



Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e método de espalhamento

Lucas Fernando Takamune¹; Daniela Cristina de Macedo Vieira^{1,*}

¹Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas; Alfenas, MG, Brasil.

RESUMO

Para o sucesso do tratamento de doenças infecciosas é preciso que a concentração de agentes microbianos no local da infecção esteja adequada, para isso é necessário que a potência dos antimicrobianos nas preparações farmacêuticas que serão administradas seja precisa. Esse estudo foi feito com o objetivo de desenvolver um método de doseamento da potência de antimicrobianos alternativo ao método de difusão em ágar, apresentando como inovação a forma de aplicação dos micro-organismos testes, que é feita com o auxílio de uma alça de Drigalski. Para a realização dos testes foram escolhidos o ágar Mueller – Hinton, o *Micrococcus luteus* como micro-organismo teste e a amoxicilina tri-hidratada como substância teste. Foram utilizadas 18 placas de Petri e após a medição dos halos de inibição, os resultados foram comparados com os do método oficial de difusão em ágar. A partir destes resultados pode-se afirmar então que o método de espalhamento com o uso da alça de Drigalski mostrou-se válido e constitui uma metodologia alternativa, econômica, confiável e de fácil execução para a determinação da potência de antimicrobianos.

Palavras-chave: Doseamento. Microbiologia. Potência.

INTRODUÇÃO

No tratamento das doenças infecciosas, o resultado terapêutico favorável depende de vários fatores. O êxito depende da obtenção de uma concentração do antibiótico no local da infecção suficiente pra matar ou inibir o crescimento bacteriano, e por outro lado, que esteja abaixo dos níveis tóxicos para as células humanas (Farago et al., 2006).

Para o sucesso terapêutico, também é necessário que a potência dos antimicrobianos que serão administradas ao paciente esteja correta. Se a potência das preparações farmacêuticas estiver abaixo da rotulada, o fármaco pode não atingir uma concentração capaz de exercer o efeito biológico esperado. Por outro lado, se a concentração estiver acima, poderá provocar efeitos tóxicos (Esmerino et al., 2004).

As penicilinas constituem um dos grupos mais importantes de antibióticos. A amoxicilina é uma amino penicilina semissintética da classe dos β -lactâmicos (Gorog, 2008). Este antibiótico tem a capacidade de se ligar e inibir as enzimas que estão envolvidas no estágio final de constituição e formação da parede celular durante o crescimento e a multiplicação da bactéria. A inativação destas enzimas resulta no enfraquecimento da parede e, conseqüentemente, na lise osmótica (Gomes & Souza, 2010). Esse fármaco é estável em meio ácido e foi desenvolvido para o uso oral. Possui um largo espectro de atividade bactericida contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos e é sensível a micro-organismos produtores de penicilinases (Langoni et al., 2000).

Geralmente, para a análise de antibióticos a Farmacopeia Americana (USP, 2011) recomenda a utilização de procedimentos microbiológicos para a determinação da potência dos antibióticos nas apresentações farmacêuticas. Normalmente são empregados dois métodos, o do cilindro em placa ou de “placa” e o turbidimétrico ou de “tubo”. O primeiro se baseia na difusão do antibiótico contido em um cilindro vertical, através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, em uma extensão tal que o crescimento do micro-organismo agregado se detenha em uma área circular ou “zona” ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico. O método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (transmitância ou absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados ao composto contido em um meio com o antibiótico, sendo que a resposta do micro-organismo é diretamente proporcional à concentração da substância (Esmerino et al., 2004).

No presente trabalho foi feita uma adaptação do método de difusão em ágar para o doseamento da potência da amoxicilina sobre uma cultura de *Micrococcus luteus*. Nesta nova metodologia se propôs uma forma alternativa

Autor correspondente: Daniela Cristina de Macedo Vieira - Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas - Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - CEP.37130-000 - Alfenas - MG - Brasil e-mail: daniacmvieira@yahoo.com.br - fone: (35) 3299-1305/8892-0200

de aplicação dos micro-organismos testes, utilizando uma alça de Drigalski.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das Soluções

Preparação das soluções de Amoxicilina SQR

Foram transferidos 50,0 mg de amoxicilina tri-hidratada, substância de referência (lote: 09010118B, val: 05/13, teor: 97,9%), exatamente pesados para balão volumétrico de 50,0 mL e foram adicionadas 3 gotas de hidróxido de sódio 10% para facilitar a dissolução. Então o volume foi completado com água purificada obtendo-se uma solução com concentração de 1,0 mg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,25; 0,5 e 1,0 mL e foram transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL, o volume foi então completado com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 10; 20,0 e 40,0 µg/mL, respectivamente.

Preparação das soluções de Amoxicilina amostra

Foram transferidos 50,0 mg de amoxicilina tri-hidratada adquiridas no Laboratório NCQ Unifal-MG, exatamente pesados para balão volumétrico de 50,0 mL e foram adicionadas gotas de hidróxido de sódio 10% para facilitar a dissolução. Então o volume foi completado com água purificada obtendo-se uma solução com concentração de 1,0 mg/mL. Desta solução, foram tomadas alíquotas de 0,25; 0,5 e 1,0 mL e transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL, completando o volume com água purificada, obtendo-se soluções com concentração de 10; 20,0 e 40,0 µg/mL, respectivamente.

Preparo do inóculo

O micro-organismo teste escolhido foi o *Micrococcus luteus* ATCC 9341, mantido em ágar Casoy (Isofar, Rio de Janeiro- Brasil) para manutenção e repicado para caldo BHI (Hmédia, Mumbai- Índia), que após 18 horas de crescimento em estufa para cultura bacteriológica Modelo 002 CB (Fanem LTDA) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ foi utilizado para a padronização do inóculo. Foi realizada ajustando-se a turbidez da cultura em crescimento com caldo BHI, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de 0,5 da escala de McFarland. Isso resultou numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/ml. Após a padronização, o inóculo foi utilizado em Ágar Mueller-Hinton (Isofar, Rio de Janeiro- Brasil). Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Curva analítica

Foram utilizadas 18 placas de Petri e o teste foi realizado em câmara de fluxo laminar com a transferência de 20 mL do ágar Mueller-Hinton para o preparo da camada base. Após a solidificação do

ágar, com o auxílio de um pipetador automático, foram adicionados 1 mL do inóculo a 1% sobre a camada de meio de cultura solidificado na placa de Petri e espalhados com o auxílio da alça de Drigalsky. Em seguida foram adicionados templates de aço inoxidável estéreis, um em cada placa e com auxílio de pipetador automático, 200 µL das soluções padrão e a amostra foram adicionados em delineamento 3 x 3. As placas foram colocadas em estufa incubadora à $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Após 18 horas, foram realizadas medidas dos diâmetros dos halos de inibição com auxílio de uma régua.

A curva analítica foi construída em gráfico logarítmico da concentração da solução padrão versus diâmetro dos halos de inibição, com as médias dos diâmetros de cada uma das concentrações da substância química de referência. A equação da reta para representação gráfica da curva analítica foi determinada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para a construção da curva foram utilizados os valores da média de três determinações, do diâmetro das concentrações 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL. A curva foi construída usando o programa Excel 2007.

Determinação da potência do medicamento

Foram utilizadas 18 placas de Petri para o doseamento de amoxicilina, em cada ensaio foram utilizadas seis placas de Petri e os resultados foram analisados estatisticamente pela ANOVA.

O teste foi realizado em capela de fluxo laminar com a transferência do Ágar Mueller-Hinton para a placa de Petri, após a solidificação foi adicionado o volume do inóculo a 1%. Em seguida, foram adicionados templates de aço inoxidável estéreis, um em cada placa e com auxílio de pipetador automático, 200 µL das soluções padrão e amostra foram adicionadas em delineamento 3 x 3 (Figura 1). As placas foram colocadas em estufa incubadora à $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ e após 18 horas de crescimento, foram realizadas medidas dos diâmetros dos halos de inibição com auxílio de uma régua.

Em cada ensaio os resultados foram analisados estatisticamente e a potência de cada doseamento calculada pela equação de Hewitt (2004).

RESULTADOS

Neste estudo, em que se buscou o desenvolvimento da técnica de espalhamento na determinação da potência de agentes antimicrobianos, foi realizado o método de espalhamento, que posteriormente foi comparado com o método de difusão em ágar, descrito como método oficial na Farmacopeia Brasileira (2010).

Foi observado que nas placas onde se realizou o método de espalhamento, o crescimento do micro-organismo foi bastante homogêneo e os halos de inibição formados apresentaram-se bem definidos, não se sobrepuseram e ficaram bem espaçados, possibilitando assim, fácil obtenção dos dados para a determinação da potência (Figura 1).

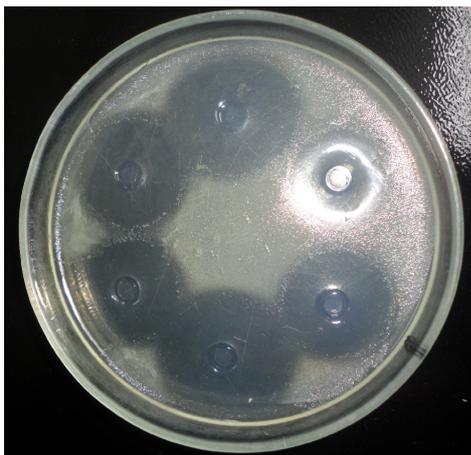


Figura 1 - Apresentação dos halos de inibição do *Micrococcus luteus* pela amoxicilina tri-hidratada pelo ensaio microbiológico – método de espalhamento.

O tamanho dos halos de inibição está representado na Tabela 1 e, a partir destas medidas foi determinada a potência de 99,86 da amoxicilina amostra.

Tabela 1: Valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de amoxicilina tri-hidratada pelo ensaio microbiológico pelo método de espalhamento

	Concentração das soluções	Média dos diâmetros dos halos de inibição (cm)*
P1	10 µg/mL	2,38
P2	20 µg/mL	2,79
P3	40 µg/mL	3,10
A1	10 µg/mL	2,40
A2	20 µg/mL	2,71
A3	40 µg/mL	3,15

*Cada valor representa a média de 3 determinações

Com os resultados obtidos foi construída a curva analítica (Figura 2) utilizando as concentrações de 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL. As soluções foram feitas em triplicata, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9936. A equação da reta foi $y = 0,5194\ln(x) + 1,2008$.

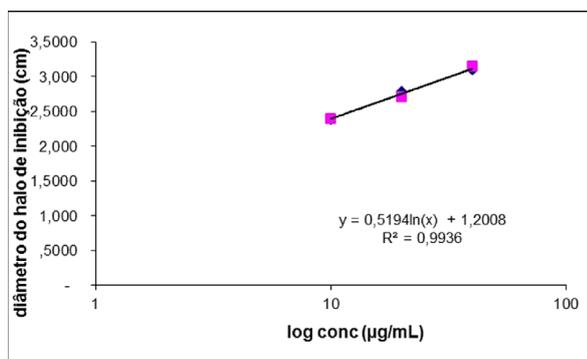


Figura 2 - Representação gráfica da curva analítica de amoxicilina tri hidratada pelo ensaio microbiológico – método de espalhamento

Nas placas onde foi realizado o método difusão em ágar o crescimento do micro-organismo também foi homogêneo, os halos de inibição formados ficaram bem definidos e os resultados foram compatíveis com os do método de espalhamento, obtendo-se a potência de 99,72 da amoxicilina amostra (Figura 3).

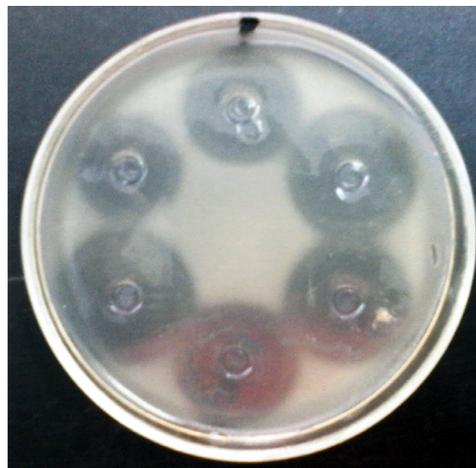


Figura 3 - Determinação da potencia de amoxicilina tri-hidratada pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.

O tamanho dos halos de inibição está representado na Tabela 2 e a partir dos resultados obtidos foi construída a curva analítica (Figura 4) com as soluções de 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL, em triplicata, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9996. A equação da reta foi $y = 0,0181(x) + 2,285$.

Tabela 2: Valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidos no doseamento de amoxicilina tri-hidratada pelo ensaio microbiológico pelo método de difusão em ágar.

	Concentração das soluções	Média dos diâmetros dos halos de inibição (cm)*
P1	10 µg/mL	2,47
P2	20 µg/mL	2,64
P3	40 µg/mL	3,01
A1	10 µg/mL	2,59
A2	20 µg/mL	2,73
A3	40 µg/mL	3,03

*Cada valor representa a média de 3 determinações

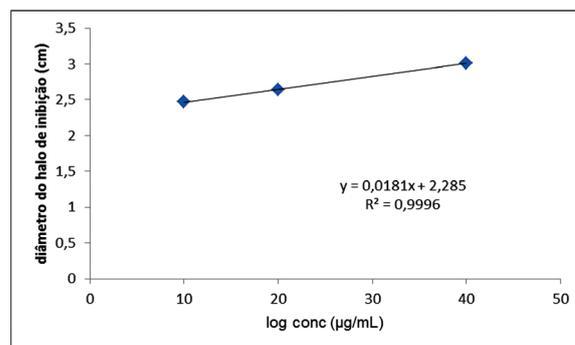


Figura 4 - Representação gráfica da curva analítica de amoxicilina tri hidratada pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.

DISCUSSÃO

As cefalosporinas representam um grupo importante e crescente de antibióticos na medicina atual (Graham, 1995; Martinez et al., 2002; Pichichero, 2007). Eles são usados em particular no tratamento de infecções bacterianas, incluindo as resistentes. Métodos analíticos para a determinação quantitativa de fármacos são utilizados no controle de qualidade para gerar dados reprodutíveis e confiáveis (Schulman, 1991).

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de potência de fármacos têm recebido atenção considerável nos últimos anos, principalmente de agências reguladoras por causa de sua importância na análise farmacêutica. Os ensaios de difusão em ágar determinam a concentração de antimicrobiano presente numa amostra, por comparação com a curva de calibração. A zona de inibição é formada quando a concentração do fármaco inibe o crescimento microbiano.

O nosso trabalho apresenta grande vantagem na determinação da potência de antimicrobianos em relação ao método de difusão em ágar, pois facilita a aplicação do inóculo, evitando falha na aplicação da camada de superfície o que pode afetar o desempenho do método. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o método de espalhamento com o uso da alça de Drigalski é adequado e constitui-se, assim, em uma metodologia alternativa, econômica, confiável e de fácil execução para a determinação da potência de antimicrobianos. Porém, apesar dos resultados mostrarem a semelhança dos resultados entre o método de espalhamento e o de difusão em ágar para determinação da potência de amoxicilina, faz-se necessário testes complementares de validação para afirmar que eles podem ser totalmente intercambiáveis.

ABSTRACT

Comparison of methods for determining the power of amoxicillin: agar diffusion assay and method of spreading

For a successful treatment of infectious diseases, antimicrobial agents used at the infection site must be at a suitable concentration. This means that the potency of the antimicrobial, in the pharmaceutical preparations being administered, must be accurately known. The purpose of this study was to develop and test an alternative to the official agar diffusion method for the determination of the potency of an antimicrobial, the innovation being the way that the test microorganisms are applied, which is done with the help of a glass loop spreader. For the tests, Mueller–Hinton agar was chosen as the medium, *Micrococcus luteus* as the test organism and amoxicillin trihydrate as the test antibiotic. A total of 18 Petri dishes were used and, after measurement of the inhibition zones, the results were compared with the official method of agar diffusion with a seeded top agar layer. From these results it can be said that the method of spreading the inoculum with a sterile glass loop proved valid and constitutes an economic, reliable

and easier alternative method for the determination of antimicrobial potency.

Keywords: Assay. Microbiology. Potency.

REFERÊNCIAS

Esmerino LA, Pereira AV, Adamowicz T, Borges D M, Talacimon EA, Schelesky ME. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. UEPG Ci Biol Saúde. 2004;10(1):53-60.

Farago PV, Esmerino LA, Paula JP, Jacob JS, Servat L. Método microbiológico para o doseamento da potência da amoxicilina em suspensões orais. Acta Farm. Bonaer. 2006;25(1):112-6.

Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 5 ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

Gomes MLPC, de Souza SVC. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilínicos. Quim Nova. 2010;33(4):972-7.

Gorog S. Drug safety, drug quality, drug analysis. J Pharm Biomed Anal. 2008;48(2):247-53.

Graham PL. Pharmaceutical Chemistry: An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford: Oxford University Press; 1995.

Hewitt W. Microbiological assay. New York: Interpharm; 2004.

Langoni WNA, Silva AV, Souza LC. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. Arq Inst Biol. 2000;67(2):177-80.

Martinez LG, Falco PC, Cabeza. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. J Pharm Biomed Anal. 2002;29(3):405-23.

Pichichero ME. Use of selected cephalosporins in penicillin-allergic patients: a paradigm shift. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(3Suppl):13S-18S.

Schulman SG. Determination of cephalothin sodium by a chemiluminescence method. Anal Chim Acta. 1991;255(2):383-5.

United States Pharmacopeia: the official compendia of standards. 34th ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2011.

Recebido em 19 de setembro de 2012

Aceito em 18 de março de 2013