R.J. The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 141, p. 155-162, 1941.

HOTCHKISS, R.D. Gramicidin, tyrocidine and tyrothricin. **Advances in Enzymology**, v. 4, p. 153 – 199, 1944.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.; DEW'E, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARDI, G.; NIVET, C.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 45, P. 70 – 81, 2007a.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.; DEW'E, W.; FEINBERG, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part III. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 82 – 96, 2007b.

HUMPHREY, J.; LIGHTBOWN, J. A general theory for plate assay of antibiotics with some practical applications. *J. Gen. Microbiol.*, v. 7, p. 129 – 143, 1952.

INSTITUTO nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial – INMETRO **DOQ-CGCRE-008 Revisão 1 – Março/2003 – Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos** – Rio de Janeiro, 2003, 35p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH **Topic Q2B Validation of analytical procedures: methodology**. Geneva: ICH Secretariat, 1996, 9p.

INTERNATIONAL pharmacopoeia, 3^aed., Geneva: World Health Organization, 1979. v.1, p. 145 – 151.

ISHII, S.; WITKOP, B. Gramicidin A. II. Preparation and Properties of “secogrammicidin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 9, p. 1848 – 1853, 1964.

JARDY, A.; VIAL, J. L’apport des methods statistiques dans la maîtrise de la qualité des analyses. **Analisis**, v. 27, n.6, p. 511 – 519, 1999.

JOSLYN, D.; GALBRAITH, M. A turbidimetric-method for the assay of antibiotics. **J. Bacteriol.**, v. 59, n. 6, p. 711 – 716, 1950.

KAVANAGH, F.W. **Analytical Microbiology**, New York: Academic Press, 1963, 707p.

KAVANAGH, F.W. Turbidimetric assays: the antibiotic dose-response line. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 777 – 780, 1968.

KAVANAGH, F.W. Microbiological diffusion assay I: operations studied with Cooper equation. **Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 63, n.9, p.1459 – 1463, 1974.

KAVANAGH, F.W.; RAGHEB, H.. Microbiological assays for antibiotics and vitamins: considerations for assuring accuracy. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 62, n.4, p. 943 – 950, 1979.

KIRICSI, M.; PRENNER, E.; NIARAKI, M.; LEWIS, R.; HODGES, R.; MCELHANEY, R. The effects of ring-size analogs of the antimicrobial peptide gramicidin S on phospholipid bilayer model membranes and on the growth of *Acholeplasma laidlawii* B. **Europe Journal Biochemistry**, v. 269, p. 5911–5920, 2002.

KOO, S.; BAYER, A.; YEAMEN, M. Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. **Infection and immunity**, v. 69, n.8, p. 4916-4922, 2001.

KOVACS, F.; QUINE, J.; CROSS, A. Validation of single-stranded channel conformation of gramicidin A by solid-state NMR. **Biophysics**, v. 96, p. 7910 – 7915, 1999.

KRAMER, J.; KIRSHBAUM, A. A turbidimetric method of assay of tyrothricin. **Antibiotics and chemotherapy**, v. 5, n. 10, p. 561 – 565, 1955.

LAMB, J.; MANN, J.; SIMMONS, R. Factors influencing the microbiological assay of tobramycin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.1, n. 4, p. 323 – 328, 1972.

LASKA, E.; MEISNER, M. Statistical methods and applications of bioassay. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 27, P. 385 – 397, 1987.

LECLERCQ, S. Application de la néphélométrie au dosage microbiologique de la tyrothricine. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 11, p. 33 - 44, 1956.

LECLERCQ, S. Considérations sur la tyrothricine, la gramicidine et la tyrocidine et leur dosage néphélométrique. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 23, n. 1, p. 83 -105, 1968.

LOO, Y. *et al* Assay of streptomycin by the paper-disc plate method. **Journal Bacteriology**, v. 50, p. 701 – 709, 1945.

McMAHAN, J. An improved short time turbidimetric assay for penicillin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 249 – 258, 1944.

MARQUES, M.; HACKMANN, E.; SAITO, T. Doseamento microbiológico de neomicina: influência do volume de meio de cultura. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, v. 24, n. 1, p. 12 – 18, 1988.

MILLER, K.; MATT, C.; CIMINERA, J. An in vitro method for assaying the biological activity of tyrothricin. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 41, n.1, p. 23 – 26, 1952.

MILLER, S. A rapid bioassay method for gramicidin by measuring rubidium ion leakage from *Streptococcus faecalis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 47, p. 161 – 165, 1979.

MITCHISON, D.; SPICER, C. A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. **J. Gen. Microbiol.**, v. 3, p. 184 – 203, 1949.

MONTGOMERY, D.; PECK, E.; VINING, G. **Introduction to linear regression analysis**. New Cork: Wiley Interscience Publication, 2001. 641 p.

NAKAI, T.; YAMAUCHI, D.; KUBOTA, K. Enhancement of linear gramicidin expression from *Bacillus brevis* ATCC 8185 by casein peptide. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 69, n. 4, p. 700-704, 2005.

NIARAKI, M.; KONDEJEWSKI, L.; FARMER, S.; HANCOCK, R.; KAY, C.; HODGES, R. Diastereoisomeric analogues of gramicidin S: structure, biological activity and interaction with lipid bilayers. **Biochem. J.**, v. 349, p. 747-755, 2000.

ORWA, J.; GOVAERTS, C.; ROETS, E.; SCHEPDAEL, A.; HOOGMARTENS, J. Liquid chromatography of gramicidin. **Chromatographia**, v. 53, p. 17 – 21, 2001.

PURSIANO, T.; MISIEK, M.; LEITNER, F.; PRICE, K. Effect of assay medium on the antibacterial activity of certain penicillins and cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 3, n. 1, p. 33 – 39, 1973.

RAGHEB, H. Effect of volume of solution per cylinder on estimation of antibiotic potency in diffusion assay. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, n. 5, p. 1071 – 1074, 1988.

RAGHU, K.; GROSS, M. Electrospray Ionization-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry Reveal Self-Association and Metal-Ion Binding of Hydrophobic Peptides: A Study of the Gramicidin Dimer. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 473–479, 2004.

RAUTENBACH, M.; GERSTNER, G.; VLOK, N.; KULENKAMPFF, J.; WESTERHOFF, H. Analyses of dose–response curves to compare the antimicrobial activity of model cationic α -helical peptides highlights the necessity for a minimum of two activity parameters. **Analytical Biochemistry**, v. 350, p. 81–90, 2006.

RAYMOND, E.; TRAUB, W. Medium-dependent activity of gentamicin sulfate against *Enterococci*. **Applied Microbiology**, v. 21, n.2, p. 192 – 194, 1971.

RAWAT, S.; KELKAR, D.; CHATTOPADHYAY, A. Monitoring gramicidin conformations in membranes: a fluorescence approach. **Biophysical Journal**, v. 87, p. 831 – 843, 2004.

REEDY, J.; WOLFSON, S. A routine method for the in vitro assay of tyrothricin. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 39, n.1, p. 1 – 3, 1950.

REEDY, J.; WOLFSON, S. The effects of normal horse serum on the in vitro activity of tyrothricin. **J. Clin. Invest.** v. 28, p. 861 – 863, 1949.

RICHARDSON, H.; SMITH, A.; SENIOR, B. Agar diffusion method for the assay of colicins. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 10, p.1468 – 1474, 1968.

RIPPERE, R. Some principles of microbiological turbidimetric assay of antibiotics. **Journal Association Officinal Analytical Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 951 – 955, 1979.

ROMEU, N.; SUÁREZ, M.; SILVA, M. Behavior of gramicidin A–ethyl nonadecanoate mixed Langmuir monolayers spread at the air–water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 270-271, p.171–175, 2005.

RONDA, C.; HOLEMS, R.; SANFORD, J. Effects of Divalent Cations on Binding of Aminoglycoside Antibiotics to Human Serum Proteins and to Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.7, n.3, p. 239-245, 1975.

ROZET, E.; CECCATP. A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBER, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111–125, 2007.

SALGADO, H.; LOPES, C.; LUCCHESI, M. Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 443-446, 2006.

SCHMIDT, W.; MOYER, A. Penicillin I. Methods of assay. **J. Bacteriol.**, v.47, p.199 – 209, 1944.

SMITH, R.; JOSLYN, D.; GRUHZIT, O.; MAcLEAN, I.; PENNER, M.; EHRLICH, J. Chloromycetin: biological studies. **J. Bacteriol.**, v. 55, p. 425 – 448, 1948.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G., Statistical Methods. 8 ed. Ames: Jowa State University, 1996, 503 p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

STANKEWICH, J.; UPTON, R. Turbidimetric bioassay for carbenicillin. **Antmicrobial Agents and Chemotherapy**, v.3, n.3, p. 364 - 368, 1973.

STANSLY, P.; SCHLOSSER, M. Studies on polymyxin: an agar diffusion method of assay. **Journal biochemistry**, v. 54, n.5, p. 585 – 597, 1947.

STAUB, I.; SCHAPOVAL, E.; BERGOLD, A. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 292, p. 195–199, 2005.

TAKADA, Y.; MATSUO, K.; KATAOKA, T. Gramicidin A directly inhibition mammalian Na^+/K^+ ATPase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 1 – 5, 2008.

TANIMOTO, Y.; ICHIKAWA, Y.; YASUDA, Y.; TOCHIKUBO, K. Permeability of dormant spores of *Bacillus subtilis* to gramicidin S. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, p. 151-156, 1996.

THE MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals 14th edition Whitehouse Station, NJ: Merck, 2006.

THE UNITED states pharmacopeia. 31 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

TOALA, P.; WILCOX, C.; FINLAND, M. Effect of ph of medium and size of inoculum on activity of antibiotics against group D *Streptococcus* (*Enterococcus*). **applied microbiology**, v. 19, n.4, p. 629 – 637, 1970.

TOIT, E.; RAUTENBACH, M. A sensitive standardized micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, p. 159–165, 2000.

TREFFERS, H. The linear representation of dosage-response curves in microbial-antibiotic assays. **J. Bacteriol.**, v. 72, p. 108 – 114, 1956.

TURCINOV, T.; PEPELJNJAK, S. Azitromycin potency determination: optimal conditions for microbiological diffusion method assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 903 – 910, 1998.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001, 22p.

VESTERDAL, J. Studies on the inhibition zones observed in the agar cup method for penicillin assay. **Acta path. Microbial. Scand.**, v. 24, p. 272, 1947 *apud* COOPER, K.; LINTON, A. The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assay. **J. Gen. Microbiol.**, v. 7, p. 8 -17, 1952.

VIOLA, M.R.; CANESTRINI, C. Sulla determinazione microbiologica della tirotricina. **Bollettino Chimico Farmacêutico**, v. 105, n. 9, p. 688 – 694, 1966.

VUILLEUMIER, M.; ANKER, L. Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika in der Pharmacopoea Helvetica. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 33, p.621 – 633, 1958.

XIONG, Y.; MUKHOPADHYAY, K.; YEAMAN, M.; ADLER-MOORE, J. BAYER, A. Functional interrelations between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n.8, p.3114-3121, 2005.

ZAIAS, N.; McCORMICK, G.; DILORENZO, P.; KANOF, N.; SCHOCH, E.; SCHNEIDERMAN, N. Topical combination therapy for cutaneous candidiasis: a double-blind trial. **Current Therapeutic Research**, v. 29, n. 3, p.463-476, 1981.

ZIMBRO, M.; POWER, D. (Ed.) **Difco™ & BBL™ Manual – Manual of microbiological culture media**. Maryland: 2003.

WALLACE, B. Common structural features in gramicidin and other ion channels. **BioEssays**, v.22, p. 227-234, 2000.

WAKSMAN; SELMAN, A.; WOODRUFF; BOYD, H. **Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin**. *J. Bacteriol.*, v. 44, p. 373 – 384, 1942.

WEINSTEIN, J.; SCOTT, A.; HESTER, F. The action of gramicidin D on isolated liver mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 239, n.9, p.3031 – 3037, 1964.

WOODRUFF, B.; FOSTER, J. Antibacillin, a naturally occurring inhibitor of bacillin. **J. Bacteriol.**, v. 51, n. 3, p. 371 – 380, 1946.

Apêndices

APÊNDICE A – Método de difusão em ágar - obtenção da curva analítica

Amostra: gramicidina padrão (curva do dia 1a)

Concentrações: 5,00; 7,50; 11,3 (R); 16,9 e 25,3 µg/ml

✓ *Dados experimentais*

Placas	Diâmetro dos halos de inibição (mm)							
	5,00	R	7,50	R	16,9	R	25,3	R
1	10,50	11,70	11,14	11,88	12,39	11,73	13,04	11,94
	10,43	11,77	11,21	11,73	12,40	11,62	13,08	11,70
	10,53	11,79	11,26	11,87	12,40	11,60	13,04	11,68
2	10,68	11,73	11,23	11,74	12,32	11,87	12,89	11,65
	10,57	11,62	11,26	11,85	12,17	11,64	13,06	11,66
	10,58	12,25	11,16	11,61	12,31	11,81	13,04	11,64
3	10,87	11,64	11,26	11,62	12,21	11,62	13,08	11,75
	10,65	11,65	11,17	11,92	12,31	11,77	13,04	11,65
	10,66	11,67	11,35	11,92	12,40	11,86	13,10	11,79

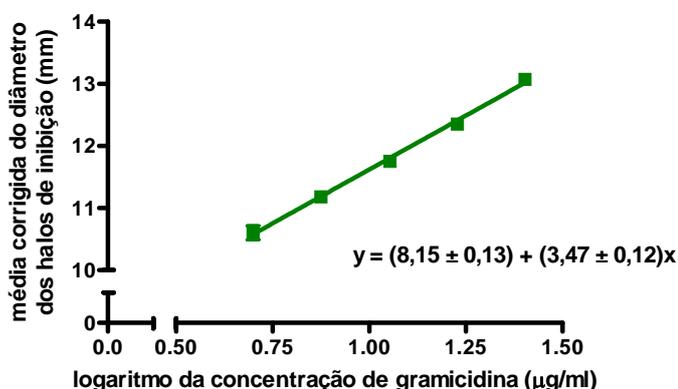
Placas	Média do diâmetro dos halos de inibição (mm)							
	5,00	R	7,50	R	16,9	R	25,3	R
1	10,49	11,75	11,20	11,83	12,40	11,65	13,05	11,77
2	10,61	11,87	11,22	11,73	12,27	11,77	13,00	11,65
3	10,73	11,65	11,26	11,82	12,31	11,75	13,07	11,73

✓ *Correção das médias dos halos*

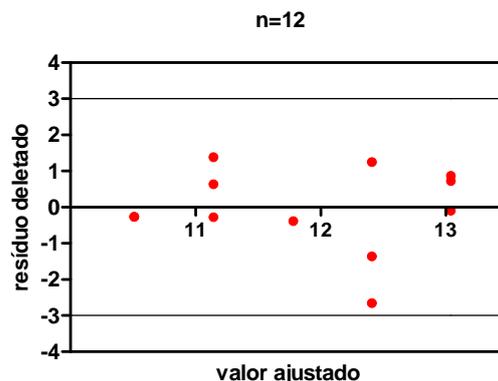
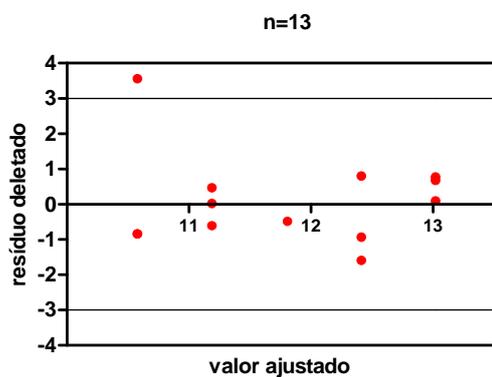
$\bar{R} = 11,75 \text{ mm}$

Placas	Médias corrigidas do diâmetro dos halos de inibição e correção (mm)							
	5,00	correção	7,50	correção	16,9	correção	25,3	correção
1	10,49	0,00	11,12	-0,08	12,50	0,10	13,03	-0,02
2	10,49	-0,12	11,24	0,02	12,25	-0,02	13,10	0,10
3	10,83	0,10	11,19	-0,07	12,31	0,00	13,09	0,02

✓ *Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados*



✓ **Tratamento de outlier**



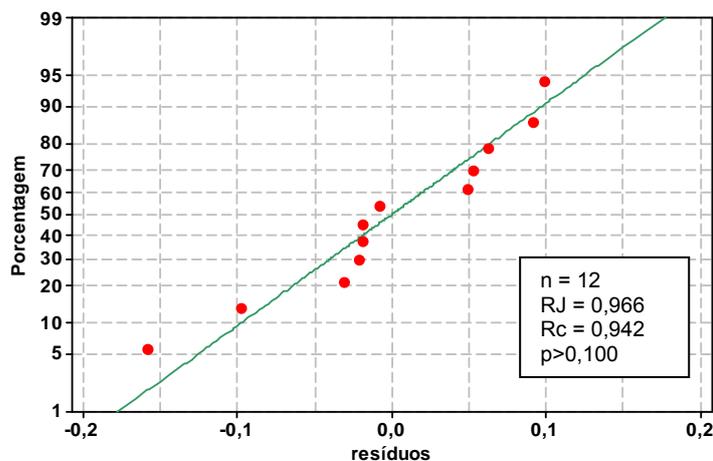
- Identificação de um outlier:
 $y = 10,83 \text{ mm}; x = 0,699 \text{ } \mu\text{g/ml}$

✓ **Teste de normalidade (Ryan-Joiner)**

- Hipóteses

H_0 : os resíduos seguem a distribuição normal.

H_1 : os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade.



- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo os resíduos seguem a distribuição normal ($p > 0,10$).

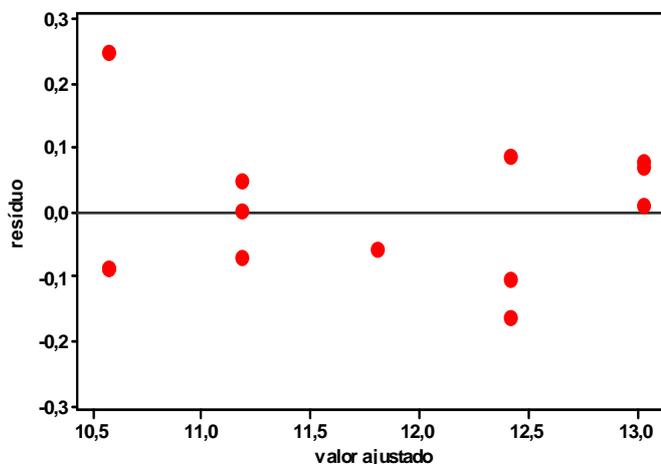
✓ **Homoscedascidade (teste de Levene modificado por Brown e Forsythe)**

- Hipóteses

H_0 : as variâncias dos resíduos não são diferentes.

H_1 : as variâncias dos resíduos são diferentes.

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
n	6	6
Mediana	-0,0191	0,0225
Média da diferenças entre cada resíduo e a mediana	0,0340	0,0785
Soma de quadrados dos desvios	0,0116	0,0185
Variância combinada	0,0030	
Estatística t de Levene	-1,4028	
$t_{0,975}$	2,2281	
p	p>0,05	



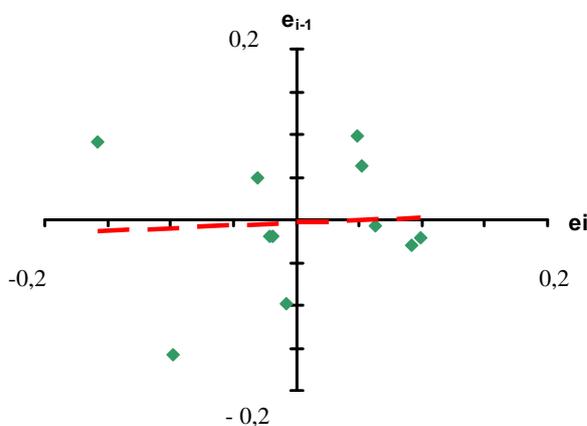
- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo as variâncias dos resíduos não são diferentes ($p>0,05$).

✓ **Independência dos resíduos (Teste de Durbin-Watson)**

- **Hipóteses**

H_0 : não há autocorrelação entre os resíduos.

H_1 : há autocorrelação entre os resíduos.



Estatística de Durbin-Watson = 1,83 ($p>0,10$)

- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo os resíduos são independentes ($p>0,10$).

✓ **Análise de regressão linear simples**

▪ **Estatística da regressão**

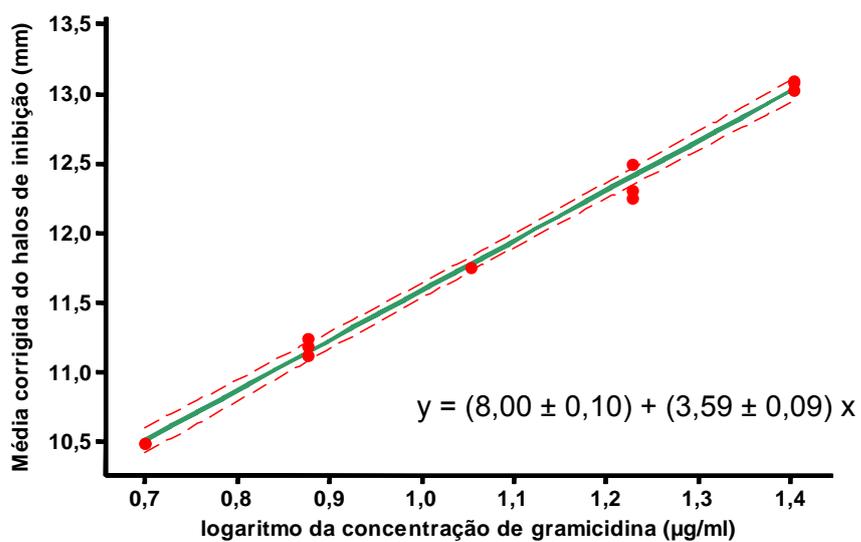
$r = 0,997$	$r^2 = 0,994$	r^2 (ajustado) = 0,993	$Sy.x = 0,080$
-------------	---------------	--------------------------	----------------

▪ **Estimativa dos parâmetros, significância e intervalo de confiança**

Coefficiente	valor	EP	t	p	IC95% inferior	IC95% superior
linear	8,00	0,10	80,26	0,000	7,77	8,22
angular	3,59	0,09	40,02	0,000	3,39	3,79

▪ **Análise de variância**

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p	Significância
regressão	1	10,262	10,262	1602,00	0,000	p<0,001
resíduo	10	0,064	0,006			
falta de ajuste	3	0,020	0,007	1,05	0,429	p>0,05
erro puro	7	0,044	0,006			
Total	11	10,326				

✓ **Gráfico de logaritmo da concentração versus média corrigida dos halos de inibição**

APÊNDICE B – Método de difusão em ágar - Análise de covariância: comparação entre as cinco curvas analíticas da linearidade

Amostra: gramicidina padrão

Concentrações: 5,00; 7,50; 11,3 (R); 16,9 e 25,3 µg/ml

✓ Dados experimentais

Curvas analíticas	Médias corrigidas do diâmetro dos halos de inibição (mm)				
	5,00 µg/ml	7,50 µg/ml	11,3 µg/ml	16,9 µg/ml	25,3 µg/ml
1 A	10,48	11,13	11,75	12,50	13,03
	10,49	11,23		12,24	13,10
	⁽ⁱ⁾	11,19		12,31	13,09
1 B	10,62	11,34	11,66	12,15	12,87
	10,32	11,20		12,36	12,98
	10,37	11,00		12,74	⁽ⁱⁱ⁾
2	10,39	10,80	11,51	12,3	13,03
	10,42	10,89		12,64	13,19
	10,79	⁽ⁱⁱ⁾		12,26	13,26
3	10,26	11,12	11,44	12,25	12,80
	10,32	10,91		12,36	12,85
	10,61	10,77		12,29	13,00
4	10,50	10,94	11,67	12,01	13,00
	10,67	11,12		12,51	12,99
	11,01	11,11		12,6	13,06

⁽ⁱ⁾ Identificação de um outlier por cálculos estatísticos. Este dado não foi repostado.

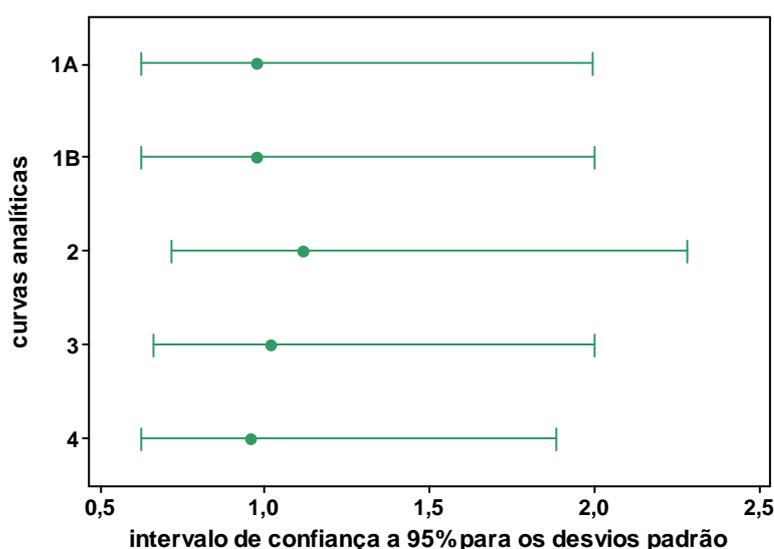
⁽ⁱⁱ⁾ Ocorreu a perda de uma placa devida vazamento das soluções contidas nos cilindros, impedindo a formação dos halos. Este dado não foi repostado.

✓ Homoscedascidade (teste de Bartlett)

- Hipóteses

H_0 : as variâncias das respostas das cinco curvas analíticas não são diferentes.

H_1 : as variâncias das respostas das cinco curvas analíticas são diferentes.



Estatística de Bartlett = 0,34
p = 0,987

- Conclusão: não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo as variâncias das respostas das curvas não são diferentes ($p > 0,05$).

✓ **Análise de covariância**

- Hipóteses para o intercepto

 H_0 : os interceptos das cinco curvas não são diferentes. H_1 : os interceptos das cinco curvas são diferentes.

- Hipóteses para a inclinação

 H_0 : as inclinações das cinco curvas não são diferentes. H_1 : as inclinações das cinco curvas são diferentes.**Análise de covariância**

FV	gl	Σx^2	Σxy	Σy^2	b	Redução devido à regressão		Desvios a partir da regressão			F	p
						gl	SQ	gl	SQ	QM		
Dentro								52	1,553	0,030		
reta 1A	11	0,796	2,860	10,344	3,5936	1	10,278	10	0,066	0,007		
reta 1B	11	0,796	2,829	10,386	3,5516	1	10,047	10	0,339	0,034		
reta 2	11	0,897	3,430	13,567	3,8248	1	13,119	10	0,448	0,045		
reta 3	12	0,930	3,349	12,271	3,5997	1	12,057	11	0,214	0,019		
reta 4	12	0,930	3,115	10,915	3,3479	1	10,429	11	0,485	0,044		
Reta comum	57	4,350	15,584	57,483	3,5823	1	55,826	56	1,658	0,030		
Diferença entre as inclinações								4	0,105	0,026	0,88	0,48
Entre	4	0,023	0,095	0,626								
Total	61	4,373	15,679	58,109		1	56,214	60	1,894			
Diferença entre os interceptos								4	0,237	0,059	2,00	0,11

- **Conclusões:** não há evidências para se rejeitar as hipóteses nulas, logo as inclinações e os interceptos das cinco curvas não são diferentes ($p > 0,05$). Portanto, as curvas analíticas não são diferentes.

APÊNDICE C – Método de difusão em ágar - Determinação de potência (100%): precisão e exatidão

Delineamento: retas paralelas 3x3

Amostra: gramicidina padrão

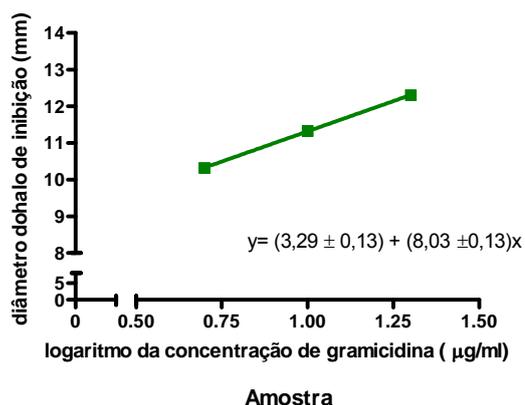
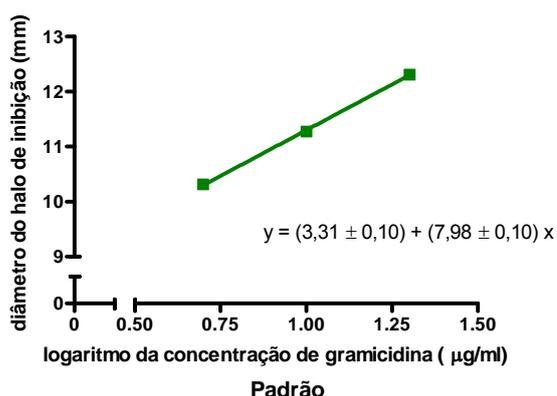
Concentrações da série padrão: 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml

Concentrações da série teste: 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml (nível: 100%)

✓ **Dados experimentais**

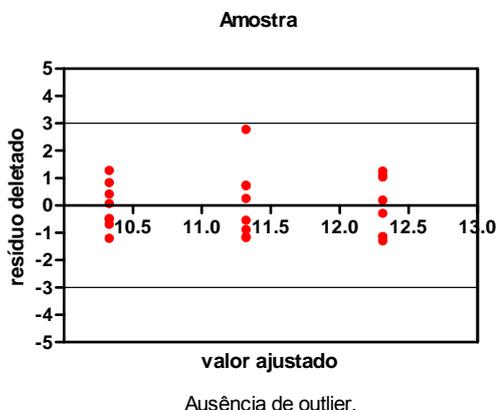
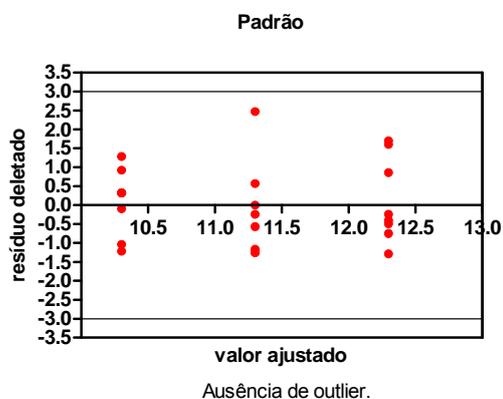
Placas	Padrão			Amostra		
	5,00	10,0	20,0	5,00	10,0	20,0
1	10,34	11,23	12,15	10,23	11,24	12,15
2	10,34	11,16	12,25	10,34	11,15	12,15
3	10,18	11,15	12,49	10,51	11,19	12,49
4	10,29	11,30	12,24	10,39	11,36	12,13
5	10,45	11,15	12,27	10,26	11,15	12,27
6	10,41	11,57	12,21	10,45	11,68	12,46
7	10,16	11,37	12,40	10,26	11,43	12,47
8	10,34	11,27	12,48	10,16	11,43	12,34

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**



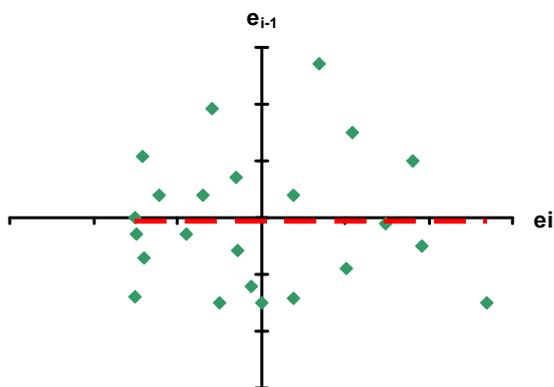
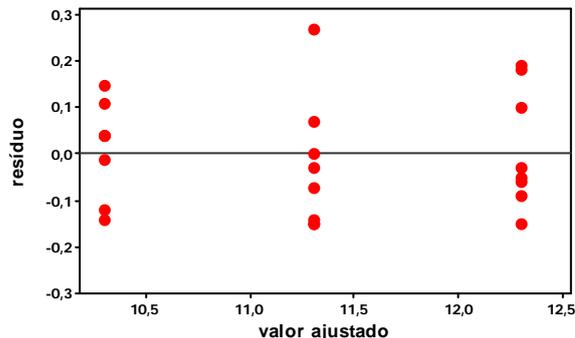
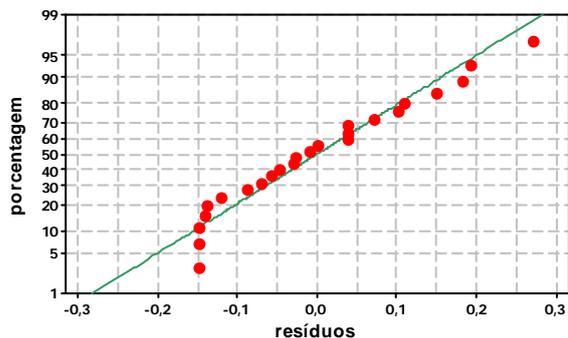
✓ **Tratamento de outlier**

- $n = 8$

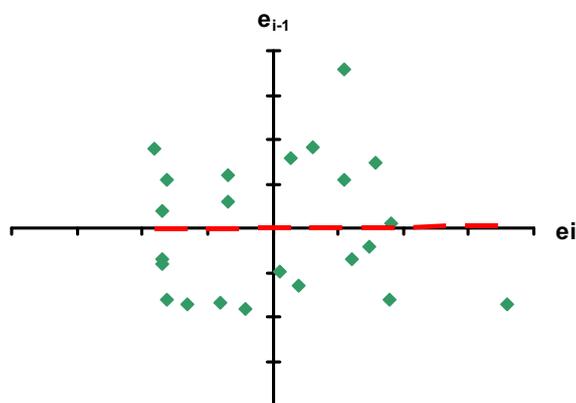
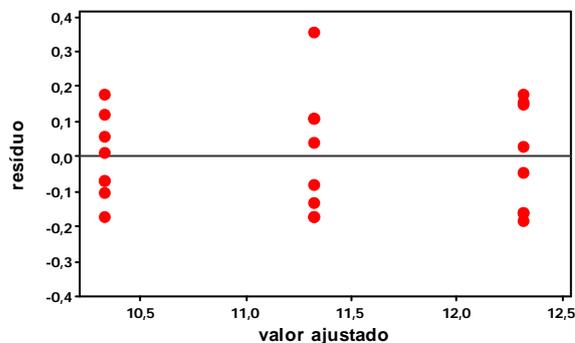
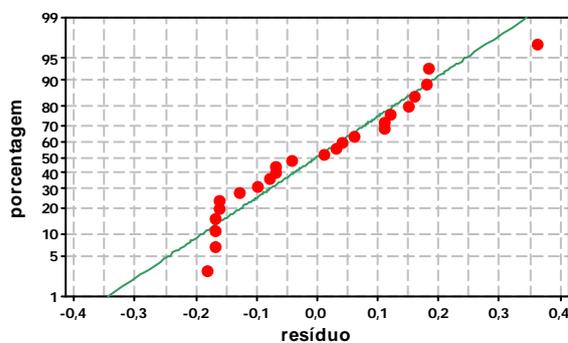


✓ **Análise de resíduos**

▪ **Padrão**



▪ **Amostra**



- Os resíduos da série padrão e da amostra apresentaram: normalidade, independência e homoscedasticidade.

✓ **Cálculo da potência**

R = 2

I = 0,301

E = 0,995

b = 3,3056

F = 0,020

log M = 0,00605

M = 1,0140

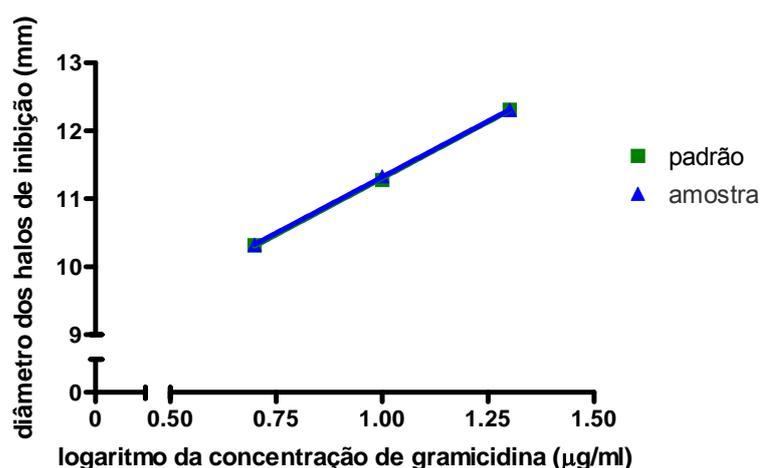
Potência = 101,40%✓ **Análise de variância****Coefficientes fatoriais**

Fonte	P ₁	P ₂	P ₃	A ₁	A ₂	A ₃	e _i	T _i	T _i ² /(n _{e_i})
Preparação	-1	-1	-1	1	1	1	6	0,48600	0,00562
Regressão	-1	0	1	-1	0	1	4	31,83600	36,19753
Paralelismo	1	0	-1	-1	0	1	4	-0,11600	0,00048
Curvatura quadrática	1	-2	1	1	-2	1	12	0,40400	0,00194
Curvatura quadrática oposta	-1	2	-1	1	-2	1	12	-0,80400	0,00770

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	F _{tab}
Preparação	1	0,00562	0,005624	0,34	0,562	4,12
Regressão	1	36,19753	36,19753	2208,39	3,24x10 ⁻³³	4,12
Paralelismo	1	0,00048	0,000481	0,03	0,865	4,12
Curvatura quadrática	1	0,00194	0,001943	0,12	0,733	4,12
Curvatura quadrática oposta	1	0,00770	0,007695	0,47	0,498	4,12
Tratamento	5	31,68662	6,337323			
Blocos	7	0,25914	0,037019	2,26	0,052	2,285
Resíduo	35	0,57368	0,016391			
Total	47	32,51943				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; paralelismo entre as retas e ausência de curvatura quadrática na mesma direção e em direção oposta.

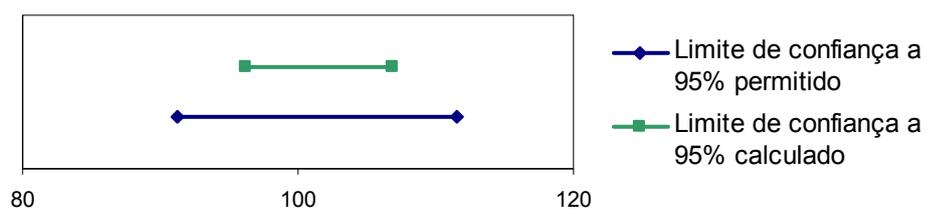
✓ **Limite de confiança a 95%**S_{xx} = 2,89981

g = 0,00213

t_{0,975} = 2,03s²_(M) = 0,00013s_(M) = 0,01118

Limite de confiança = 0,0061 ± 0,02270

Limite de confiança inferior = 96,24%**Limite de confiança superior = 106,84%**



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE D – Método de difusão em ágar - Determinação de potência (11,3 µg/ml): precisão e exatidão

Delineamento: 5x1

Amostra: gramicidina padrão

Concentrações da série padrão: 5,00; 7,50; 11,3 (R); 16,9 e 25,3 µg/ml

Concentração do teste: 11,3 µg/ml (nível médio)

✓ **Dados experimentais**

▪ *Curva analítica*

Placas	Médias corrigidas do diâmetro dos halos de inibição (mm)				
	5,00 µg/ml	7,50 µg/ml	11,3 µg/ml	16,9 µg/ml	25,3 µg/ml
1	10,48	11,13	11,75	12,50	13,03
2	10,49	11,23		12,24	13,10
3	10,49	11,19		12,31	13,09

▪ *Amostra*

Placas	Média do diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	Amostra (11,3 µg/ml)	11,3 µg/ml (R)
1	11,65	11,71
2	11,70	11,63
3	11,77	11,74

A curva analítica empregada neste doseamento é a mesma do experimento do Anexo A.6.

✓ **Cálculo da potência**

R = 1,5

l = 0,176

E = 0,6336

b = 3,5979

F = 0,0144

log M = 0,0040

M = 1,0093

Concentração = 11,40 µg/ml

Potência = 100,93%

✓ **Análise de variância**

Coeficientes fatoriais

Fonte	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	e _i	T _i	T _i ² /3e _i
Regressão	-2	-1	0	1	2	10	19,0067	12,0418
Curvatura quadrática	2	-1	-2	-1	2	14	0,2667	0,0017
Curvatura cúbica	-1	2	0	-2	1	10	0,7617	0,0193
Curvatura quártica	1	-4	6	-4	1	70	-0,1817	0,0002

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	F _{tab}
Preparação	1	0,0095	0,0095	1,8856	0,1997	4,96
Regressão	1	12,0418	12,0418	2,38x10 ³	0,0000	4,96
Curvatura quadrática	1	0,0017	0,0017	0,3346	0,5758	4,96
Curvatura cúbica	1	0,0193	0,0193	3,8217	0,0791	4,96
Curvatura quártica	1	0,0002	0,0002	0,0311	0,8636	4,96
Tratamento	5	12,0725	2,4145			
Resíduo	10	0,0506	0,0051			
Total	15	12,1231				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; e ausência de curvatura quadrática, cúbica e quártica.

✓ **Limite de confiança a 95%**

$$S_{xx} = 0,93034 \quad g = 0,00209 \quad t_{0,975} = 2,23 \quad s^2_{(M)} = 0,00016 \quad s_{(M)} = 0,01276$$

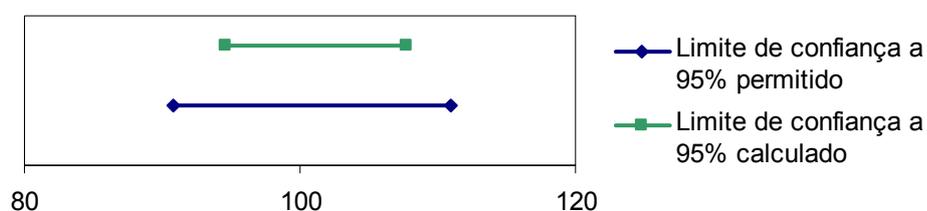
Limite de confiança = $0,0040 \pm 0,02844$

Limite de confiança inferior = $4,77 \mu\text{g/ml}$

Limite de confiança inferior = 94,53%

Limite de confiança superior = $5,49 \mu\text{g/ml}$

Limite de confiança superior = 107,76%



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE E – Método de difusão em ágar - Doseamento de gramicidina matéria-prima (3X3)

Delineamento: retas paralelas 3X3

Amostra: gramicidina matéria-prima

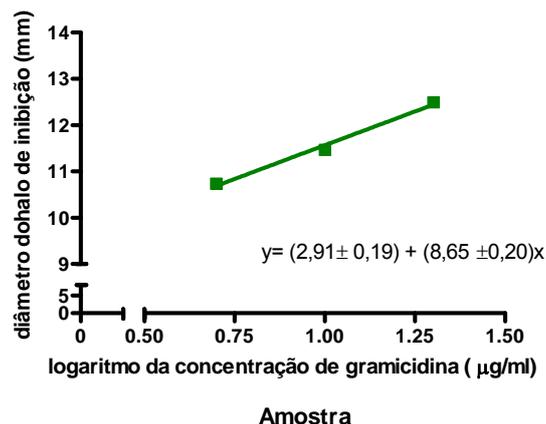
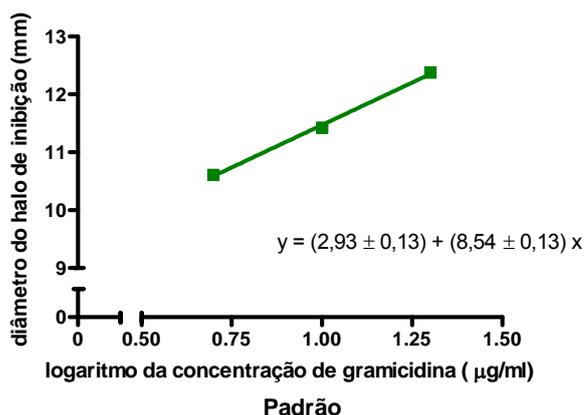
Concentrações da série padrão: 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml

Concentração do teste: 5,00; 10,0 e 20,0 µg/ml

✓ **Dados experimentais**

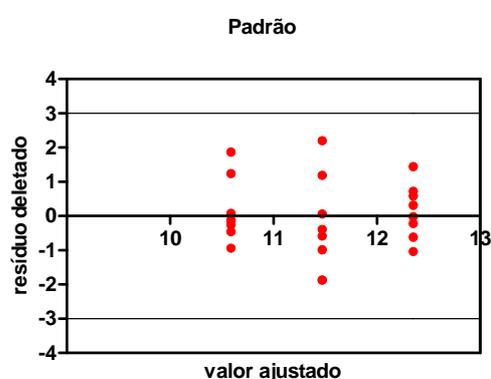
Placas	Padrão			Amostra		
	5,00	10,0	20,0	5,00	10,0	20,0
1	10,85	11,78	12,56	10,85	11,95	12,56
2	10,77	11,41	12,44	10,77	11,48	12,67
3	10,57	11,65	12,46	10,57	11,46	12,64
4	10,45	11,48	12,40	10,59	11,47	12,51
5	10,60	11,20	12,20	10,59	11,20	12,45
6	10,52	11,38	12,26	10,59	11,50	12,24
7	10,57	11,20	12,32	10,59	11,35	12,22
8	10,55	11,32	12,35	11,36	11,34	12,65

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**

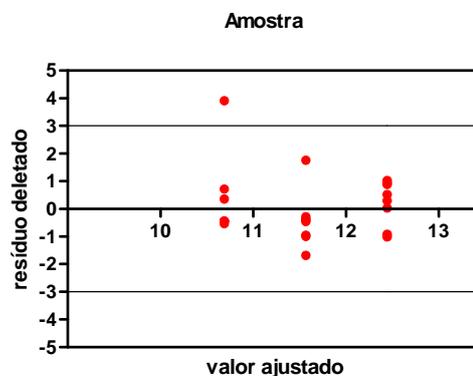


✓ **Tratamento de outlier**

▪ **n = 8**

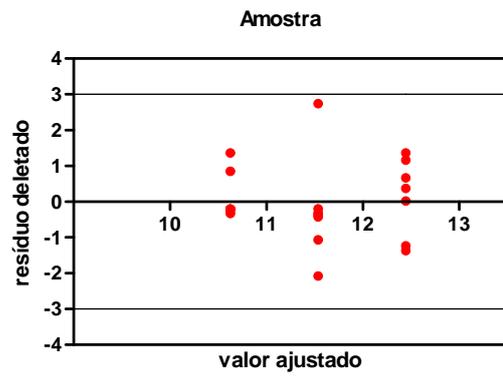
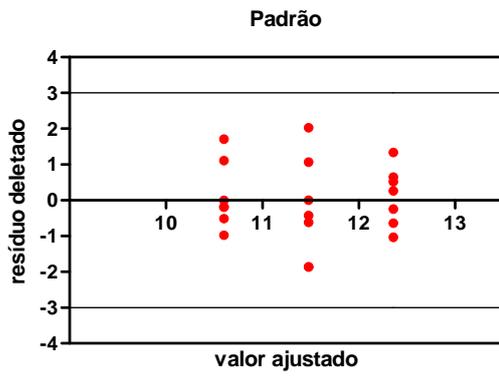


Ausência de outlier.



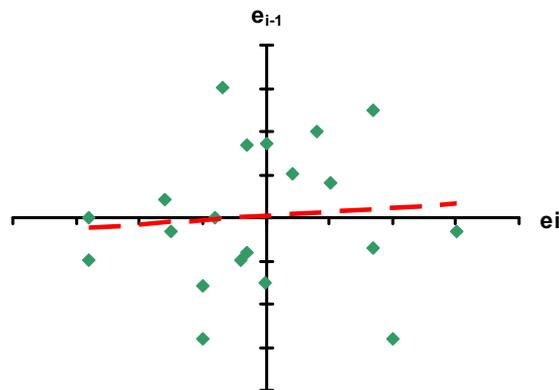
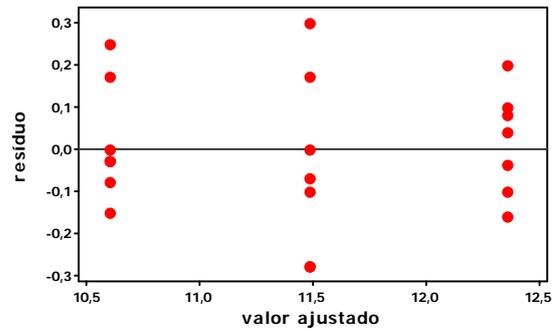
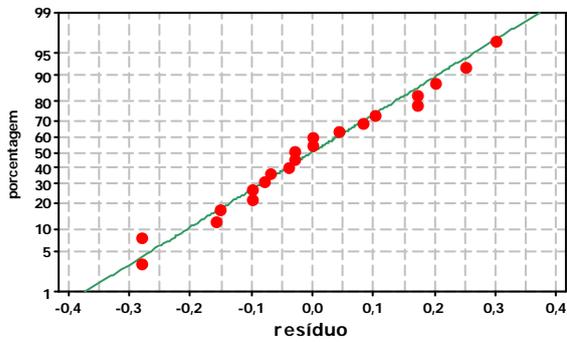
Presença de um outlier: $x = 0,699 \mu\text{g/ml}$
e $y = 11,63 \text{ mm}$.

- $n = 7$

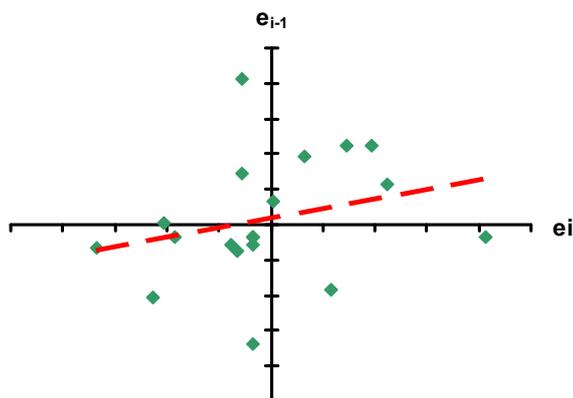
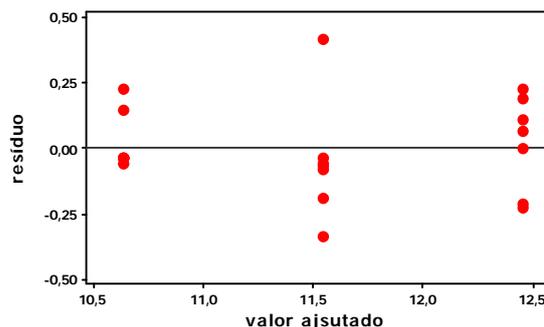
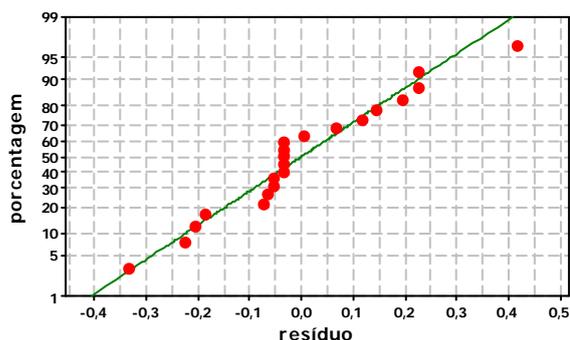


Análise de resíduos

- **Padrão**



▪ **Amostra**



- Os resíduos da série padrão e da amostra apresentaram: normalidade, independência e homoscedasticidade.

✓ **Cálculo da potência**

R = 2 I = 0,301 E = 0,895 b = 2,9734
 F = 0,056 log M = 0,01883 M = 1,0443 **Potência = 104,43%**

✓ **Análise de variância**

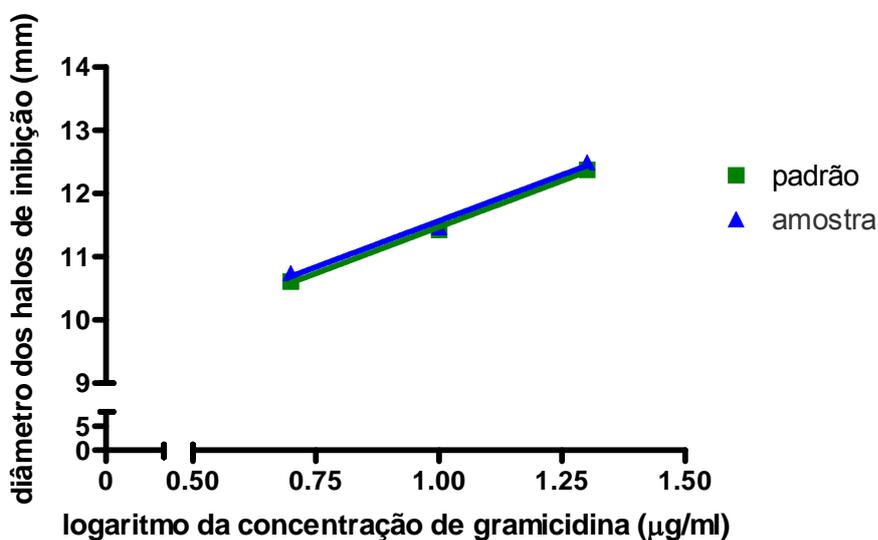
Coefficientes fatoriais

Fonte	P ₁	P ₂	P ₃	A ₁	A ₂	A ₃	e _i	T _i	T _i ² /(ne _i)
Preparação	-1	-1	-1	1	1	1	6	1,1800	0,0332
Regressão	-1	0	1	-1	0	1	4	25,0500	22,4108
Paralelismo	1	0	-1	-1	0	1	4	0,4300	0,0066
Curvatura quadrática	1	-2	1	1	-2	1	12	1,7900	0,0381
Curvatura quadrática oposta	-1	2	-1	1	-2	1	12	0,2500	0,0007

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	F _{tab}
Preparação	1	0,0332	0,0332	2,46	0,128	4,20
Regressão	1	22,4108	22,4108	1,66x10 ³	0,000	4,20
Paralelismo	1	0,0066	0,0066	0,49	0,490	4,20
Curvatura quadrática	1	0,0381	0,0381	2,82	0,104	4,20
Curvatura quadrática oposta	1	0,0007	0,0007	0,06	0,816	4,20
Tratamento	5	22,4894	4,4979			
Blocos	7	0,7020	0,1003	7,43	0,000	2,359
Resíduo	28	0,3781	0,0135			
Total	41	23,56956				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; paralelismo entre as retas e ausência de curvatura quadrática na mesma direção e em direção oposta.



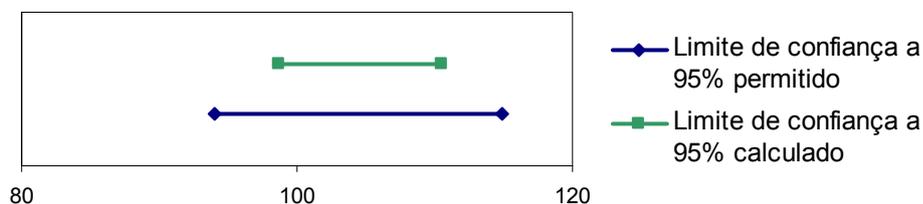
✓ **Limite de confiança a 95%**

$S_{xx} = 2,53733$ $g = 0,00253$ $t_{0,975} = 2,05$ $s^2_{(M)} = 0,00015$ $s_{(M)} = 0,01207$

Limite de confiança = $0,0188 \pm 0,02472$

Limite de confiança inferior = 98,65%

Limite de confiança superior = 110,55%



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE F – Método de difusão em ágar - Doseamento de gramicidina matéria-prima (5X1)

Delineamento: 5x1

Amostra: gramicidina matéria-prima

Concentrações da série padrão: 5,00; 7,50; 11,3 (R); 16,9 e 25,3 µg/ml

Concentração do teste: 11,3 µg/ml

✓ **Dados experimentais**

▪ **Curva analítica**

Placas	Médias corrigidas do diâmetro dos halos de inibição (mm)				
	5,00 µg/ml	7,50 µg/ml	11,3 µg/ml	16,9 µg/ml	25,3 µg/ml
1	10,48	11,13	11,75	12,50	13,03
2	10,49	11,23		12,24	13,10
3	10,49	11,19		12,31	13,09

▪ **Amostra**

Placas	Média do diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	Amostra (11,3 µg/ml)	11,3 µg/ml (R)
1	11,81	11,66
2	11,66	11,72
3	11,84	11,70

A curva analítica empregada neste doseamento é a mesma do experimento do Anexo A.6.

✓ **Cálculo da potência**

$$R = 1,5 \quad I = 0,176 \quad E = 0,6336 \quad b = 3,5979 \quad F = 0,0767$$

$$\log M = 0,0213 \quad M = 1,0503 \quad \text{Concentração} = 11,87 \mu\text{g/ml} \quad \boxed{\text{Potência} = 105,03\%}$$

✓ **Análise de variância**

Coeficientes fatoriais

Fonte	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	e _i	T _i	T _i ² /3e _i
Regressão	-2	-1	0	1	2	10	19,0067	12,0418
Curvatura quadrática	2	-1	-2	-1	2	14	0,2667	0,0017
Curvatura cúbica	-1	2	0	-2	1	10	0,7617	0,0193
Curvatura quártica	1	-4	6	-4	1	70	-0,1817	0,0002

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	F _{tab}
Preparação	1	6,05x10 ⁻⁶	6,05x10 ⁻⁶	0,0010	0,975	4,96
Regressão	1	12,0418	12,0418	1,99x10 ³	0,000	4,96
Curvatura quadrática	1	0,0017	0,0017	0,2796	0,609	4,96
Curvatura cúbica	1	0,0193	0,0193	3,1934	0,104	4,96
Curvatura quártica	1	0,0002	0,0002	0,0260	0,875	4,96
Tratamento	5	12,0630	2,4126			
Resíduo	10	0,0606	0,0061			
Total	15	12,1235				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; e ausência de curvatura quadrática, cúbica e quártica.

✓ **Limite de confiança a 95%**

$S_{xx} = 0,93034$

$g = 0,0025$

$t_{0,975} = 2,23$

$s^2_{(M)} = 0,0002$

$s_{(M)} = 0,0140$

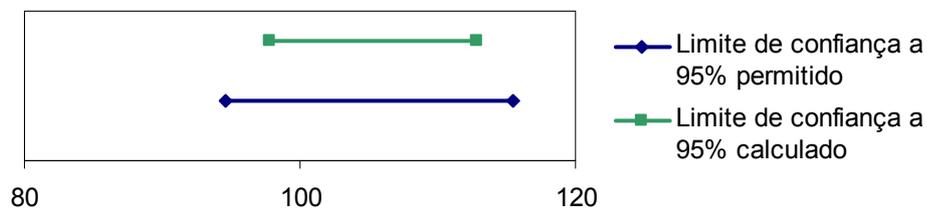
Limite de confiança = $0,0213 \pm 0,0311$

Limite de confiança inferior = 11,05 $\mu\text{g/ml}$

Limite de confiança inferior = 97,76%

Limite de confiança superior = 12,75 $\mu\text{g/ml}$

Limite de confiança superior = 112,83%



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE G – Método de difusão em ágar - Combinação de resultados de ensaios repetidos

Delineamento: retas paralelas 3x3

Réplicas	Potência (%)	log M	GL	g	$s^2_{(M)}$	W	W(log M)
1	106,99	0,02934	35	0,00298	0,00018	5706,198	167,438
2	106,50	0,02735	28	0,00495	0,00029	3494,737	95,580
3	105,68	0,02399	35	0,00506	0,00030	3361,774	80,658
4	104,43	0,01883	28	0,00253	0,00015	6864,887	129,233
5	103,83	0,01632	28	0,00353	0,00020	4920,335	80,314

$$\log \bar{M} = 0,02272$$

$$s^2_{(\bar{M})} = 4,11 \times 10^{-5}$$

$$\text{Limite de confiança} = 0,02272 \pm 0,0127$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 102,34\%$$

$$\bar{M} = 1,0537$$

$$s_{(\bar{M})} = 0,0064$$

Potência = 105,37%

$$t_{0,975} = 1,98$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 108,49\%$$

Delineamento: retas paralelas 5x1

Réplicas	Potência (%)	log M	GL	g	$s^2_{(M)}$	W	W(log M)
1	105,89	0,02485	10	0,00359	0,00028	3564,675	88,5998
2	105,03	0,02131	10	0,00250	0,00020	5124,396	109,2181
3	105,29	0,02239	10	0,00205	0,00016	6235,944	139,6049
4	106,53	0,02747	10	0,00193	0,00015	6628,571	182,0996
5	103,10	0,01326	10	0,00261	0,00020	4908,317	65,0777

$$\log \bar{M} = 0,02209$$

$$s^2_{(\bar{M})} = 3,78 \times 10^{-5}$$

$$\text{Limite de confiança} = 0,02209 \pm 0,0124$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 102,27\%$$

$$\bar{M} = 1,0522$$

$$s_{(\bar{M})} = 0,0062$$

Potência = 105,22%

$$t_{0,975} = 2,01$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 108,25\%$$

APÊNDICE H – Método turbidimétrico - Análise de regressão não linear: regressão polinomial quadrática

Seleção do diluente

Amostra: gramicidina

Diluyente: álcool etílico a 95%

Concentrações: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56 µg/ml

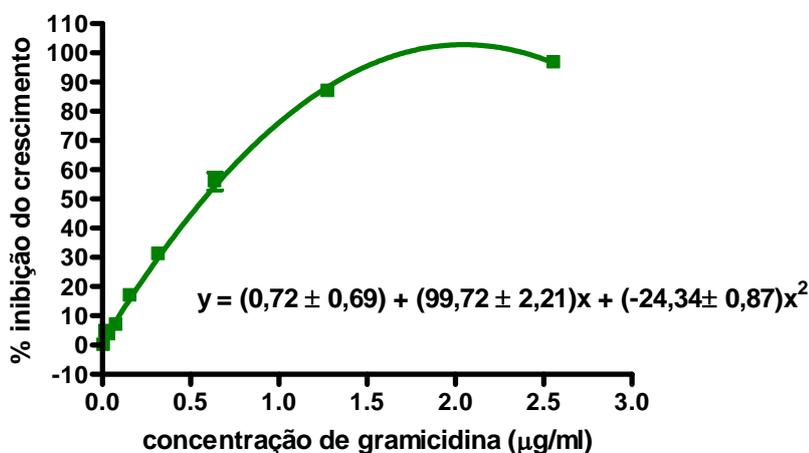
✓ **Dados experimentais**

Tubos	Absorvância									
	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28	2,56	Branco inoculado
1	0,533	0,507	0,511	0,493	0,430	0,378	0,202	0,068	0,014	0,535
2	0,530	0,497	0,510	0,487	0,443	0,372	0,243	0,065	0,010	0,520
3	0,527	0,511	0,512	0,500	0,448	0,345	0,255	0,075	0,028	0,536

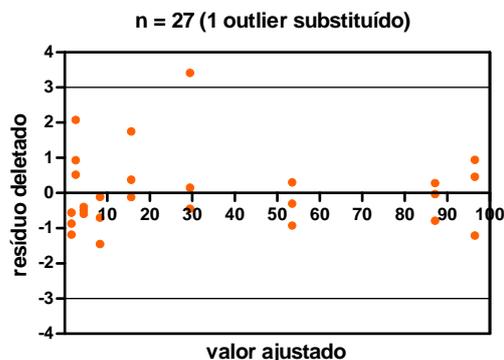
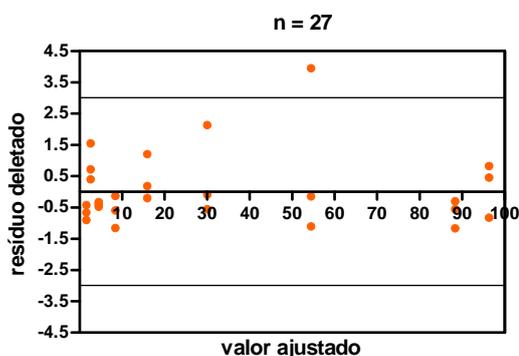
Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo									
	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28	2,56	
1	-0,50	4,40	3,65	7,04	18,92	28,72	61,91	87,18	97,36	
2	0,06	6,29	3,83	8,17	16,47	29,86	54,18	87,74	98,11	
3	0,63	3,65	3,46	5,72	15,52	34,95	51,92	85,86	94,72	

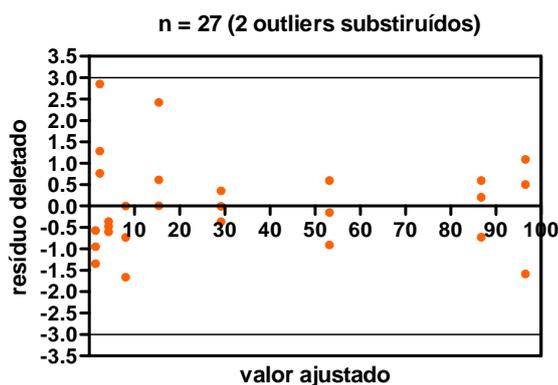
✓ **Análise de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados**

▪ **Regressão polinomial quadrática**



✓ **Tratamento de outlier**





Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo								
	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28	2,56
1	-0,50	4,40	3,65	7,04	18,92	28,72	53,05	87,18	97,36
2	0,06	6,29	3,83	8,17	16,47	29,86	54,18	87,74	98,11
3	0,63	3,65	3,46	5,72	15,52	29,29	51,92	85,86	94,72

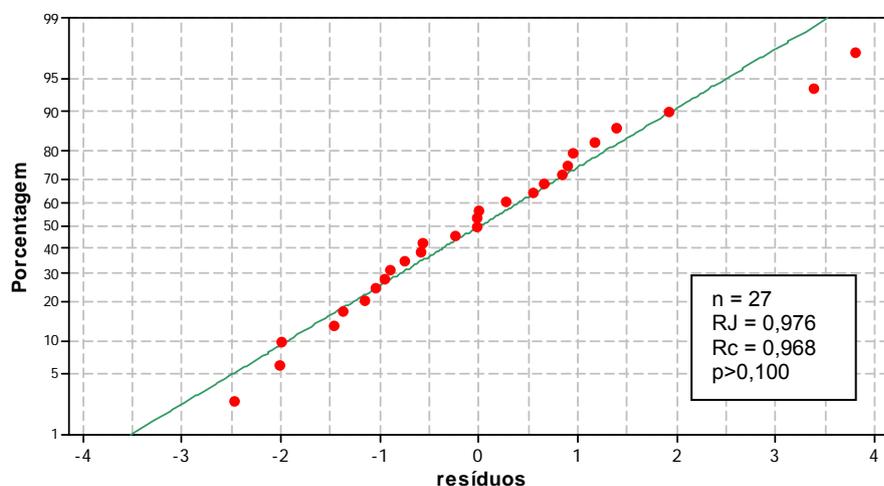
- Foram identificados dois outliers que foram substituídos pela média das demais réplicas de mesma concentração.

✓ **Teste de normalidade (Ryan-Joiner)**

- Hipóteses

H₀: os resíduos seguem a distribuição normal.

H₁: os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade.



- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo os resíduos seguem a distribuição normal ($p > 0,10$).

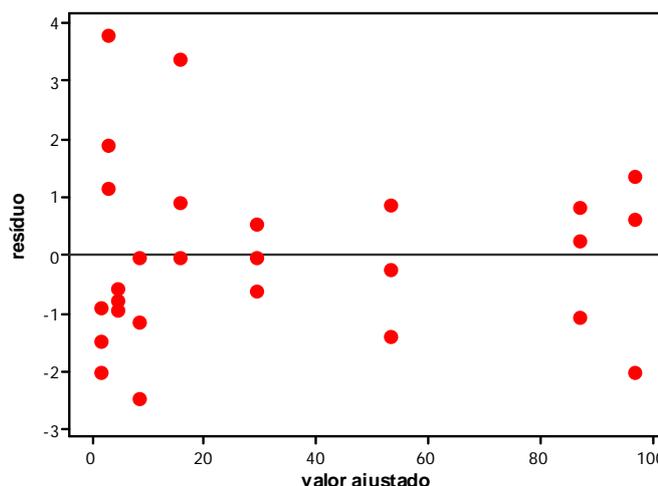
✓ **Homoscedascidade (teste de Levene modificado por Brown e Forsythe)**

- Hipóteses

H₀: as variâncias dos resíduos não são diferentes.

H₁: as variâncias dos resíduos são diferentes.

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
n	15	12
Mediana	-0,5849	0,1181
Média da diferenças entre cada resíduo e a mediana	1,4036	0,8218
Soma de quadrados dos desvios	24,5962	3,8527
Variância combinada	1,1380	
Estatística t de Levene	1,4081	
$t_{0,975}$	2,0595	
p	$p > 0,05$	



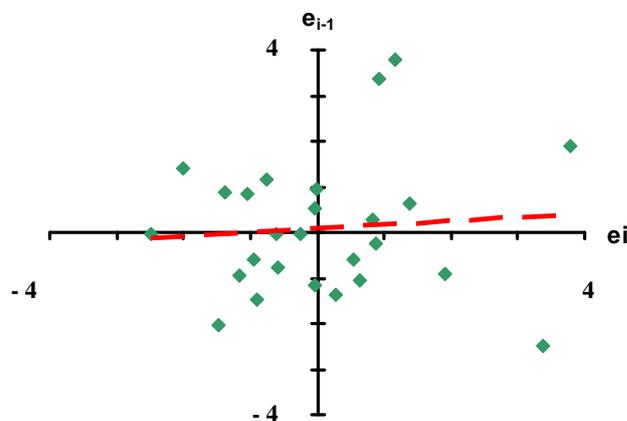
- *Conclusão:* não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo as variâncias dos resíduos não são diferentes ($p > 0,05$).

✓ **Independência dos resíduos (Teste de Durbin-Watson)**

- *Hipóteses*

H_0 : não há autocorrelação entre os resíduos.

H_1 : há autocorrelação entre os resíduos.



Estatística de Durbin-Watson = 1,70 ($p > 0,10$)

- *Conclusão:* não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo os resíduos são independentes ($p > 0,10$).

✓ **Análise de regressão linear simples**

▪ **Estatística da regressão**

$r = 0,93$	$r^2 = 0,998$	r^2 (ajustado) = 0,998	$Sy.x = 1,577$
------------	---------------	--------------------------	----------------

▪ **Estimativa dos parâmetros, significância e intervalo de confiança**

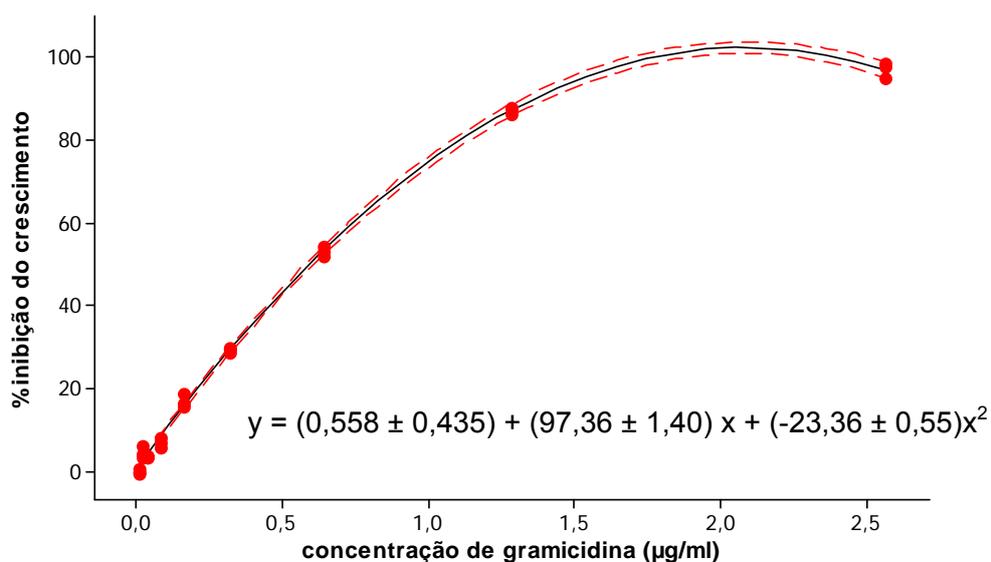
Coefficiente	valor	EP	IC95% inferior	IC95% superior
a	0,558	0,435	-0,341	1,456
b	97,36	1,40	94,48	100,2
c	-23,36	0,55	-24,50	-22,22

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	F	p	Significância
componente linear	1	28697,6	158,95	0,000	p<0,001
Componente quadrática	1	4454,1	1791,58	0,000	p<0,001

▪ **Análise de variância**

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p	Significância
regressão	2	33151,7	16575,85	6108,44	0,000	p<0,001
resíduo	22	59,7	2,7136			
Total	26	3559,5				

✓ **Gráfico de concentração versus porcentagem de inibição do crescimento**



APÊNDICE I – Método turbidimétrico - obtenção da curva analítica

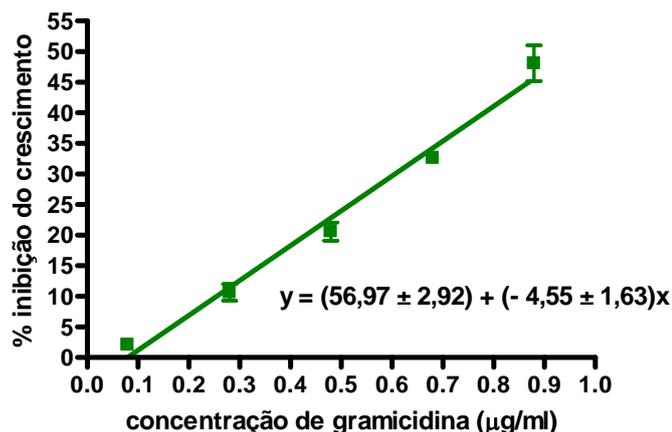
Amostra: gramicidina padrão (curva do dia 2)
 Concentrações: 0,08; 0,28; 0,48; 0,68; 0,88 µg/ml

✓ **Dados experimentais**

Tubos	Absorvância					Branco inoculado
	0,08	0,28	0,48	0,68	0,88	
1	0,836	0,740	0,654	0,572	0,472	0,850
2	0,828	0,769	0,698	0,572	0,394	0,850
3	0,844	0,779	0,682	0,582	0,464	0,861

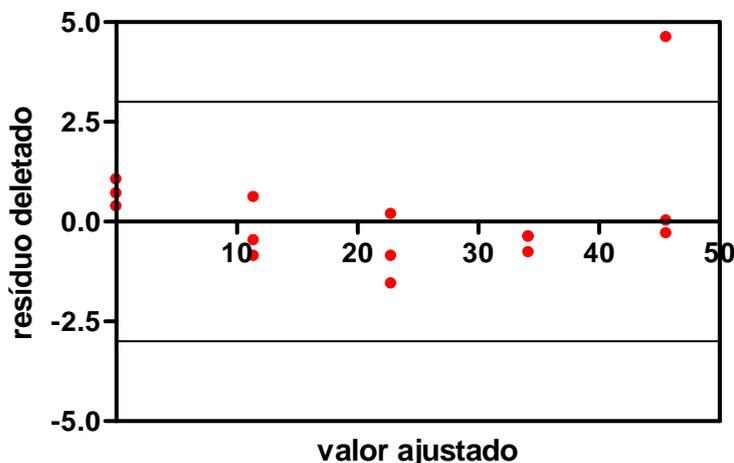
Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo				
	0,08	0,28	0,48	0,68	0,88
1	2,07	13,32	23,39	32,99	44,71
2	3,01	9,92	18,24	32,99	53,85
3	1,13	8,75	20,11	31,82	45,65

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**



✓ **Tratamento de outlier**

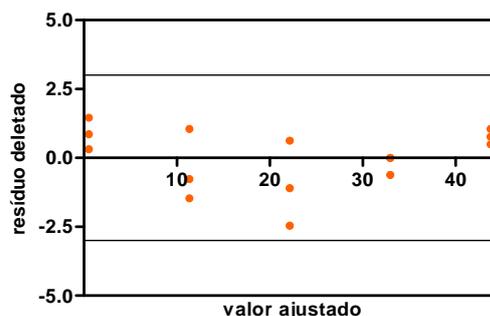
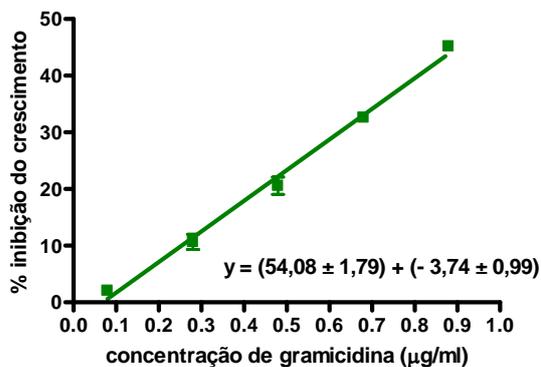
- n = 15



- Identificação de um outlier: y= 53,85 uA; x = 0,88 µg/ml

- $n = 15$ (substituição do outlier pela média das demais réplicas da concentração 0,88 µg/ml)

Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo				
	0,08	0,28	0,48	0,68	0,88
1	2,07	13,32	23,39	32,99	44,71
2	3,01	9,92	18,24	32,99	45,18
3	1,13	8,75	20,11	31,82	45,65

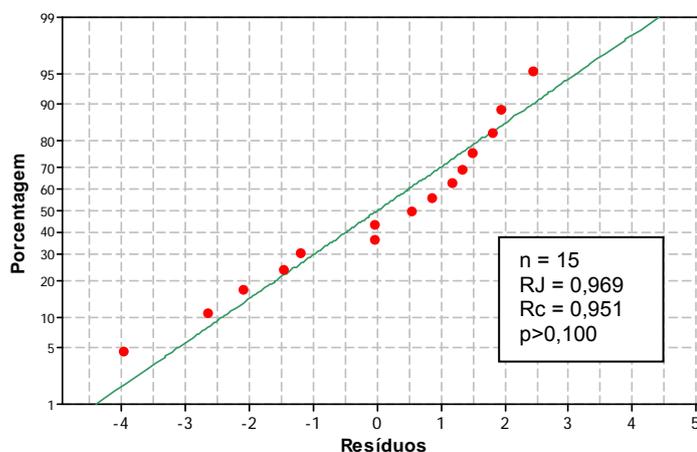


✓ **Teste de normalidade (Ryan-Joiner)**

- Hipóteses

H_0 : os resíduos seguem a distribuição normal.

H_1 : os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade.



- Conclusão: não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo os resíduos seguem a distribuição normal ($p > 0,10$).

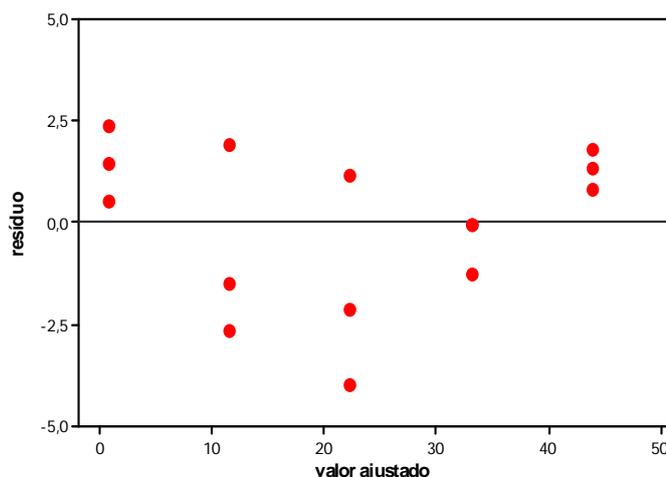
✓ **Homoscedascidade (teste de Levene modificado por Brown e Forsythe)**

- Hipóteses

H_0 : as variâncias dos resíduos não são diferentes.

H_1 : as variâncias dos resíduos são diferentes.

Estadística	Grupo 1	Grupo 2
n	9	6
Mediana	0,5427	0,4078
Média da diferenças entre cada resíduo e a mediana	1,9829	0,8822
Soma de quadrados dos desvios	13,4993	1,3640
Variância combinada	1,1433	
Estatística t de Levene	1,9532	
$t_{0,975}$	2,1604	
p	p>0,05	



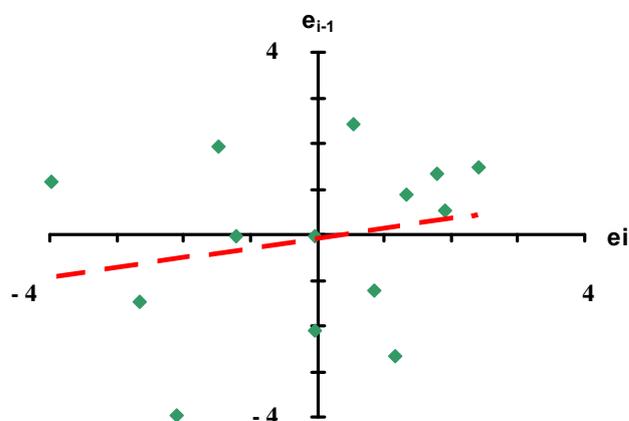
- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo as variâncias dos resíduos não são diferentes ($p>0,05$).

✓ **Independência dos resíduos (Teste de Durbin-Watson)**

- **Hipóteses**

H_0 : não há autocorrelação entre os resíduos.

H_1 : há autocorrelação entre os resíduos.



Estatística de Durbin-Watson = 1,48 ($p>0,10$)

- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo os resíduos são independentes ($p>0,10$).

✓ **Análise de regressão linear simples**

▪ **Estatística da regressão**

$r = 0,993$	$r^2 = 0,986$	r^2 (ajustado) = 0,985	$Sy.x = 1,964$
-------------	---------------	--------------------------	----------------

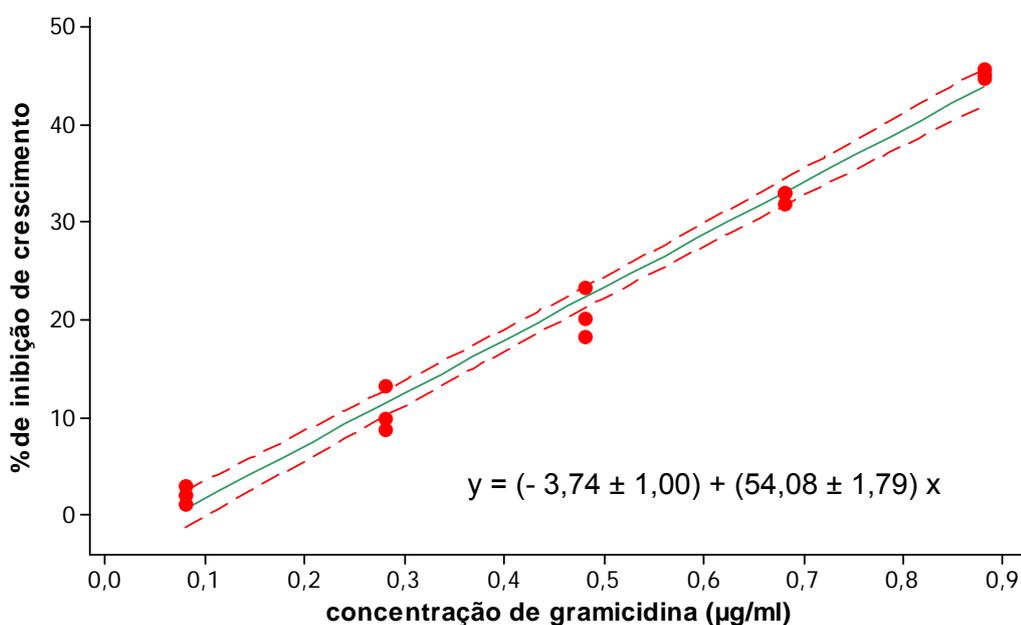
▪ **Estimativa dos parâmetros, significância e intervalo de confiança**

Coefficiente	valor	EP	t	p	IC95% inferior	IC95% superior
linear	-3,74	1,00	-3,74	0,002	-5,90	-1,58
angular	54,08	1,79	30,16	0,000	50,21	57,95

▪ **Análise de variância**

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p	Significância
regressão	1	3509,4	3509,4	835,57	0,000	p<0,001
resíduo	12	50,2	4,2			
falta de ajuste	3	22,2	7,4	2,39	0,136	p>0,05
erro puro	9	28,0	3,1			
Total	14	3559,5				

✓ **Gráfico de logaritmo da concentração versus média corrigida dos halos de inibição**



APÊNDICE J – Método turbidimétrico - Análise de covariância: comparação entre as cinco curvas analíticas da linearidade

Amostra: gramicidina padrão

Concentrações: 0,08; 0,28; 0,48; 0,68 e 0,88 µg/ml

✓ **Dados experimentais**

Curvas analíticas	Porcentagem de inibição do crescimento microbiano				
	0,08 µg/ml	0,28 µg/ml	0,48 µg/ml	0,68 µg/ml	0,88 µg/ml
1 A	1,89	11,04	20,54	37,80	45,79
	0,97	10,23	24,36	36,41	49,38
	2,24	10,23	24,83	36,64	45,44
1 B	2,17	12,00	20,53	31,90	44,45
	2,88	9,99	18,87	31,43	47,53
	3,00	8,45	23,25	41,97	45,99
2	2,07	13,32	23,39	32,99	44,71
	3,01	9,92	18,24	32,99	45,65
	1,13	8,75	20,11	31,82	⁽¹⁾
3	2,35	10,09	24,53	36,74	49,30
	1,64	9,86	20,66	35,21	48,12
	1,76	7,63	23,00	32,86	44,60

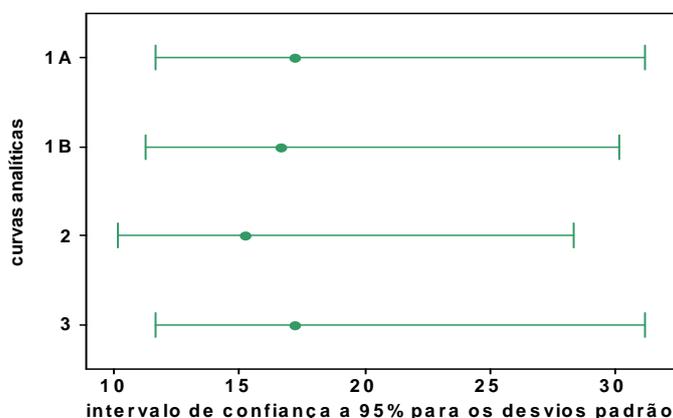
⁽¹⁾ Identificação de um outlier por cálculos estatísticos. Este dado não foi repostado.

✓ **Homoscedascidade (teste de Bartlett)**

- Hipóteses

H₀: as variâncias das respostas das cinco curvas analíticas não são diferentes.

H₁: as variâncias das respostas das cinco curvas analíticas são diferentes.



Estatística de Bartlett = 0,26
p = 0,967

- **Conclusão:** não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, logo as variâncias das respostas das curvas não são diferentes ($p > 0,05$).

✓ **Análise de covariância**

- Hipóteses para o intercepto

H₀: os interceptos das quatro curvas não são diferentes.

H₁: os interceptos das quatro curvas são diferentes.

- Hipóteses para a inclinação

H₀: as inclinações das quatro curvas não são diferentes.

H₁: as inclinações das quatro curvas são diferentes.

Análise de covariância

FV	gl	Σx^2	Σxy	Σy^2	b	Redução devido à regressão		Desvios a partir da regressão			F	p
						gl	SQ	gl	SQ	QM		
Dentro								51	284,25	5,573		
reta 1A	14	1,200	70,074	4135,2	58,395	1	4.091,9	13	43,251	3,327		
reta 1B	14	1,200	66,940	3864,4	55,783	1	3.734,1	13	130,23	10,02		
reta 2	13	1,029	55,053	2994,6	53,524	1	2.946,7	12	47,940	3,995		
reta 3	14	1,200	69,954	4140,8	58,295	1	4.077,9	13	62,830	4,833		
Reta comum	55	4,629	262,02	15135	56,610	1	14.833	54	302,09	5,594		
Diferença entre as inclinações								3	17,845	5,948	1,07	0,37
Entre	3	0,009	0,844	88,056								
Total	58	4,637	262,9	15223,1		1	14900,6	57	322,48			
Diferença entre os interceptos								3	20,388	6,796	1,21	0,31

- *Conclusões*: não há evidências para se rejeitar as hipóteses nulas, logo as inclinações e os interceptos das quatro curvas não são diferentes ($p > 0,05$). Portanto, as curvas analíticas não são diferentes.

APÊNDICE K – Método Turbidimétrico - Determinação de potência (100%): precisão e exatidão

Delineamento: retas paralelas 3x3

Amostra: gramicidina padrão

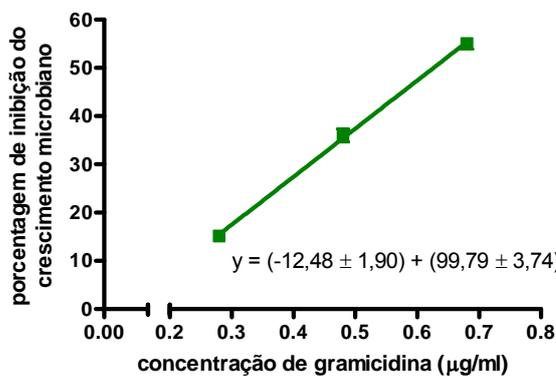
Concentrações da série padrão: 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml

Concentrações da série teste: 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml (nível: 100%)

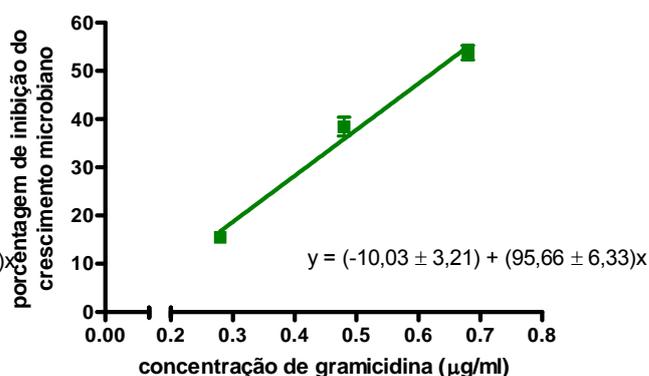
✓ **Dados experimentais**

Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento					
	Padrão			Amostra		
	0,28	0,48	0,68	0,28	0,48	0,68
1	15,57	35,58	56,29	14,19	34,66	53,41
2	16,14	33,86	56,29	16,03	39,49	56,52
3	13,84	38,46	52,72	16,26	41,10	51,34

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**



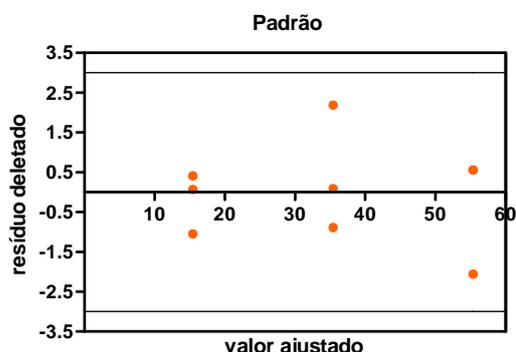
Padrão



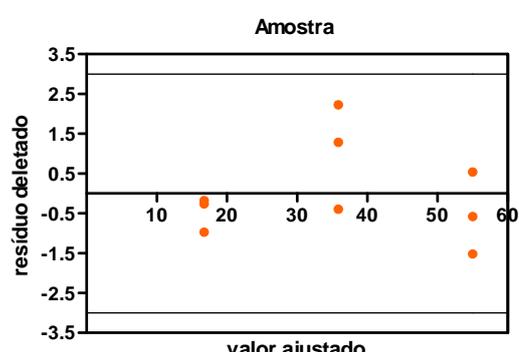
Amostra

Tratamento de outlier

- **n = 9 (padrão e amostra)**



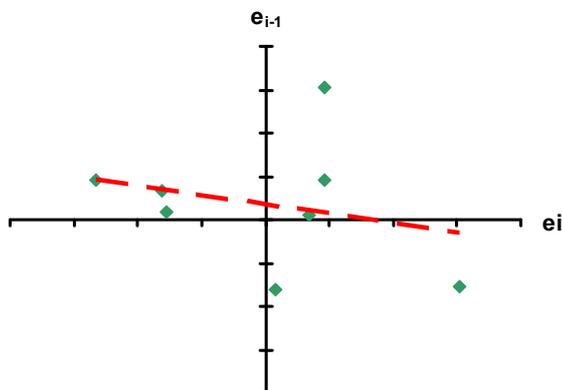
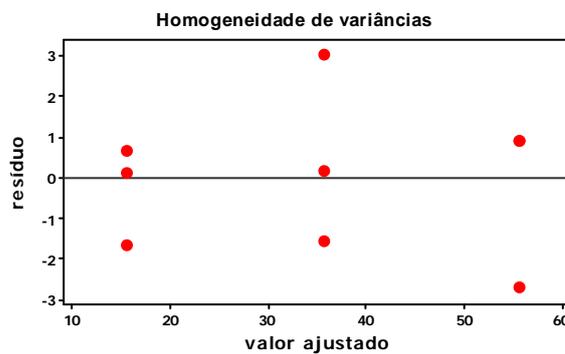
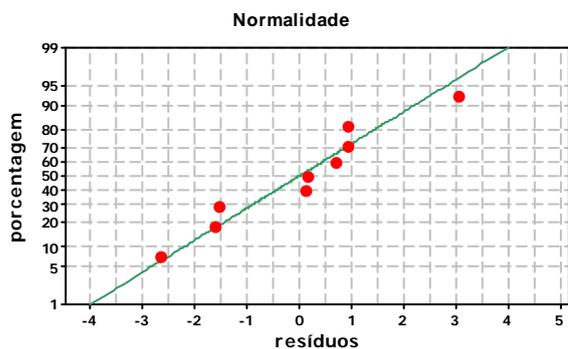
Ausência de outlier.



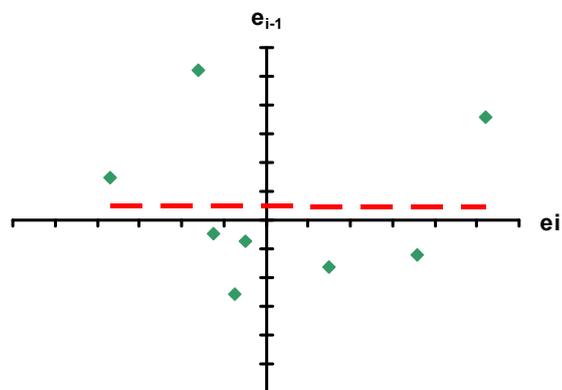
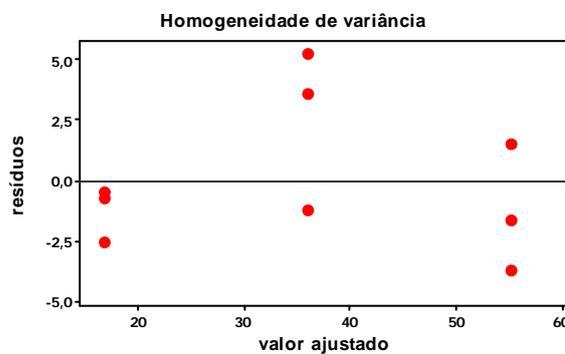
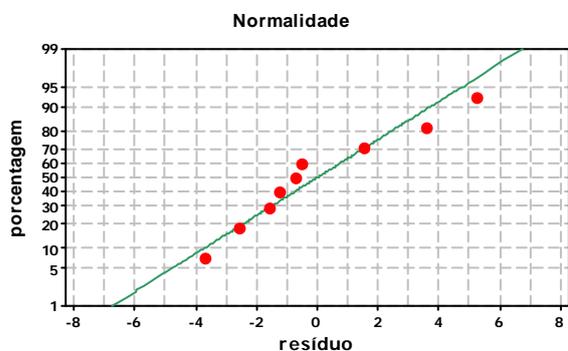
Ausência de outlier.

✓ **Análise de resíduos**

▪ **Padrão**



▪ **Amostra**



- Os resíduos da série padrão e da amostra apresentaram: normalidade, independência e homoscedasticidade.

✓ **Cálculo da potência**

I = 0,20 E = 19,55 b = 97,72814 F = 0,47
 D = 0,004839 x_A = 0,48 M = 1,0101 **Potência = 101,01%**

✓ **Análise de variância**

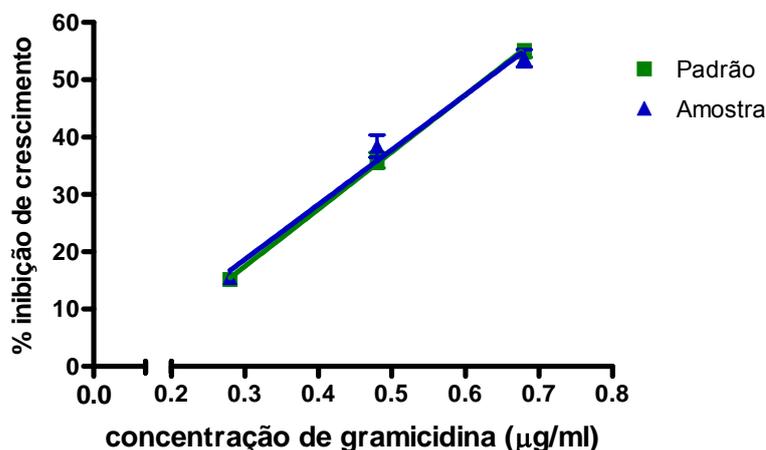
Coefficientes fatoriais

Fonte	P ₁	P ₂	P ₃	A ₁	A ₂	A ₃	e _i	T _i	T _i ² /(n _{e_i)}
Preparação	-1	-1	-1	1	1	1	6	4,2561	1,0064
Regressão	-1	0	1	-1	0	1	4	234,5475	4584,3793
Paralelismo	1	0	-1	-1	0	1	4	-4,9463	2,0388
Curvatura quadrática	1	-2	1	1	-2	1	12	-27,7224	21,3481
Curvatura quadrática oposta	-1	2	-1	1	-2	1	12	-17,8298	8,8306

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	F _{tab}
Preparação	1	1,0064	1,006	0,1987	0,664	4,75
Regressão	1	4584,3793	4584,379	905,1207	0,000	4,75
Paralelismo	1	2,0388	2,039	0,4025	0,538	4,75
Curvatura quadrática	1	21,3481	21,348	4,2149	0,063	4,75
Curvatura quadrática oposta	1	8,8306	8,831	1,7435	0,211	4,75
Tratamento	5	4617,6031	923,5206			
Resíduo	12	60,7792	5,0649			
Total	17	4678,3824				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; paralelismo entre as retas e ausência de curvatura quadrática na mesma direção e em direção oposta.



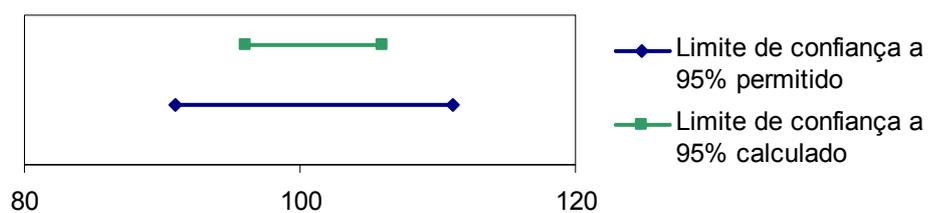
✓ **Limite de confiança a 95%**

S_{xx} = 0,4800 g = 0,0052 t_{0,975} = 2,18 s²_(D) = 0,0001 s_(D) = 0,0109

Limite de confiança = 0,0048 ± 0,0237

Limite de confiança inferior = 96,08%

Limite de confiança superior = 105,94%



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

**APÊNDICE L – Método Turbidimétrico - Determinação de potência (0,48 µg/ml):
precisão e exatidão**

Delineamento: 5x1

Amostra: gramicidina padrão

Concentrações da série padrão: 0,08; 0,28; 0,48; 0,68 e 0,88 µg/ml

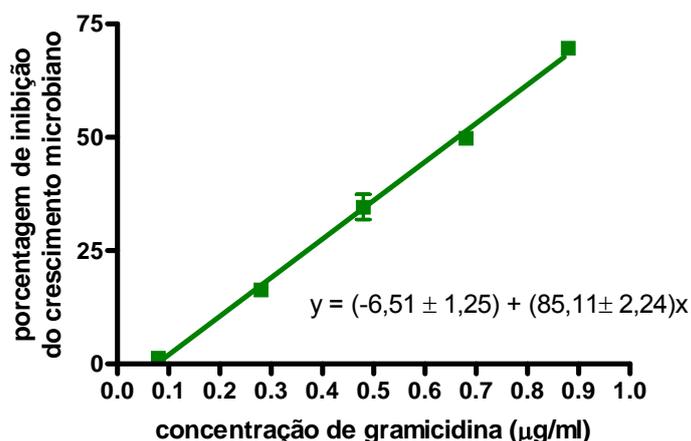
Concentrações do teste: 0,48 µg/ml (nível médio)

✓ **Dados experimentais**

▪ **Curva analítica e amostra**

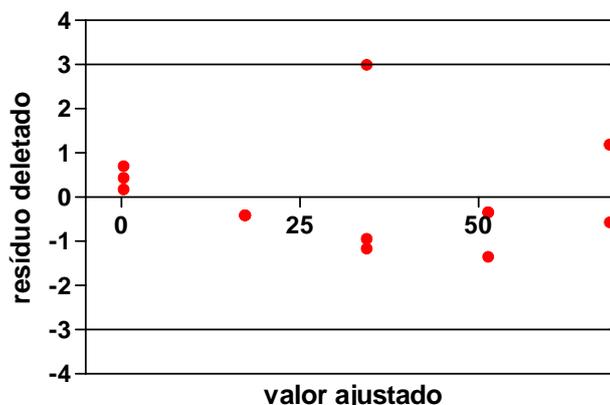
Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo					Teste
	0,08	0,28	0,48	0,68	0,88	
1	1,28	16,34	40,14	50,53	70,95	33,96
2	1,87	16,34	31,62	48,31	70,95	32,09
3	0,70	16,34	32,09	50,53	67,09	38,97

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**

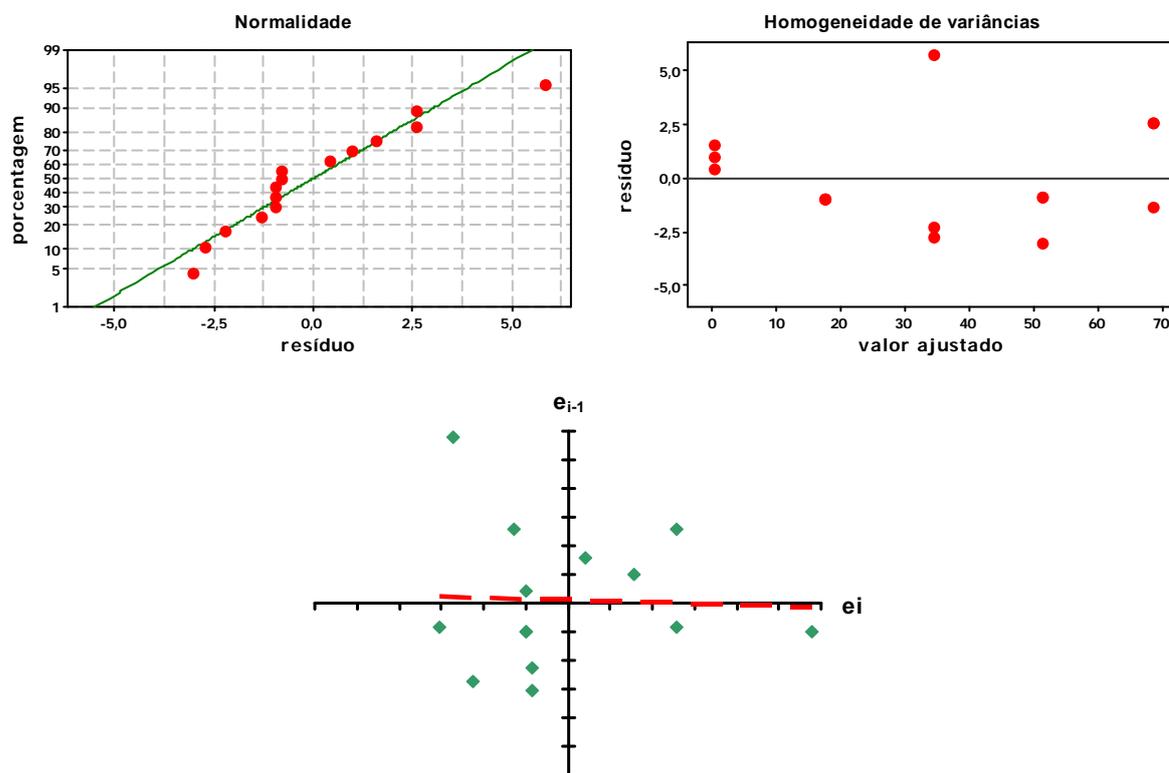


✓ **Tratamento de outlier**

▪ **n = 15**



✓ **Análise de resíduos**



- Os resíduos da série padrão e da amostra apresentaram: normalidade, independência e homoscedasticidade.

✓ **Cálculo da potência**

$a = -6,51$
 $M = 1,01638$

$b = 85,10$

Concentração = $0,4879 \mu\text{g/ml}$

Potência = 101,64%

✓ **Análise de variância**

Coefficientes fatoriais

Fonte	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	e_i	T_i	$T_i^2/3e_i$
Regressão	-2	-1	0	1	2	10	510,6184	8691,0396
Curvatura quadrática	2	-1	-2	-1	2	14	19,6033	9,1497
Curvatura cúbica	-1	2	0	-2	1	10	4,4341	0,6554
Curvatura quártica	1	-4	6	-4	1	70	42,4737	8,5906

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	Ftab
Preparação	1	1,1189	1,1189	0,1578	0,6981	4,75
Regressão	1	8691,0396	8691,0396	1226,0832	0,0000	4,75
Curvatura quadrática	1	9,1497	9,1497	1,2908	0,2781	4,75
Curvatura cúbica	1	0,6554	0,6554	0,0925	0,7663	4,75
Curvatura quártica	1	8,5906	8,5906	1,2119	0,2925	4,75
Tratamento	5	8710,5541	1742,1108			
Resíduo	12	85,0615	7,0885			
Total	17	8795,6156				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; e ausência de curvatura quadrática, cúbica e quártica.

✓ **Limite de confiança a 95%**

$$\bar{y} = 34,34$$

$$t_{0,975} = 2,18$$

$$S_{xx} = 1,200$$

$$s^2_{(\text{Concentração})} = 0,0004$$

$$g = 0,00387$$

$$s_{(\text{concentração})} = 0,0198$$

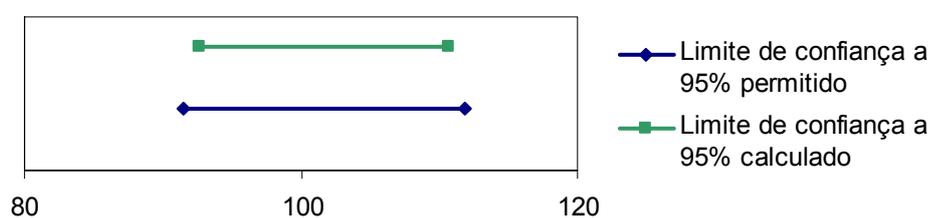
Limite de confiança = $0,4479 \pm 0,0431$

Limite de confiança inferior = $0,44 \mu\text{g/ml}$

Limite de confiança inferior = 92,66%

Limite de confiança superior = $0,53 \mu\text{g/ml}$

Limite de confiança superior = 110,62%



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE M – Método Turbidimétrico - Doseamento de gramicidina matéria-prima (3x3)

Delineamento: retas paralelas 3X3

Amostra: gramicidina matéria-prima

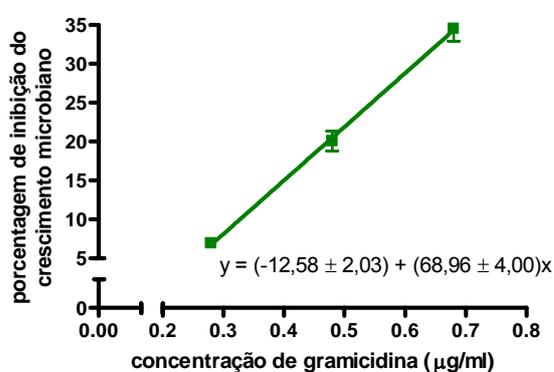
Concentrações da série padrão: 0,28; 0,48 e 0,88 µg/ml

Concentração da amostra: 0,28; 0,48 e 0,68 µg/ml

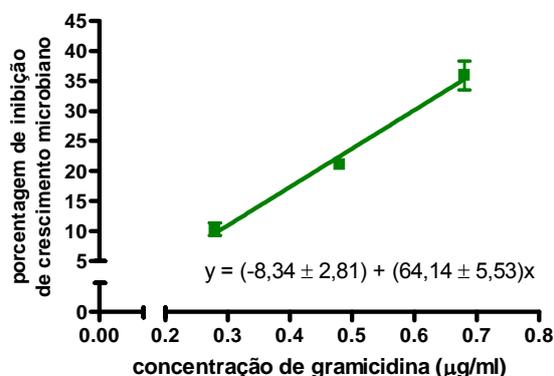
✓ **Dados experimentais**

Placas	Padrão			Amostra		
	0,28	0,48	0,68	0,28	0,48	0,68
1	6,69	22,14	33,72	8,24	21,11	31,15
2	6,95	17,76	37,70	11,07	20,08	38,61
3	7,21	20,33	32,18	11,58	22,14	38,10

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**



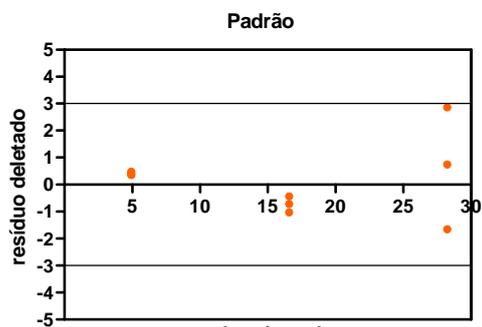
Padrão



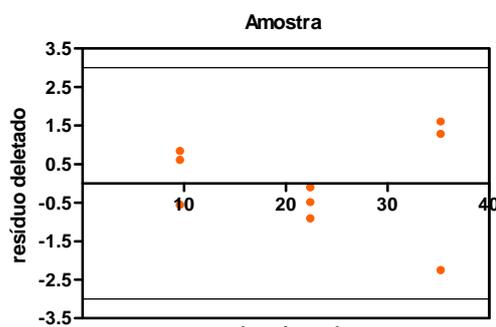
Amostra

✓ **Tratamento de outlier**

▪ $n = 8$

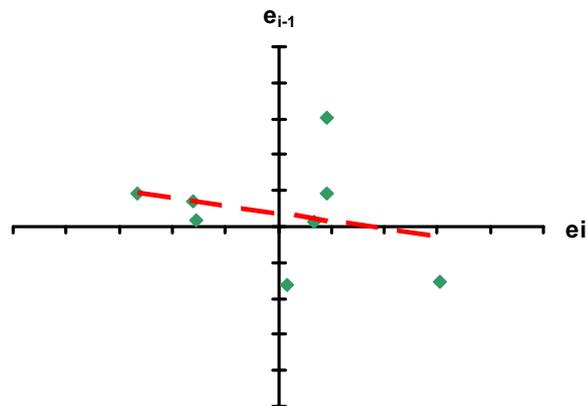
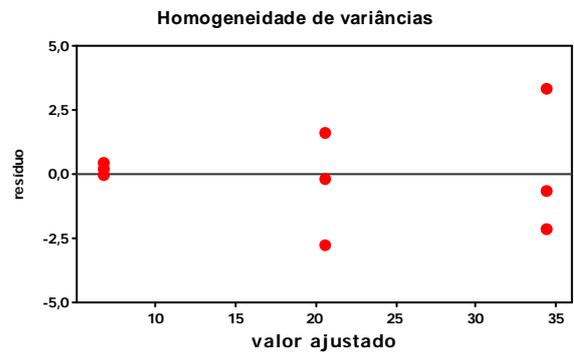
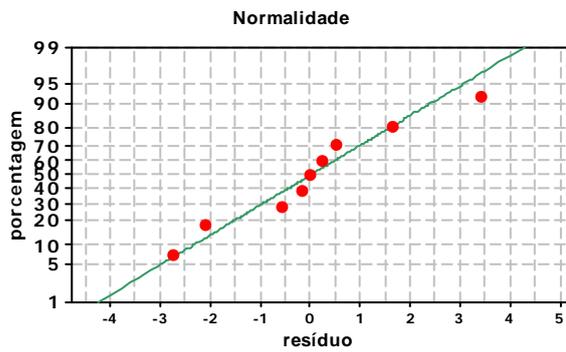


Ausência de outlier.

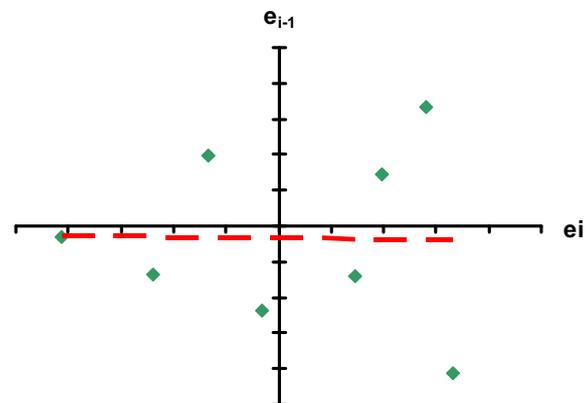
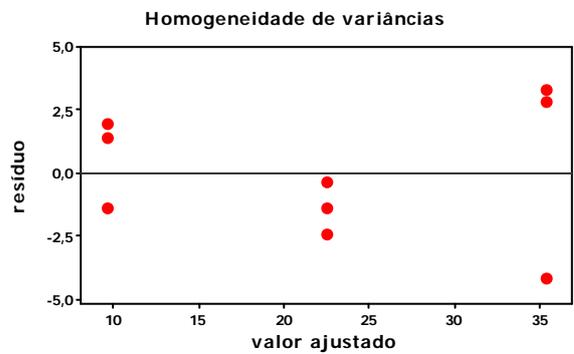
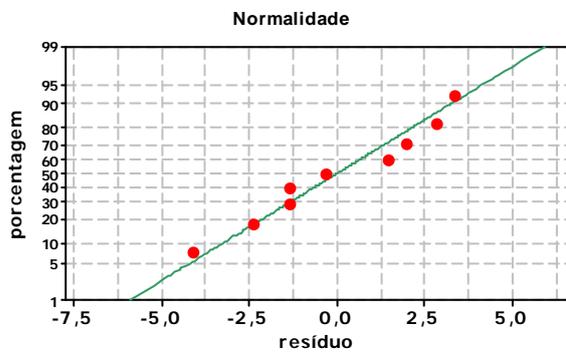


Ausência de outlier.

✓ **Análise de resíduos**
 ▪ **Padrão**



▪ **Amostra**



- Os resíduos da série padrão e da amostra apresentaram: normalidade, independência e homoscedasticidade.

✓ **Cálculo da potência**

I = 0,20
D = 0,0290

E = 13,31
 $x_A = 0,51$

b = 66,5449
M = 1,0605

F = 1,93

Potência = 106,05%

✓ **Análise de variância**

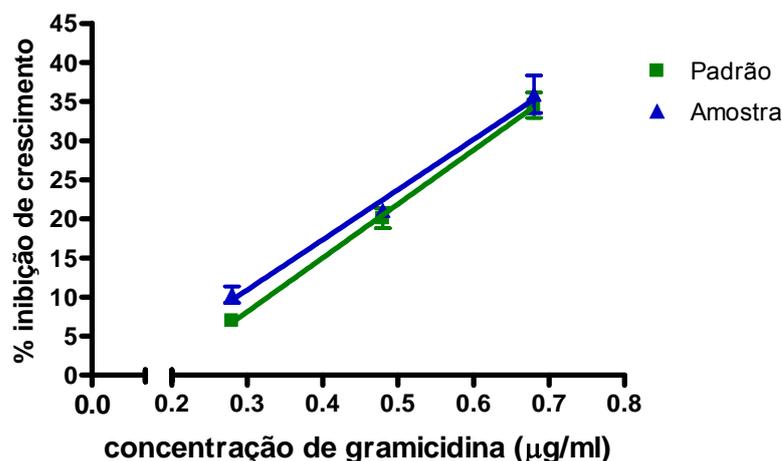
Coefficientes fatoriais

Fonte	P ₁	P ₂	P ₃	A ₁	A ₂	A ₃	e _i	T _i	T _i ² /(n _{e_i)}
Preparação	-1	-1	-1	1	1	1	6	17,3837	16,7884
Regressão	-1	0	1	-1	0	1	4	159,7077	2125,5464
Paralelismo	1	0	-1	-1	0	1	4	-5,7824	2,7863
Curvatura quadrática	1	-2	1	1	-2	1	12	16,0784	7,1810
Curvatura quadrática oposta	-1	2	-1	1	-2	1	12	8,1172	1,8303

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	F _{tab}
Preparação	1	16,7884	16,7884	2,9015	0,114	4,75
Regressão	1	2125,5464	2125,5464	367,3582	0,000	4,75
Paralelismo	1	2,7863	2,7863	0,4816	0,501	4,75
Curvatura quadrática	1	7,1810	7,1810	1,2411	0,287	4,75
Curvatura quadrática oposta	1	1,8303	1,8303	0,3163	0,584	4,75
Tratamento	5	2154,1323	430,8265			
Resíduo	12	69,4324	5,7860			
Total	17	2223,5647				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; paralelismo entre as retas e ausência de curvatura quadrática na mesma direção e em direção oposta.



✓ **Limite de confiança a 95%**

$S_{xx} = 0,4800$

$g = 0,01292$

$t_{0,975} = 2,18$

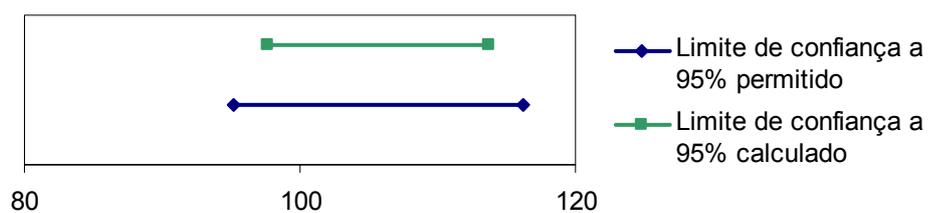
$s^2_{(D)} = 0,00029$

$s_{(D)} = 0,01711$

Limite de confiança = $0,0290 \pm 0,0373$

Limite de confiança inferior = 98,28%

Limite de confiança superior = 113,81%



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE N – Método Turbidimétrico - Doseamento de gramicidina matéria-prima (5x1)

Delineamento: retas paralelas 5X1

Amostra: gramicidina matéria-prima

Concentrações da série padrão: 0,08; 0,28; 0,48; 0,68 e 0,88 µg/ml

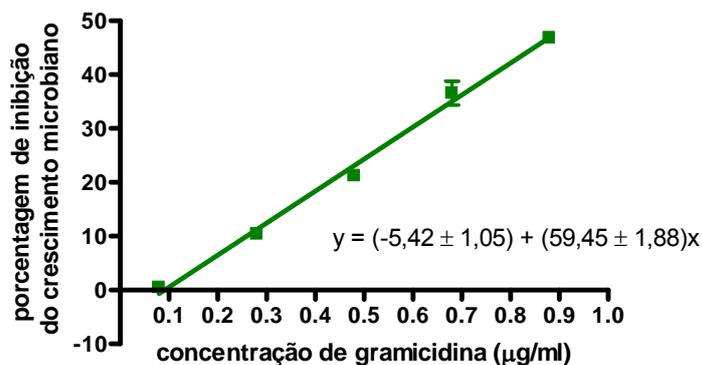
Concentrações da amostra: 0,48 µg/ml

✓ **Dados experimentais**

▪ **Curva analítica e amostra**

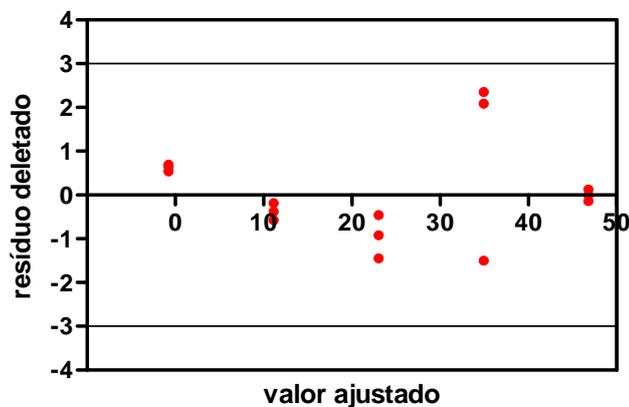
Tubos	Porcentagem de inibição do crescimento do microrganismo					Teste
	0,08	0,28	0,48	0,68	0,88	
1	0,51	10,04	22,14	38,93	46,85	24,92
2	0,32	10,42	21,24	38,61	47,10	25,20
3	0,60	10,81	20,33	32,18	46,59	23,17

✓ **Análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados**

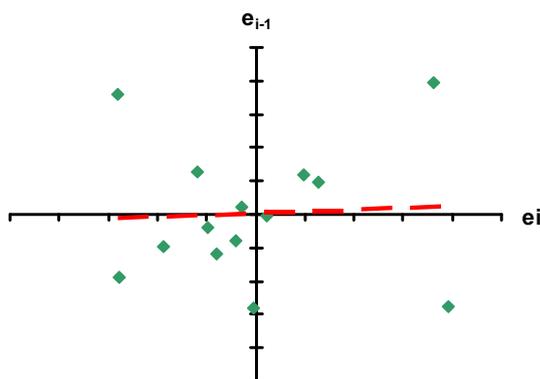
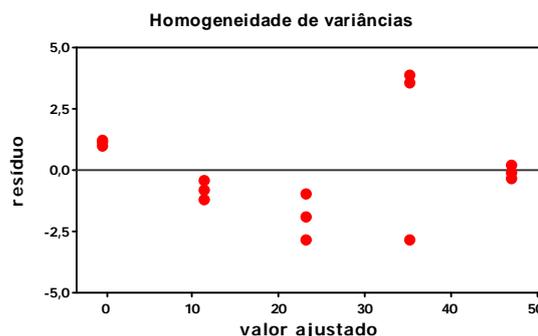
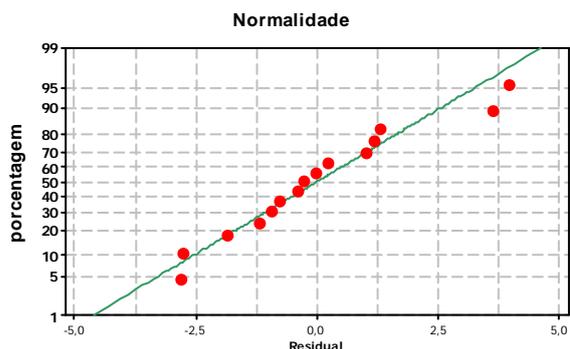


✓ **Tratamento de outlier**

▪ **n = 15**



✓ **Análise de resíduos**



- Os resíduos da série padrão e da amostra apresentaram: normalidade, independência e homoscedasticidade.

✓ **Cálculo da potência**

$a = -5,42$
 $M = 1,0461$

$b = 59,45$

Concentração = 0,50 $\mu\text{g/ml}$

Potência = 104,61%

✓ **Análise de variância**

✓

Coefficientes fatoriais

Fonte	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	e_i	T_i	$T_i^2/3e_i$
Regressão	-2	-1	0	1	2	10	356,6542	4240,0741
Curvatura quadrática	2	-1	-2	-1	2	14	15,5466	5,7547
Curvatura cúbica	-1	2	0	-2	1	10	-17,7797	10,5373
Curvatura quártica	1	-4	6	-4	1	70	-39,7492	7,5238

ANOVA

Fonte	GL	SQ	QM	F	p	Ftab
Preparação	1	4,3280	4,3280	1,5468	0,2374	4,75
Regressão	1	4240,0741	4240,0741	1515,3545	0,0000	4,75
Curvatura quadrática	1	5,7547	5,7547	2,0566	0,1771	4,75
Curvatura cúbica	1	10,5373	10,5373	3,7659	0,0762	4,75
Curvatura quártica	1	7,5238	7,5238	2,6889	0,1270	4,75
Tratamento	5	4268,2180	853,6436			
Resíduo	12	33,5769	2,7981			
Total	17	4301,7948				

- Por meio da ANOVA foram comprovados os requisitos necessários para que o doseamento seja válido: regressão significativa; e ausência de curvatura quadrática, cúbica e quártica.

✓ **Limite de confiança a 95%**

$$\bar{y} = 23,11$$

$$t_{0,975} = 2,18$$

$$S_{xx} = 1,200$$

$$s^2_{(\text{concentração})} = 0,00031$$

$$g = 0,00313$$

$$s_{(\text{concentração})} = 0,01781$$

$$\text{Limite de confiança} = 0,50 \pm 0,04$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 0,46 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 96,53\%$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 0,54 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 112,69\%$$



- O limite de confiança a 95% calculado está dentro da variação máxima permitida ($\pm 10\%$), portanto o ensaio realizado apresentou precisão adequada.

APÊNDICE O – Método Turbidimétrico - *Combinação de resultados de ensaios repetidos*

Delineamento: retas paralelas 3x3

Réplicas	Potência (%)	D	GL	g	$s^2_{(D)}$	W	W(D)
1	104,25	0,02042	12	0,01418	0,00032	3127,241	3260,149
2	106,05	0,02903	12	0,01292	0,00029	3416,995	3623,622
3	105,29	0,02540	11	0,01341	0,00030	3365,677	3543,721
4	105,07	0,02432	12	0,00570	0,00013	7759,944	8153,373
5	105,82	0,02796	12	0,00713	0,00016	6199,340	6560,142

$$\bar{D} = 0,0256$$

$$\bar{x}_A = 0,51$$

$$\bar{M} = 1,0533$$

$$s^2_{(\bar{D})} = 4,19 \times 10^{-5}$$

$$s_{(\bar{D})} = 0,00647$$

$$t_{0,975} = 2,00$$

$$\text{Limite de confiança} = 0,0256 \pm 0,0130$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 102,63\%$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 108,03\%$$

Delineamento: 5x1

Réplicas	Potência (%)	Conc.	GL	g	$s^2_{(\text{conc})}$	W	W(conc.)
1	106,71	0,51221	12	0,00213	0,00073	1374,043	703,796
2	104,61	0,50213	12	0,00313	0,00104	962,524	483,310
3	101,39	0,48667	12	0,00457	0,00145	688,880	335,259
4	106,54	0,51139	12	0,00220	0,00075	1335,139	682,780
5	101,99	0,48955	12	0,00222	0,00071	1409,729	690,136

$$\overline{\text{Concentração}} = 0,5018$$

$$\bar{M} = 1,0453$$

$$\text{Potência} = 104,53\%$$

$$s^2_{(\overline{\text{conc}})} = 1,73 \times 10^{-4}$$

$$s_{(\overline{\text{conc}})} = 0,01316$$

$$t_{0,975} = 2,00$$

$$\text{Limite de confiança} = 0,5018 \pm 0,0263$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 0,4754$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 0,5281$$

$$\text{Limite de confiança inferior} = 99,05\%$$

$$\text{Limite de confiança superior} = 110,05\%$$

Anexos

ANEXO A – Fórmulas para cálculo de potência de antibióticos pelo método de difusão em agar

1 Delineamento 3x3

1.1 Cálculo de potência

$$R = \frac{x_{A3}}{x_{A2}} = \frac{x_{A2}}{x_{A1}} = \frac{x_{P3}}{x_{P2}} = \frac{x_{P2}}{x_{P1}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$I = \log R \quad (\text{Equação 2})$$

$$E = \frac{[(\bar{y}_{A3} + \bar{y}_{P3}) - (\bar{y}_{A1} + \bar{y}_{P1})]}{4} \quad (\text{Equação 3})$$

$$F = \frac{[(\bar{y}_{A1} + \bar{y}_{A2} + \bar{y}_{A3}) - (\bar{y}_{P3} + \bar{y}_{P2} + \bar{y}_{P1})]}{3} \quad (\text{Equação 4})$$

$$b_c = \frac{E}{I} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\log M = \frac{F}{b_c} \quad (\text{Equação 6})$$

$$M = 10^{F/b_c} \quad (\text{Equação 7})$$

$$P = M \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

1.2 Intervalo de confiança a 95%

$$S_{xx} = \sum x_P - \frac{(\sum x_P)^2}{N_P} + \sum x_A - \frac{(\sum x_A)^2}{N_A} \quad (\text{Equação 9})$$

$$g = \frac{s^2 t^2}{b_c^2 S_{xx}} \quad (\text{Equação 10})$$

Para $g < 0,1$:

$$s_{(\log M)}^2 = \frac{s^2}{b_c^2} \left(\frac{1}{N_P} + \frac{1}{N_A} + \frac{(\log M)^2}{S_{xx}} \right) \quad (\text{Equação 11})$$

$$s_{(\log M)} = \sqrt{s_{(M)}^2} \quad (\text{Equação 12})$$

$$IC = \log M \pm ts_{(M)} \quad (\text{Equação 13})$$

2 Delineamento 5x1

2.1 Correção da média do diâmetro dos halos de inibição

$$\bar{y}_{P3j} = \frac{\sum_{i=1}^{n=3} y_{P3i}}{3} \quad (\text{Equação 14})$$

$$\bar{y}_{P3} = \frac{\sum_{j=1}^{n=m} y_{P3j}}{m} \quad (\text{Equação 15})$$

$$\bar{y}_{Pj} = \frac{\sum_{i=1}^{n=3} y_{Pi}}{3} \quad (\text{Equação 16})$$

$$F_c = \bar{y}_{P3} - \bar{y}_{P3j} \quad (\text{Equação 17})$$

$$\bar{y}_{Pcj} = \bar{y}_{Pj} + F_c \quad (\text{Equação 18})$$

2.2 Cálculo de potência

$$R = \frac{x_{P5}}{x_{P4}} = \frac{x_{P4}}{x_{P3}} = \frac{x_{P3}}{x_{P2}} = \frac{x_{P2}}{x_{P1}} \quad (\text{Equação 19})$$

$$I = \log R \quad (\text{Equação 20})$$

$$\bar{y}_P = \frac{\sum_{j=1}^{n=m'} y_{Pj}}{m'} \quad (\text{Equação 21})$$

$$E = \frac{(2\bar{y}_{P5c} + \bar{y}_{P4c} - \bar{y}_{P2c} - 2\bar{y}_{P1c})}{4} \quad (\text{Equação 22})$$

$$\bar{y}_A = \frac{\sum_{i=1}^{n=3} y_{Ai}}{3} \quad (\text{Equação 23})$$

$$\bar{y}_A = \frac{\sum_{i=1}^{n=m'} y_{Ai}}{m'} \quad (\text{Equação 24})$$

$$\bar{y}_{P3A} = \frac{\sum_{i=1}^{n=15} y_{P3A}}{15} \quad (\text{Equação 25})$$

$$F = \bar{y}_A - \bar{y}_{P3A} \quad (\text{Equação 26})$$

$$\log M = \frac{F}{b_c} \quad (\text{Equação 27})$$

$$M = 10^{F/b_c} \quad (\text{Equação 28})$$

$$P = M \times 100 \quad (\text{Equação 29})$$

2.3 Intervalo de confiança a 95%

$$S_{xx} = \sum x_P - \frac{(\sum x_P)^2}{n_P} \quad (\text{Equação 30})$$

$$g = \frac{s^2 t^2}{b^2 S_{xx}} \quad (\text{Equação 31})$$

Para $g < 0,1$:

$$s_{(\log M)}^2 = \frac{s^2}{b^2} \left(\frac{1}{n_p} + \frac{1}{n_A} + \frac{(\log M)^2}{S_{xx}} \right) \quad (\text{Equação 32})$$

$$s_{(\log M)} = \sqrt{s_{(M)}^2} \quad (\text{Equação 33})$$

$$IC = \log M \pm ts_{(M)} \quad (\text{Equação 34})$$

3 Combinação de resultados de ensaios repetidos

$$W = \frac{1}{s_{(\log M)}^2} \quad (\text{Equação 35})$$

$$\log \bar{M} = \frac{\sum [W(\log M)]}{\sum W} \quad (\text{Equação 36})$$

$$s_{(\log \bar{M})}^2 = \frac{1}{\sum W} \quad (\text{Equação 37})$$

$$s_{(\log \bar{M})} = \sqrt{s_{(\log \bar{M})}^2} \quad (\text{Equação 38})$$

$$IC = \log \bar{M} \pm ts_{(\log \bar{M})} \quad (\text{Equação 39})$$

Glossário:

b_c - inclinação comum para retas das preparações padrão e amostra;

E - diferença entre as respostas médias para concentrações adjacentes;

F - diferença entre a resposta média de todas as concentrações da preparação da amostra e a resposta média de todas as concentrações do padrão;

F_c - fator de correção;

g - índice de significância da inclinação comum;

I - logaritmo da relação entre doses adjacentes

IC - intervalo de confiança;

$\log \bar{M}$ - logaritmo da média ponderada das estimativas de potência individuais;

m - número de placas empregadas no ensaio para a preparação padrão;

m' - número de placas empregadas no ensaio para determinada concentração do padrão;

M - relação de potência entre amostra e padrão;

$N_p; N_A$ - número de determinações para preparação padrão e para amostra, respectivamente;

- n_p - número de determinações médias corrigidas para o padrão;
- n_A - número de médias para preparação da amostra;
- P - potência relativa em porcentagem;
- s^2 - quadrado médio do resíduo;
- $s_{(\log M)}^2$ - variância do logaritmo de M ;
- $s_{(\log M)}$ - desvio padrão do logaritmo de M ;
- $s_{(\log \bar{M})}^2$ - variância do logaritmo de \bar{M} ;
- $s_{(\log \bar{M})}$ - desvio padrão do logaritmo de \bar{M} ;
- S_{xx} - soma de quadrados dos desvios de x ;
- t - t de *Student* para $P=0,95$ e grau de liberdade do resíduo;
- x_A - concentração da preparação amostra;
- x_p - concentração da preparação padrão;
- $x_{A1}; x_{A2}; x_{A3}$ - concentração baixa, média e alta da preparação amostra para delineamento 3x3;
- $x_{P1}; x_{P2}; x_{P3}$ - concentração baixa, média e alta da preparação padrão para delineamento 3x3;
- $x_{P1}; x_{P2}; x_{P3}; x_{P4}; x_{P5}$ - concentrações da preparação padrão, em ordem crescente, para obtenção da curva analítica no delineamento 5x1;
- $\bar{y}_{A1}; \bar{y}_{A2}; \bar{y}_{A3}$ - respostas médias obtidas para preparação amostra nas concentrações baixa, média e alta, respectivamente, para delineamento 3x3.;
- $\bar{y}_{P1}; \bar{y}_{P2}; \bar{y}_{P3}$ - respostas médias obtidas para preparação padrão nas concentrações baixa, média e alta, respectivamente, para delineamento 3x3;
- y_{Ai} - diâmetro do halo de inibição correspondente à preparação amostra;
- \bar{y}_{Ai} - média do diâmetro dos halos de inibição correspondentes à preparação amostra presente na placa i ;
- \bar{y}_A - média de todas as médias do diâmetro dos halos de inibição correspondente à preparação amostra;
- y_{Pi} - diâmetro do halo de inibição correspondente à determinada concentração do padrão (x_p);
- \bar{y}_{Pj} - média do diâmetro dos halos de inibição correspondentes à concentração x_p presente na placa j ;

\bar{y}_{Pcj} - média corrigida do diâmetro dos halos de inibição correspondente à concentração presente na placa j;

\bar{y}_p - média de todas as médias do diâmetro dos halos de inibição correspondente à determinada concentração x_p ;

y_{P3A} - diâmetro do halo de inibição correspondente à concentração x_{P3} da placa contendo a amostra;

\bar{y}_{P3A} - média do diâmetro dos halos de inibição correspondentes à concentração x_{P3} presente na placa da amostra;

y_{P3j} - diâmetro do halo de inibição correspondente à concentração x_{P3} ;

\bar{y}_{P3j} - média do diâmetro dos halos de inibição correspondentes à concentração x_{P3} presente na placa j;

\bar{y}_{P3} - média de todas as médias do diâmetro dos halos de inibição correspondente à concentração x_{P3} ;

W - peso.

ANEXO B – Fórmulas para cálculo de potência de antibióticos pelo método turbidimétrico

1 Equação da sigmóide

$$y_{\text{abs}} = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} - \log x)})} \quad (\text{Equação 1})$$

2 Transformação em porcentagem de inibição do crescimento microbiano

$$y_{\%} = \frac{y_{\text{abs}} \times 100}{\text{BI}} \quad (\text{Equação 2})$$

3 Delineamento 3x3

3.1 Cálculo de potência

$$I = x_{A3} - x_{A2} = x_{A2} - x_{A1} = x_{P3} - x_{P2} = x_{P2} - x_{P1} \quad (\text{Equação 14})$$

$$E = \frac{[(\bar{y}_{A3} + \bar{y}_{P3}) - (\bar{y}_{A1} + \bar{y}_{P1})]}{4} \quad (\text{Equação 15})$$

$$F = \frac{[(\bar{y}_{P3} + \bar{y}_{P2} + \bar{y}_{P1}) - (\bar{y}_{A1} + \bar{y}_{A2} + \bar{y}_{A3})]}{3} \quad (\text{Equação 16})$$

$$b_c = \frac{E}{I} \quad (\text{Equação 17})$$

$$D = \bar{x}_A - \bar{x}_P = \frac{F}{b_c} \quad (\text{Equação 18})$$

$$M = \frac{D + \bar{x}_P}{\bar{x}_P} \quad (\text{Equação 19})$$

$$P = M \times 100 \quad (\text{Equação 20})$$

3.2 Intervalo de confiança a 95%

$$S_{xx} = \sum x_P - \frac{(\sum x_P)^2}{N_P} + \sum x_A - \frac{(\sum x_A)^2}{N_A} \quad (\text{Equação 21})$$

$$g = \frac{s^2 t^2}{b_c^2 S_{xx}} \quad (\text{Equação 22})$$

Para $g < 0,1$:

$$s_{(D)}^2 = \frac{s^2}{b_c^2} \left(\frac{1}{N_P} + \frac{1}{N_A} + \frac{D^2}{S_{xx}} \right) \quad (\text{Equação 23})$$

$$s_{(D)} = \sqrt{s_{(D)}^2} \quad (\text{Equação 24})$$

$$\text{IC} = \frac{[(D \pm t s_{(D)}) + \bar{x}_P]}{\bar{x}_P} \quad (\text{Equação 25})$$

4 Delineamento 5x1

4.1 Cálculo de potência

$$S_{xx} = \sum x_P - \frac{(\sum x_P)^2}{N_P} \quad (\text{Equação 40})$$

$$S_{xy} = \sum x_P y_P - \frac{\sum x_P \sum y_P}{N_P} \quad (\text{Equação 41})$$

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Equação 42})$$

$$a = \bar{y}_P - b\bar{x}_P \quad (\text{Equação 43})$$

$$x_A = \frac{\bar{y}_A - a}{b} \quad (\text{Equação 44})$$

$$M = \frac{x_A}{x_P} \quad (\text{Equação 45})$$

$$P = M \times 100 \quad (\text{Equação 46})$$

4.2 Intervalo de confiança a 95%

$$g = \frac{s^2 t^2}{b_c^2 S_{xx}} \quad (\text{Equação 47})$$

Para $g < 0,1$:

$$S_{(\text{concentração})}^2 = \frac{s^2}{b_c^2} \left(\frac{1}{N_P} + \frac{1}{N_A} + \frac{\left[\frac{(\bar{y}_A - \bar{y}_P)}{b} \right]^2}{S_{xx}} \right) \quad (\text{Equação 48})$$

$$S_{(\text{concentração})} = \sqrt{S_{(\text{concentração})}^2} \quad (\text{Equação 49})$$

$$IC = x_A \pm t_{S_{(\text{concentração})}} \quad (\text{Equação 50})$$

5 Combinação de resultados de ensaios repetidos

$$W = \frac{1}{s_{(\text{conc})}^2} \quad (\text{Equação 51})$$

$$\bar{x}_{AP} = \frac{\sum (WD)}{\sum W} \quad (\text{Equação 52})$$

$$s_{(\text{conc})}^2 = \frac{1}{\sum W} \quad (\text{Equação 53})$$

$$s_{(\text{conc})} = \sqrt{s_{(\text{conc})}^2} \quad (\text{Equação 54})$$

$$IC = \bar{x}_{AP} \pm ts_{(conc)} \quad (\text{Equação 55})$$

Glossário

a - intercepto da curva analítica;

b - inclinação da curva analítica

b_c - inclinação comum para retas das preparações padrão e amostra;

\bar{BI} - resposta média em absorvância do branco inoculado;

Bottom - menor resposta da curva

D - diferença entre as concentrações médias da preparação padrão e amostra;

\bar{D} - média ponderada das diferenças entre as concentrações médias da preparação padrão e amostra;

E - diferença entre as respostas médias para concentrações adjacentes;

EC50 - concentração que permite o crescimento do microrganismo a 50% do nível atingido pelo tubo controle (branco inoculado) em um mesmo ensaio;

F - diferença entre a resposta média de todas as concentrações da preparação do padrão e a resposta média de todas as concentrações da amostra.

g - índice de significância da inclinação comum;

I - diferença entre concentrações adjacentes;

IC - intervalo de confiança;

M - relação de potência entre amostra e padrão;

N_P;N_A - número de determinações para preparação padrão e para amostra, respectivamente;

P - potência relativa em porcentagem;

s² - quadrado médio do resíduo;

s²_(conc) - variância da concentração média;

s_(conc) - desvio padrão da concentração média;

s²_(conc) - variância da concentração;

s_(conc) - desvio padrão da concentração;

s²_(\bar{D}) - variância de \bar{D} ;

s_(\bar{D}) - desvio padrão de \bar{D} ;

s²_(D) - variância de D;

$s_{(D)}$ - desvio padrão de D;

S_{xx} - soma de quadrados dos desvios de x;

t - t de *Student* para $p=0,95$ e grau de liberdade do resíduo;

Top - maior resposta da curva;

x - concentração;

x_A - concentração da preparação amostra;

x_P - concentração da preparação padrão;

$x_{A1}; x_{A2}; x_{A3}$ - concentração baixa, média e alta da preparação amostra para delineamento 3x3;

$x_{P1}; x_{P2}; x_{P3}$ - concentração baixa, média e alta da preparação padrão para delineamento 3x3;

\bar{x}_{AP} - média ponderada das concentrações da preparação amostra;

\bar{x}_A - concentração média da preparação amostra;

\bar{x}_P - concentração média da preparação amostra;

\bar{y}_A - média das todas as respostas da preparação amostra;

\bar{y}_P - média de todas as respostas da preparação padrão;

$\bar{y}_{A1}; \bar{y}_{A2}; \bar{y}_{A3}$ - respostas médias obtidas para preparação amostra nas concentrações baixa, média e alta, respectivamente, para delineamento 3x3.

$\bar{y}_{P1}; \bar{y}_{P2}; \bar{y}_{P3}$ - respostas médias obtidas para preparação padrão nas concentrações baixa, média e alta, respectivamente, para delineamento 3x3.

$y_{\%}$ - resposta em porcentagem de inibição do crescimento microbiano;

y_{abs} - resposta em absorvância;

W - peso.